FERNANDA DE ASSIS BUENO AULER

**Estudo clínico-cirúrgico, tomográfico e imuno-histoquímico
de cães com neoplasia intranasal tratados com rinotomia e
quimioterapia**

**São Paulo
2015**

FERNANDA DE ASSIS BUENO AULER

Estudo clínico-cirúrgico, tomográfico e imuno-histoquímico de cães com neoplasia intranasal tratados com rinotomia e quimioterapia

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de Concentração:
Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:
Prof. Dr. Angelo João Stopiglia

De acordo: _____
Orientador(a)

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3233
FMVZ

Auler, Fernanda de Assis Bueno

Estudo clínico-cirúrgico, tomográfico e imuno-histoquímico de cães com neoplasia intranasal tratados com rinotomia e quimioterapia / Fernanda de Assis Bueno Auler. -- 2015.

112 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Angelo João Stopiglia.

1. Cães. 2. Neoplasia nasal. 3. Estadiamento tomográfico. 4. Marcadores tumorais. 5. Sobrevida. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo de marcador celular como fator prognóstico de cães com carcinoma nasal tratados com rinotomia e quimioterapia", protocolado sob o nº 2488/2011, utilizando nº indefinido de cães, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Angelo João Stopiglia, foi aprovado em reunião de 26/6/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Study of cell marker as a prognostic factor for dogs with nasal carcinoma treated with chemotherapy and rhinotomy", protocol number 2488/2011, utilizing indefinite number of dogs, under the responsibility Prof. Dr. Angelo João Stopiglia, was approved in the meeting of day 6/26/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 27 de junho de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: AULER, Fernanda de Assis Bueno

Título: Estudo clínico-cirúrgico, tomográfico e imuno-histoquímico de cães com neoplasia intranasal tratados com rinotomia e quimioterapia

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus amados e maravilhosos filhos Pedro e Guilherme pela compreensão e paciência para que eu concluísse este trabalho.

Ao meu amado marido André por seu amor, paciência, apoio e compreensão em todos estes anos durante minha trajetória profissional.

A minha maravilhosa mãe Olivia Teresa pelo seu imensurável amor por mim e meus filhos, e por seu indescritível e incomparável apoio em todas as minhas realizações pessoais e profissionais.

A minha querida filha do coração Rafaella.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Angelo Stopiglia por todos seus ensinamentos, confiança, apoio, paciência e compreensão durante este e demais trabalhos.

Ao meu pai José Otávio por seu apoio em minhas realizações pessoais e profissionais.

A todos os cães e tutores pela confiança e perseverança no tratamento contra o câncer.

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre me proteger e iluminar meu caminho

À Profa. Dra. Ana Carolina Brandão de Campos Fonseca Pinto, pela amizade, dedicação, auxílio, incentivo, conselhos e colaboração fundamental na realização deste trabalho, e também por conceder a sala para realização das rinoscopias.

À Profa. Dra. Júlia Matera pela amizade, por seu incentivo, inúmeras oportunidades, colaboração, confiança e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Bruno Cogliati, por seus ensinamentos, confiança e colaboração na realização deste trabalho, dos quais foram fundamentais e também por conceder o laboratório para realização das imuno-histoquímica.

À Profa. Dra. Denise Fantoni, pelo incentivo, dedicação e ensinamentos durante os procedimentos anestésicos.

À Profa. Dra. Silvia Cortopassi e Profa. Dra. Aline Ambrósio, pela dedicação e paciência durante as anestésias.

Aos Professores, Dr. Luis Cláudio Lopes da Silva e Dr. André Zoppa, pelo incentivo, confiança e ensinamentos sobre endoscopia.

À Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli pela confiança e conceder seu espaço para avaliação da imuno-histoquímica.

Às Médicas Veterinárias contratadas do Serviço de Cirurgia do HOVET-FMVZ/USP Patricia Ferreira de Castro, Andressa Gianotti Campos, Ayne Murata, Sandra Aparecida Rosner e Viviane Sanchez Galeazzi, pela amizade, confiança, ensinamentos e encaminhamento dos casos. Sua colaboração foi fundamental para este trabalho.

Às Médicas Veterinárias Patrícia Flor e Geni Patricio, pela amizade, anestésias e paciência durante os procedimentos, essenciais na confecção deste trabalho e por dividirem seus conhecimentos.

À Médica Veterinária Silvana Unruh, pela amizade e ensinamentos na avaliação das radiografias para este trabalho.

À Médica Veterinária Luciana Torres, pela amizade e ensinamentos nas avaliações histopatológicas.

À Médica Veterinária Samantha Ive Miyashiro, pela paciência e colaboração na execução dos exames laboratoriais.

Às Médicas Veterinárias contratadas do Serviço de Clínica Médica do HOVET- FMVZ/USP Denise Simões, Bruna Coelho, Andrea Ferreira, Vera Wirthl e Khadine Kanayama pela confiança e encaminhamento dos casos.

Ao amigo Franz Yoshitoshi, pelos seus ensinamentos sobre endoscopia, seu incentivo, oportunidade, confiança e amizade.

À amiga Leda Marques de Oliveira, pela amizade, incentivo e colaboração.

Aos amigos e pós-graduandos do Programa de pós-graduação do VCI: Cláudia Matsunaga, Maria Cláudia Inglez, Thais Macedo, Samanta Rios Mello, Fernanda Paes, Jaqueline França, Bruna de Castro Miranda, Bruno Ferrante, Cinthia Keiko, Douglas do Carmo Alonso, Fernanda Devito, Isis dos Santos Dal Bó, Leonardo Maggio, Mario Ferraro, Paula Finkensieper Pacheco, Thais Assumpção, pelas discussões de conhecimentos, colaboração, risadas e desafios.

Aos amigos e pós-graduandos Valter Winkel e Ana Luiza Nairismagi Alves, pelos ensinamentos e colaboração na realização das imunohistoquímicas.

As amigas e pós-graduandas do Laboratório (LAPMOL) Taynã Tiburcio, Cintia Maria, Verônica, Bel e especialmente a Tereza Cristina da Silva e Isis Paixão, pelos ensinamentos e colaboração na realização das imuno-histoquímica.

Aos muito especiais e queridos funcionários do Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET- FMVZ/USP Jesus dos Anjos Vieira, Otávio Rodrigues dos Santos, Clédson Lélis dos Santos, José Miron Oliveira da Silva, pela amizade, dedicação, colaboração fundamental e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos secretários Belarmino Ney Pereira e Livia Gimenes pela amizade, atenção, paciência e ajuda em todas as horas.

Aos funcionários dos Serviços de Cirurgia de Grandes Animais do HOVET- FMVZ/USP Henrique Fragoso e Cícero da Silva, por sempre estarem dispostos a ajudar.

À querida Marguite Isaura de Sousa Silva por ter me ajudado muito em momentos difíceis durante a realização das imunohistoquímicas.

A todos os funcionários do Departamento de Patologia, em especial a Cláudia Faria.

Às funcionárias do setor de Laboratório Clínico, Marly Elisabete Ferreira de Castro, Cláudia, Edna Santana dos Santos e Creide Donizete da Costa, pela boa disposição em ajuda em tudo que fosse possível.

A todos os Residentes do HOVET- FMVZ/USP, pelos casos encaminhados.

A todas bibliotecárias, em especial, Elza e Elena.

À Pretinha minha companheira, muitas saudades.

À Fundação CAPES pelo apoio financeiro durante a realização deste projeto.

À FAPESP pelo apoio financeiro do projeto número 2013/12113-4.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

"A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez"

George Bernard Shaw

RESUMO

AULER, F. A. B. **Estudo clínico-cirúrgico, tomográfico e imuno-histoquímico de cães com neoplasia intranasal tratados com rinotomia e quimioterapia.** [Clinical, surgical, CT scan and immunohistochemical study in dogs with intranasal neoplasia treated with rhinotomy and chemotherapy.]. 2015. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Introdução: Neoplasias malignas nasais e sinonasais em cães são invasivas e de difícil tratamento. Para conclusão diagnóstica indica-se a rinoscopia, estudo histopatológico (HP) da biópsia, e exame tomográfico de cabeça (TCC). São escassos na literatura estudos desta afecção sobre tempo de sobrevida e remissão correlacionando achados clínicos, estadiamento por meio da TCC, HP, tratamento e a influência da expressão de marcadores tumorais. **Objetivo:** Avaliou-se o tempo de sobrevida e remissão em cães com neoplasias nasais e nasossinusais malignas, correlacionando com a idade, sexo, características clínicas, e graduação da afecção por meio de estadiamento, tratamentos quimioterápicos adjuntoriamente ou não a rinotomia e influência da expressão dos marcadores tumorais COX-2, EGFR, VEGF, p53, Ki-67 e PCNA. **Materiais e métodos:** Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética com o número 2488/11. Foram inseridos 25 cães com raça, sexo e idade variadas atendidos no Departamento de Cirurgia e provenientes Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, com diagnóstico conclusivo de neoplasia nasal, após resultados dos exames de TCC, rinoscopia e HP. O protocolo quimioterápico empregado utilizou a carboplatina 300mg/m² e a doxorubicina 30mg/m² em sessões intercaladas, e rinotomia quando indicado. O tempo de sobrevida foi avaliado após o diagnóstico HP e a remissão a partir da primeira sessão quimioterápica. Dados sobre as manifestações clínicas, tipo tumoral, classificação baseada no estadiamento de Adams et al. (2009), modificado por nós, e expressão dos marcadores, foram correlacionados com a resposta ao tratamento, remissão e tempo de sobrevida. **Resultados:** Destes animais 56% eram machos (n=14), com idade média de 10,1 anos, sendo 60% neoplasias epiteliais (n=15) e 40% mesenquimais (n=10). Animais com epistaxe obtiveram menor tempo de sobrevida e de remissão (p = 0,015). Pelo estadiamento classificou-se os cães como T3 (7/25), T4 (9/25) e T5(9/25), observando menor tempo de sobrevida global em animais com graduação elevada (p = 0,006). Controle

da afecção ocorreu em 80% dos animais (n=20) com tempo médio de sobrevida de 276,8 dias. Animais com remissão ($p = 0,001$) obtiveram menor risco de mortalidade (98%). Expressões elevadas de COX-2 ($p = 0,006$) influenciou no menor tempo de sobrevida e de EGFR ao menor tempo de remissão ($p = 0,021$), a expressão dos demais marcadores não representou significância estatística. **Conclusão:** Os resultados demonstram presença de expressão dos marcadores nos tumores epiteliais e mesenquimais nasais e nasossinusais, com resultados significativos relacionados a influência do EGFR e da COX-2. A ocorrência de epistaxe pode ser considerada característica de mau prognóstico, assim como a deformidade facial, no menor tempo de remissão. O emprego do estadiamento da TCC colaborou com a avaliação prognóstica desta afecção. Apesar de não curativo e sem resultados estatisticamente significativos, as modalidades terapêuticas utilizadas apresentaram aumento no tempo remissão influenciando no aumento de tempo sobrevida global. Estes resultados foram promissores quanto a expressão dos marcadores tumorais nas neoplasias nasais malignas de cão, assim como o emprego do estadiamento e tratamento em relação ao tempo de sobrevida e de remissão dos animais afetados por esta afecção.

Palavras-chave: Cães. Neoplasia nasal. Estadiamento tomográfico. Marcadores tumorais. Sobrevida.

ABSTRACT

AULER, F. A. B. **Clinical, surgical, CT scan and immunohistochemical study in dogs with intranasal neoplasia treated with rhinotomy and chemotherapy.** [Estudo clínico-cirúrgico, tomográfico e imuno-histoquímico de cães com neoplasia intranasal tratados com rinotomia e quimioterapia]. 2015. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Introduction: Nasal malignant neoplasia in dogs are invasive with a difficult treatment. The diagnostic includes rhinoscopy, histopathology (HP), and head tomography (CT). There are few studies in the literature evaluating survival time and remission, with clinical findings, CT staging, HP, treatment and the influence of cellular markers expression. **Objective:** To evaluate the effects of chemotherapy in conjunction or not with rhinotomy in dogs with malignant nasal and sinonasal neoplasia, and associated age, sex, clinical features, staging system and presence of cell markers COX-2, EGFR, VEGF, p53, Ki-67 and PCNA with survival time and disease control. **Methods:** the Ethics Committee with the number 2488/11 approved this study. In this study, 25 dogs with different breeds, gender and age evaluated from Department of Surgery and from the Veterinary Hospital of the Veterinary Medicine and Animal Science School of the University of São Paulo, with nasal malignant neoplasia, after rhinoscopy, CT scan and histopathological diagnostic. The chemotherapy protocol used was carboplatin 300 mg/m² and doxorubicin 30 mg/m² in intercalated sessions. Rhinotomy was applied when indicated. Survival time was evaluated after the histopathological conclusion and remission was evaluated from the first chemotherapy application. Clinical characters, tumor type, stage based on staging system (ADAMS et al., 2009) modified for this study, treatment and expression of the markers were associated with disease control and survival time. **Results:** Fifty six per cent were males (n = 14), with mean age 10.1 years, and 60% epithelial neoplasms (n = 15) and 40% mesenchymal (n = 10). Animals with epistaxis had lower survival time and remission time (p = 0.015). In according with staging system twenty-eight per cent was classified in T3 (7/25), and 36% classified in T4 (9/25) and the others 36% in T5 (9/25) the lower overall survival time was associated in animals with more advanced stage (p = 0.006). Control of the disease occurred in 80% of animals (n = 20) with mean survival time of 276.8 days. Animals with

remission ($p = 0.001$) had decreased death (98%). High COX-2 expression ($p = 0.006$) was associated with shorter survival and EGFR expression with the disease control ($p = 0.021$). The expression of other markers did not present statistical significance. **Conclusion:** The results indicated significant about the influence of COX-2 and EGFR expression in malignant nasal neoplasia in dogs. Epistaxis was considered a signal for bad prognosis and facial deformity have influence in remission time. The staging system by CT was applicable and useful prognostic factor. Although the results was not statistically significant about the therapeutic modalities used, but showed an increase remission time and overall survival time. These results were promising as the expression of cellular markers in malignant nasal tumors dog, as well as the use of staging system and treatment in relationship with survival time and remission of animals affected by this disease.

Keywords: Dogs. Nasal neoplasia. Stage system. Cells markers. Survival time.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Carcinogênese.....	19
2.1.1	Ciclo celular e mecanismos regulatórios	20
2.1.2	Angiogênese.....	24
2.1.3	Oncogenes e proto-oncogenes	26
2.1.4	Genes supressores de tumor	27
2.1.5	Mediadores inflamatórios	29
2.2	Neoplasias nasais	32
2.2.1	Neoplasias intranasais e nasossinusais	32
2.2.2	Diagnóstico e estadiamento	33
2.2.2.1	<i>Exames de imagem.....</i>	<i>34</i>
2.2.2.2	<i>Rinoscopia.....</i>	<i>37</i>
2.2.2.3	<i>Biópsia e estudo histopatológico</i>	<i>39</i>
2.2.3	Tratamento	40
3	OBJETIVO	42
4	JUSTIFICATIVA.....	43
5	MATERIAIS E MÉTODOS	44
5.1	Animais.....	44
5.2	Crterios de incluso e exclusão.....	44
5.3	Anestesia.....	45
5.4	Exames de imagem	46
5.5	Estadiamento tomográfico	47
5.6	Rinoscopia	48
5.7	Quimioterapia	49
5.8	Técnica cirúrgica	50
5.9	Avaliação da resposta ao tratamento	51
5.10	Imuno-histoquímica	52
5.10.1	Protocolo de reação dos marcadores.....	54
5.10.1.1	<i>VEGF, EGFR, COX-2.....</i>	<i>54</i>
5.10.1.2	<i>PCNA, Ki67 e p53</i>	<i>55</i>

5.11	Avaliação dos resultados	55
5.12	Análise estatística	56
6	RESULTADOS	57
6.1	Casos clínicos	57
6.2	Rinoscopia e biópsia.....	64
6.3	Exame tomográfico e estadiamento	65
6.4	Tratamento e sobrevida	73
6.5	Imuno-expressão dos marcadores	78
7	DISCUSSÃO	88
8	CONCLUSÃO	98
	REFERÊNCIAS	99
	APÊNDICES.....	108
	ANEXO	110

1 INTRODUÇÃO

Neoplasias nasais e nasossinusais malignas, apesar de consideradas raras, estão sendo observadas com frequência na prática clínica veterinária na última década. A literatura descreve sua representação entre 1% a 2% de todos os tipos de câncer que acometem a espécie canina sendo os principais tumores observados no trato respiratório, representando cerca 59% a 82%. Em 80% dos casos estes tumores possuem caráter maligno, crescimento rápido e invasivo, ao ponto de raramente promoverem metástases. As manifestações clínicas características desta afecção são episódios de epistaxe, secreções nasais intermitentes, que variam de mucóide a purulenta, e deformidade facial. Outras afecções que acometem as cavidades nasais, como rinites de causas inflamatórias, fúngicas e até mesmo causadas pela presença de corpo estranho, apresentam manifestações clínicas semelhantes.

A tomografia computadorizada de cabeça (TCC) é o método de diagnóstico por imagem mais indicado para avaliar estruturas adjacentes ao crânio, incluindo cavidades nasais e seios paranasais, e determinar extensão da lesão e sinais de osteólise. O exame também identifica a presença de acometimento em região de placa cribiforme, bulbo olfatório, espaço retrobulbar, cavidades cerebral e oral. Os métodos complementares como exames de imagem, rinoscopia e exames laboratoriais, são de relevância significativa para a conclusão diagnóstica, pois lesões na região das cavidades nasais e crânio são observadas com frequência, dificultando distinguir apenas com exame de imagem o tipo de afecção, sendo as lesões similares e podem estar presentes em outras afecções nasais, principalmente quando são crônicas. Mesmo com a utilização de ferramentas diagnósticas específicas para afecções nasais de diferentes tipos, não se exclui o estudo histopatológico da biópsia, ainda considerado o principal método para diagnosticar neoplasias nasais malignas. Outra possibilidade a ser destacada no emprego do exame tomográfico é o planejamento cirúrgico e o estadiamento de doenças neoplásicas, que vem sendo utilizado com maior frequência na medicina veterinária. No caso das neoplasias intranasais e sinonasais, estudos, na maioria retrospectivos, referem sua contribuição para avaliar o prognóstico e resposta ao tratamento.

Atualmente, observa-se aumento no número de estudos sobre o câncer na Medicina Veterinária, onde novas técnicas vêm sendo pesquisadas e realizadas, como avaliar a presença de marcadores tumorais envolvidos no processo neoplásico por meio da imuno-histoquímica. Sua utilização, juntamente com os dados clínicos do paciente e o resultado da análise histopatológica, podem fornecer informações como o comportamento biológico tumoral caracterizando o prognóstico da afecção, além de auxiliar no estabelecimento de terapias a serem aplicadas futuramente. No caso desta afecção o tratamento é limitado, sendo direcionado ao controle da doença, baseado na localização e no tipo de tumor. Sem tratamento, a expectativa de vida é de aproximadamente 95 dias de sobrevida, após o diagnóstico. A limitação referente ao tratamento em conjunto com pouco tempo de sobrevida e qualidade de vida, incluindo o aumento da casuística tornam importante esta pesquisa sobre modalidades terapêuticas e aumento da sobrevida, e prognósticas. Assim em face dos poucos estudos prospectivos ainda presentes na literatura, sobre o tratamento, prognóstico e sobrevida destes animais, utilizando quimioterapia, tratamento cirúrgico, e também estadiamento tomográfico e o uso de marcadores tumorais se torna o objetivo da presente pesquisa, a fim de subsidiar a literatura no sentido de observar-se, quando correlacionados ou não, quão poderiam auxiliar, de forma mais precisa, prognóstico, estabilidade do quadro e qualidade de vida dos cães com neoplasia nasal maligna.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinogênese

O câncer é considerado afecção genética podendo ocorrer de forma esporádica ou hereditária. Estudos revelam que a carcinogênese inicia-se com mutação do DNA, resultando em crescimento celular incontrolável (PONDER, 2001; BANKS; STRAW, 2009). Comumente, estas mutações ou danos, são potencializados por agentes carcinogênicos, como agentes químicos, físicos ou virais (REIF; BRUNS; LOWER, 1998; BANKS; STRAW, 2009). Uma única mutação não é suficiente para o desenvolvimento do tumor, sendo necessárias pelo menos duas ou uma série delas para possibilitar o desenvolvimento de proliferação celular. A consequência desta série de mutações é responsável pelo aumento do potencial maligno celular levando a invasão e destruição tecidual, tornando a afecção clinicamente evidente (MODIANO; BREEN, 2007). Qualquer célula, mesmo normal, pode originar ou ser origem de um processo neoplásico quando submetida à uma série de eventos que promovem o desequilíbrio entre mecanismos regulatórios de proliferação celular e apoptose. Estes mecanismos são controlados por inúmeros genes, que ao sofrerem mutações expressam-se de forma alterada resultando na formação de neoplasias (VOGELSTEIN; KINZLEIR, 2004; FEARON; BOMMER, 2008).

Em circunstâncias normais, quando o DNA sofre um dano, o mesmo é reconhecido e naturalmente reparado, entretanto, falhas durante o processo prejudicam tanto o reconhecimento como seu reparo, permitindo a transmissão desta mutação para células descendentes. Mesmo com a transmissão de mutações, as consequências podem não ser significativas para a célula, porém, estes danos, podem resultar em displasia, caracterizada pela alteração morfológica e funcional da célula (VOGELSTEIN; KINZLEIR, 2004; FEARON; BOMMER, 2008). A displasia potencializa seu metabolismo anaeróbio, o que traz vantagens à célula, como torná-la menos susceptível a hipóxia, entretanto, ao contrário, os danos ao DNA serão acumulados e a displasia passa a ser severa resultando em malignidade.

O DNA danificado resulta em morte celular causada pelo dano em si ou pela ativação da apoptose. A velocidade em que as células normais crescem está relacionada ao processo de mitose, sendo controlada pelo envio de sinais anti crescimento (VOGELSTEIN; KINZLEIR, 2004).

Nas células tumorais a velocidade do crescimento é independente dos estímulos mitogênicos externos. O tempo e a maneira em que ocorre o crescimento celular é o que caracterizará o grau de malignidade, a capacidade de desenvolver novos tumores, assim como, promover metástase, tornando o tratamento ainda mais desafiador. Mesmo quando se trata de tumores primários em fase inicial, não se descarta a possibilidade de ocorrer metástase (VOGELSTEIN; KINZLEIR, 2004; BANKS; STRAW, 2009). As frações de crescimento de uma neoplasia são inconstantes e podem diminuir exponencialmente com o tempo, ou seja, em um tumor grande as frações de crescimento desaceleram devido a diminuição no suporte de oxigênio e nutrição, levando a senescência de algumas células ou morte, resultando em necrose (BANKS; STRAW, 2009). Outra característica do câncer é a imortalidade celular (HARLEY, 2008).

2.1.1 Ciclo celular e mecanismos regulatórios

O ciclo celular passa por fases distintas e divididas, sendo denominadas e caracterizadas de acordo com os momentos em que ocorrem durante o ciclo. A fase inicial ou primeira é denominada fase G1 que ocorre antes da síntese de DNA, a segunda é a fase S que caracteriza a síntese do DNA, e o período após a replicação do DNA é denominada G2, seguindo pela fase mitótica (M), e pôr fim a fase de divisão celular, ou seja, a formação de duas células filhas, denominada citocinese (LEVINE et al., 1994; RABENHORST et al., 1994). Já as células que não estão participando do ciclo celular, estão na fase G0, podendo permanecer-se como tal por tempo indeterminado (RABENHORST et al., 1994). O início deste ciclo é controlado por hormônios, fatores nutricionais e de crescimento, dos quais são responsáveis por estimular a proliferação celular, ligando-se aos seus receptores específicos, que emitem sinal de transdução do citoplasma ao núcleo celular. A regulação do ciclo celular é dada pelas ciclinas que se ligam as moléculas de quinase, formando as

ciclinas dependentes de quinases (CDK), que promovem fosforilação de proteínas alvo, sendo ativadas e degradadas durante o ciclo celular. As ciclinas podem ser classificadas como mitóticas, que em conjunto com as CDK formam o fator promotor de maturação (HARTWELL; WEINERT, 1989), e as ciclinas G1, necessárias para a entrada da célula na fase S. Estas moléculas atuam controlando o ciclo por meio de checagem em cada fase. São capazes de determinar se houve danos ao DNA, ou qualquer tipo de erro durante a replicação cromossômica, verificando se todas as condições são favoráveis à mitose, e só assim permitirá que se inicie uma nova fase. A existência de falhas durante o processo irá permitir que células geneticamente anormais dividam-se, acumulando danos genéticos dando início a progressão das neoplasias (HARTWELL; WEINERT, 1989; RABENHORST et al., 1994; VAN DIEST; BRUGAL; BAAK, 1998; ARISAWA et al., 1999).

A descoberta do envolvimento destas proteínas na fase replicativa do DNA, deu início a inúmeras pesquisas, com diferentes métodos, mas com o objetivo de identificar e determinar seu envolvimento no ciclo celular, por meio de detecção e contagem. Estudos que se aprofundam nestes mecanismos demonstram que a atividade proliferativa tem grande significado prognóstico em uma variedade de tumores e que sua proliferação descontrolada é um importante mecanismo biológico envolvido na oncogênese (VAN DIEST; BRUGAL; BAAK, 1998). A avaliação da presença de células proliferantes em tecidos neoplásicos, pode ser feita por meio de anticorpos dirigidos contra antígenos específicos, expressos nestas células, que permite a análise simultânea da proliferação celular e de sua histologia (HALL; LEVINSON, 1990). Os resultados da atividade proliferativa, em qualquer tecido é determinado pelo número de células ciclizantes e pelo tempo que levam para completar este ciclo, do qual é avaliado por meio da taxa de crescimento (BROWN; GATTER, 1990).

Estes marcadores de proliferação celular têm sido classificados em três categorias como marcadores de fração de crescimento; marcadores de fases específicas do ciclo celular; e marcadores de tempo do ciclo celular. Dentre os marcadores de proliferações, estão o Ki67 caracterizado como um antígeno nuclear associado ao ciclo celular e o PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) considerado como antígeno nuclear de células proliferativas.

A fração de crescimento, isto é, a proporção que as células crescem dentro do ciclo, pode ser facilmente identificada pelo Ki67 considerado uma proteína nuclear

que geralmente detecta células proliferativas durante a fase G1 (KENNEDY et al., 1997); e o PCNA, também nuclear. Estes marcadores nucleares são comumente observados em fenótipos malignos avaliados por meio de sua expressão, pelo estudo imuno-histoquímico (BASERGA, 1991; SAWHNEY; HALL, 1992). O Ki67 é uma proteína não histônica que faz parte da estrutura protéica conhecida como suporte cromossômico (FONATSCH et al., 1991).

Existem inúmeros estudos que relatam o envolvimento do Ki67 no desenvolvimento do câncer, e sua presença em diferentes tipos de amostras neoplásicas teciduais, incluindo sua correlação com o desenvolvimento maligno do tumor sendo considerado indicador de mau prognóstico.

O Ki67 está presente em todas as fases do ciclo de divisão celular (exceto G0), alcançando sua maior expressão nas fases G2 e M, sendo um antígeno monoclonal, de vida média de uma hora. Vários estudos referenciam o Ki67 como protetor clínico do comportamento biológico das neoplasias malignas, pois possibilita diagnosticar a síntese do DNA da neoplasia com o aumento da marcação de células malignas com este antígeno. Sua expressão também deve ser avaliada em margens cirúrgicas, pois a presença do Ki67 pode indicar invasão tumoral em tecidos adjacentes, por vezes não detectadas à microscopia óptica, sendo o aumento de sua positividade determinante aos índices de mau prognóstico. Importante ressaltar que a positividade do Ki67 não é exclusiva das neoplasias malignas, mas sim predominante em relação às neoplasias benignas (BARBOSA et al., 2003).

O PCNA ou antígeno nuclear de proliferação celular auxilia no DNA-polimerase-delta, atuando na replicação e no reparo de moléculas de DNA lesadas, por meio da excisão de nucleotídeos, formando um complexo quaternário com a proteína P21, a ciclina D e a CDK (XIONG; ZHANG; BEACH, 1992). Já foram descritos, na Medicina Veterinária, a presença do Ki67 e do PCNA em neoplasias malignas como mastocitomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, linfomas, entre outros (NEWMAN, 2003). Nos casos de meningiomas e carcinomas de células escamosas em felino, as amostras com altos níveis de PCNA, foram de animais que não apresentaram melhora significativa no tratamento radioterápico quando comparado com os demais. Assim como, o Ki67, quando esteve presente em maior quantidade nos tumores mamários, indicou pior prognóstico nos animais avaliados (NEWMAN, 2003). Outro estudo, realizado por Fu et al. (2014), também sobre a expressão do Ki67, dentre os marcadores avaliados, teve como objetivo

estudar amostras de carcinomas nasais de cães tratados por radioterapia com o objetivo de avaliar a resposta ao tratamento baseado na apoptose e proliferação. Além do estudo imuno-histoquímico, também foi aplicado o índice de apoptose, avaliado por meio do ensaio TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling) em 33 amostras nasais de cães com tumores nasais, das quais foram obtidas antes de qualquer tratamento. A porcentagem do índice de apoptose variou entre 0 a 0,7%, já as células marcadas pelo Ki67 indicaram algum grau de proliferação em todas as amostras, que variaram entre 0,8 a 77%, entretanto, nenhuma das variáveis propostas apresentaram correlação estatisticamente significativa com a sobrevida.

Em humanos, no estudo realizado por Bura et al. (2007), investigou alguns marcadores tumorais, entre eles o Ki67 e o p53, nas amostras teciduais de carcinomas nasais e de papilomas invertidos nasais, que apesar de ser considerado tumor benigno, na maioria das vezes, é recorrente e pode ser precursor do carcinoma nasal. O objetivo do estudo foi o de avaliar o prognóstico destes pacientes por meio da expressão de marcadores, avaliando 49 biópsias de 41 pacientes, onde oito foram diagnosticadas como carcinoma. A expressão do Ki67 apresentou imunoreatividade, considerada forte em ambos os tecidos, sendo mais evidente nos carcinomas, e apesar de sua expressão ter sido considerada de alta sensibilidade, mas pouco específico, os autores concluíram que sua presença pode estar relacionada com a alta recorrência e diferenciação celular associada a esta afecção.

Em 2014, outro estudo também com papilomas invertidos em humanos, realizado por Tsu et al. (2014) avaliando a expressão do Ki67 e PCNA, dentre outros marcadores, foi realizado utilizando 60 amostras de papiloma e dez amostras de carcinomas de células escamosas. Os autores deste trabalho, simularam, por meio computacional específico, a relação entre as CDKs, Ki67 e PCNA. Expressões significativas de ambos foram reveladas, principalmente nos carcinomas, assim como suas interações com o CDK1 na proliferação celular, o que levou à conclusão do envolvimento destes marcadores na recorrência da lesão e aumento do risco de alteração celular.

2.1.2 Angiogênese

Para sobreviverem as neoplasias requerem suporte vascular, o que ocorre por meio da angiogênese. Este complexo processo envolve múltiplos fatores dependentes de mediadores e receptores, adesões moleculares, e outros fatores como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento fibroblástico básico (FGF-b) (FERRARA et al., 2003; KERBEL, 2008). O receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) e o VEGF são considerados proto-oncogenes e sinalizam etapas no desenvolvimento da carcinogênese. O VEGF está relacionado a angiogênese patológica, sendo associado aos tumores e desordens neovasculares (FERRARA et al., 2003; SHIOMITSU et al., 2009). A vascularização do tumor maligno é conhecida por apresentar alteração na morfologia, arquitetura e na função dos vasos sanguíneos, o que pode levar a hipóxia intratumoral. Esta hipóxia pode estimular os fatores angiogênicos, tais como VEGF. As células hipóxicas costumam ser mais resistentes ao tratamento e possuem um comportamento mais agressivo (SHIOMITSU et al., 2009).

O EGFR é uma glicoproteína presente na membrana plasmática, que pertence ao grupo de fatores de crescimento e de genes receptores de tirosina-quinase. A ligação do EGFR com seus ligantes, EGF (fator de crescimento epitelial) e TGF- α (fator de crescimento tumoral alfa), resulta em proliferação, apoptose, angiogênese e, por fim, metástase, exercendo papel importante na progressão do ciclo celular. Este gene é considerado importante mediador no crescimento celular tanto na diferenciação como na sobrevivência celular (CIARDIELLI, 2006; ROCHA-LIMA, 2007). Estudos indicam que células malignas, contactam inadequadamente a matriz estromal, e só sobrevivem pela ativação do EGFR, fazendo com que ocorra estímulo na produção do VEGF, do qual é considerado o principal fator angiogênico. (RIEDEL et al., 2002; KARI et al., 2003). As funções do EGFR e do VEGF estão intimamente relacionadas, onde o EGFR pode regular a expressão do VEGF (CIARDELLI et al., 2006).

A expressão do EGFR já foi detectada em tecidos normais e neoplásicos nas camadas germinativas, particularmente, nas camadas de origem epitelial. Alguns tumores expressam o EGFR quando comparados a células normais, e esta expressão está sendo associada à agressividade da neoplasia, menor sobrevida e

maior ocorrência de doença metastática. Sua expressão excessiva é referida ao crescimento tumoral e resistência à apoptose (JOST; RODECK, 2000; NICHOLSON; HARPER, 2001; CECCARELLI et al., 2005). Em muitos tecidos neoplásicos humanos, detectou-se a expressão ou superexpressão do EGFR, como por exemplo, em carcinomas nasofaríngeos, que foi superexpresso em 70% das amostras avaliadas de cento e onze pacientes avaliados (PAN et al., 2008).

Na medicina veterinária, a expressão e ou superexpressão do EGFR e do VEGF já foi detectado em tumores nasais, e em tecidos de carcinoma mamário, carcinoma de tireóide, osteossarcoma e carcinoma de células de transição em bexiga (GAMA et al., 2009; SHIOMITSU et al., 2009; SELVARAJAH et al., 2012; CAMPOS et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2014; HANAZONO et al., 2015).

No estudo retrospectivo de Shiomitsu et al. (2009), foram avaliadas 24 amostras parafinadas de neoplasia nasal de cães, caracterizadas por carcinoma, adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma transicionais, e as amostras submetidas, por meio de estudo imuno-histoquímico, demonstraram a expressão do EGFR em 54,2% sendo consideradas moderada e significativamente moderada. A expressão do VEGF foi detectada em 91,7% das amostras. No entanto, segundo os autores, no material analisado não houve diferença quanto à intensidade da expressão do EGFR e do VEGF, dentre os tumores avaliados. Os autores consideraram que a expressão do EGFR e VEGF pode ser um importante alvo terapêutico de cães com neoplasia nasal.

Hanazono et al. (2015), avaliaram a proteína EGFR pelo estudo imuno-histoquímico e PCR (reação em cadeia de polimerase) em amostras de tecido de carcinoma de células de transição de bexiga de cão (n=25). Por meio da avaliação imuno-histoquímica a expressão do EGFR na membrana foi visibilizada de forma uniforme e intensa nos tecidos tumorais, e ausente, fraca ou incompleta na membrana de tecidos identificados como pólipos císticos (n=5) e tecidos normais (n=5) de bexiga. Pelo PCR, os níveis de EGFR mRNA obtidos também foram significativamente maiores entre o grupo dos tumores. A superexpressão do EGFR na membrana foi estatisticamente significativa quanto à sensibilidade em 72% com especificidade de 100%. As análises comparativas sobre a proteína do mRNA também demonstraram estatisticamente significativas quando comparadas, o que pode auxiliar no diagnóstico destes tumores. No entanto, não houve resultado significativo durante o segmento clínico.

Em amostras teciduais ósseas de cães com osteossarcoma em que expressão de EGFR foi classificada como fraca ou ausente, demonstraram pior prognóstico comparado aqueles que demonstraram expressão mais evidente. O estudo imuno-histoquímico demonstrou expressão significativa do EGFR nas células tumorais ósseas, e também no tecido pulmonar, mas os resultados estatísticos não foram significativos (SELVARAJAH et al., 2012).

2.1.3 Oncogenes e proto-oncogenes

As constantes pesquisas sobre o câncer e de moléculas que possam servir como novas alternativas de tratamento, diagnóstico e prognóstico desta afecção, conduziram descobertas dos oncogenes, genes supressores de tumores e genes de reparo do DNA envolvidos diretamente com a carcinogênese (SERRANO; THEODORO; PINHAL, 2014). Estes fatores apresentam sequências muito semelhantes ao DNA das células normais (FEARON; BOMMER, 2008).

Os proto-oncogenes, por exemplo, foi uma destas descobertas, a qual, representa genes constituintes do genoma com diversas funções biológicas relacionadas com processos de proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. Quaisquer mutações nos proto-oncogenes geram oncogênese. Estas mutações podem ocorrer de forma espontânea ou pela ação de retrovírus, que levam à amplificação gênica ou translocação de segmentos específicos de DNA, capazes de gerarem proteínas defeituosas, denominadas oncoproteínas.

As oncoproteínas podem apresentar diferentes funções como receptores do tipo tirosina-quinase, fatores de crescimento, proteínas envolvidas no processo de apoptose, fatores de transcrição, enzimas de reparo do DNA, ciclinas e proteínas que participam de mecanismos específicos de sinalização celular (KERBEL, 2008; SERRANO; THEODORO; PINHAL, 2014). Dentro desta categoria, estão os genes de fatores de crescimento e seus receptores, proteínas quinases, e as proteínas envolvidas na transdução de sinais e as proteínas reguladoras nucleares (SERRANO; THEODORO; PINHAL, 2014).

Todos estes fatores, associam-se a divisão celular e ao desenvolvimento do câncer (KERBEL, 2008). Alterações nos proto-oncogenes e nos genes supressores

de tumor podem provocar o crescimento descontrolado celular potencializando sua malignidade (FEARON; BOMMER, 2008; NORTH; BANKS, 2009).

2.1.4 Genes supressores de tumor

Ao contrário dos oncogenes onde a função é estimular a proliferação celular, os genes supressores agem através de alterações que codificam proteínas inibitórias de divisão celular (TUREK; LANA, 2007; NORTH; BANKS, 2009). A progressão do tumor pode resultar da ocorrência de um mecanismo oposto pela perda de função de um determinado gene. Esses genes são necessários para o funcionamento de uma célula normal, mas a interrupção de suas funções, pode estimular a formação de tumores. Os genes supressores de tumor normalmente extinguem o crescimento celular ou medeiam a diferenciação celular. Nos cânceres esses genes são inativados. Quando se trata de seres humanos, ao nascimento há duas cópias de quase todos os genes, sendo necessários estímulos ou lesões para que ocorra a liberação dos efeitos reguladores dos genes supressores de tumor, e dentre os genes supressores de tumor estão o Rb e o p53, que são inativados em alguns tipos de câncer.

O conceito do gene supressor tumoral fornece explicação para como um indivíduo nasce com predisposição ao câncer, que ocorre quando um alelo de gene é mutado em todas as células, aumentando significativamente a probabilidade de que alguma célula ou células poderiam perder ambas as cópias do gene (LYNCH; BOLAND, 2014). As proteínas codificadas por estes genes inibem a progressão em estágios específicos do ciclo celular, incluindo o bloqueio do ciclo celular, caso ocorra algum dano no DNA, promovendo a morte celular. As interações entre as várias proteínas regulatórias do ciclo celular e apoptose, são complexas.

Este sistema complexo de interações entre as CDKs promovem transições entre as fases dos ciclos tumorais, no entanto, possuem inibidores como p21(p21WAF1 / Cip1) e o p27 que reprogramam as funções deste sistema e bloqueiam o ciclo celular. A p21 é uma proteína reguladora da fase G1 ou S, seguindo importante fonte de investigação para o estudo do câncer, pois é nesta fase onde ocorre a replicação do DNA, uma das fases onde há maior probabilidade

de ocorrer mutações genéticas, sendo o p53 responsável pela regulação do p21 (SHERR; ROBERTS, 1999). A proteína p27, também conhecida como proteína inibidora de quinase (p27 Kip1), une-se aos complexos de ciclina, e restringe a proliferação celular definindo o nível de limiar de ciclina.

Uma alternativa de atuação do p53 a danos não reparados, caso outras vias não estejam intactas, é a indução do apoptose. Além disso, p53 também verifica o ponto onde a fase de S passa para a fase G2, portanto, mutações no p53 devem ser consideradas, pois podem desencadear a transformação maligna, pela falta do reparo destes danos. Embora seja considerado um gene supressor de tumor, porque a maioria das mutações leva à perda de função, o p53 quando sofre alguns tipos de mutações pode exercer efeito negativo dominante, ou seja, o produto do único alelo mutado interage e inativa o alelo normal, induzindo o câncer e atuando, portanto, como um oncogene (FETTE-CONTE; SALLES, 2002).

O p53 é o gene supressor que pertence a uma das classes de genes supressores, sendo um dos genes relacionado aos cânceres em humanos (TUREK; LANA, 2007; NORTH; BANKS, 2009). A presença deste gene mutado já foi descrita em vários cortes histológicos (NORTH; BANKS, 2009). No estudo realizado por Bura et al. (2007) houve marcação do p53 nos cortes histológicos de papilomas invertidos e de carcinomas humanos, porém não consideraram específico com a sobrevivência dos pacientes, e sim com a recorrência da doença e diferenciação para carcinoma, principalmente quando houve marcação em conjunto com o Ki67. Em outro estudo retrospectivo realizado por Oncel et al. (2011), com 22 amostras teciduais de papilomas invertidos nasais e nove amostras de carcinomas de células escamosas em seios paranasais de humanos, os autores pesquisaram proteínas marcadoras de apoptose como o p53, p21, p27, p63, por meio da imuno-histoquímica. Estes autores tinham como o intuito confirmar alterações moleculares nos papilomas invertidos e esclarecer o agente percussor das lesões carcinomatosas de células escamosas sinonasais. Houve marcações nucleares elevadas do p53 e p63, nas células das amostras de carcinoma, comparando com as amostras de papiloma, assim como o Ki67. Já o p21 e o p27 não demonstraram nenhuma variação significativa (ONCEL et al., 2011).

O gene p53, vem sendo ferramenta de estudo na Medicina Veterinária (TUREK; LANA, 2007). A expressão do p53, já foi observado no núcleo celular de amostras teciduais de adenocarcinomas nasais de cães, carcinomas de células

escamosas, adenocarcinomas de glândulas perianais (GAMBLIN; SAGARTZ; COUTO, 1997).

Com o intuito de avaliar alguns marcadores em neoplasias mamárias de cães, autores utilizaram 79 amostras parafinadas que foram divididas em dois grupos com 32 lesões benignas e 47 amostras malignas derivadas de células epiteliais. O p53 foi detectado em 16% dos tumores benignos e em 30,6% dos tumores malignos. No entanto, os autores, concluíram que apesar da imunoreatividade positiva, o marcador foi pouco específico, já que marcou nas amostras benignas, o que segundo os autores, em tumores mamários humanos, a imunoreatividade é específica nos tumores malignos. Os autores atribuíram este resultado ao tipo de anticorpo e técnica utilizada, e a detecção inespecífica da proteína p53 ou não tumorigênica (RUNGSIPIPAT et al., 1998).

Em estudo realizado por Campos et al. (2014) com carcinomas de tireoide de cão, os autores utilizaram o p53, COX-2 (ciclooxigenase 2), VEGF e glicoproteína P (gpP), além da tiroglobulina e da calcitonina, por meio de estudo imuno-histoquímico, em amostras de 74 animais, totalizando em 304 fragmentos parafinados. Além das amostras teciduais de tireoide, foram também avaliados linfonodos e sítios de metástase, cujo animais haviam sido submetidos a tireoidectomia ou eutanásia. Como resultado os autores, visibilizaram núcleos positivos para o p53 em todos os tecidos de neoplasia maligna, mas menos de 5% dos núcleos foram positivos nos tecidos avaliados, portanto, os autores não consideraram o p53 específico para estas amostras, ao contrário do VEGF e da COX-2, e dos demais marcadores que apresentaram imunoreatividade mais específica (CAMPOS et al., 2014).

2.1.5 Mediadores inflamatórios

As citocinas, produzidas pelos leucócitos inflamatórios, (BERHANE et al., 2002) e as prostaglandinas estão envolvidas durante o processo de carcinogênese, inclusive já foram descritas em casos de neoplasias intranasais de cães. Sua presença pode influenciar no tempo de sobrevivência destes animais, pois a resposta local é expressa de forma complexa por várias células em diversos graus de

atividade tornando fonte de pesquisas para a compreensão desta afecção inclusive seu tratamento (HOWE, 2007; VANKHERBERGHEN et al., 2009).

O ácido araquidônico apresenta papel regulador na chave da fisiologia celular durante a inflamação. É um ácido graxo de 20 carbonos, liberado a partir de fosfolipídios de membrana pela enzima fosfolipase A2, da qual é ativada por estímulos, que podem ser químicos, inflamatórios e miogênicos. Convertido pela prostaglandina G/H sintase citosólica, também denominada ciclooxigenase (COX), e em compostos intermediários como a prostaglandina G2 (PGG2) e a prostaglandina GH2 (PGH2) (ALMEIDA et al.; 2001; KUMMER, COELHO, 2002). Nos cães, são descritas ciclooxigenases COX-1 e COX-2 que modulam respectivamente respostas fisiológicas e síntese de mediadores inflamatórios (DE NARDI et al., 2005). Estas enzimas já foram observadas em amostras de epitélio nasal normal e em carcinomas intranasais de cães (BORZACCHIELLO; PACIELLO; PAPPARELLA, 2004). A isoforma COX-1 contribui principalmente para a produção imediata de prostaglandinas e é responsável pela homeostase, enquanto a COX-2 retarda a geração das prostaglandinas (GHOSH et al., 2010), sendo detectada nos tumores de forma mais expressiva, induzida por promotores tumorais, carcinógenos, citocinas e fatores de crescimento, que estimulam sua expressão em muitas neoplasias. Já a COX-1, é mais evidente em tecidos normais (BORZACCHIELLO; PACIELLO; PAPPARELLA, 2004; GHOSH et al., 2010). Comumente, não se detecta COX-2 nos tecidos normais ou sua expressão apresenta níveis muito baixos, mas sua produção pode ser induzida por mitógenos, hormônios e estímulos pró inflamatórios (BELSHAW et al., 2010).

Em Medicina Humana, são vários os trabalhos desenvolvidos tendo como base a pesquisa da expressão do marcador COX-2 em vários tipos tumorais como carcinomas e adenocarcinomas mamários, adenocarcinoma e carcinoma pulmonar, neoplasias colorretais, carcinoma nasofaríngeo, adenocarcinoma esofágico, entre outros (HUANG et al., 2015). Na Medicina Veterinária existem alguns estudos que avaliaram a expressão de COX-2 nos diferentes tumores caninos (KLEITER et al., 2004; IMPELLIZERI; ESPLIN, 2008; CAMPOS, et al, 2013; GUIMARÃES et al., 2014).

Em alguns tipos de neoplasia a participação da COX-2 pode ser mais significativa, como no caso dos tumores mamários malignos. Huang et al. (2015), pesquisaram COX-2, EGFR, CD-44 como marcadores tumorais, além do fator de transcrição Oct 3/4. Para esta avaliação, os autores utilizaram cultura de células de

24 amostras coletadas de 79 cães submetidos a mastectomia, das quais foram selecionadas e classificadas por estudo histopatológico. A expressão da COX-2 foi heterogênea e em níveis mais elevados nas neoplasias derivadas das células isoladas de tumores mais agressivos, o que sugere a participação da COX-2 na manutenção destas neoplasias. Quando se comparou a COX- 2, CD44, oct-3 /4, e a expressão do EGFR, a COX- 2 apresentou nível de expressão aumentada. Portanto, os autores concluíram que a COX-2 pode estar associada na iniciação e manutenção do tumor (HUANG et al., 2015).

No estudo de Impellizeri e Esplin (2008), em 24 amostras de neoplasia nasal, entre elas, carcinomas, adenocarcinomas e carcinomas de células escamosas, a expressão de COX-2 foi evidenciada em 95%, e localizada, principalmente, no citoplasma. A expressão da COX -2 já foi associada aos casos em que cães com neoplasia nasal não responderam adequadamente ao tratamento radioterápico, demonstrando imunomarcação em cerca de 80% dos 21 tumores diagnosticados como carcinomas, adenocarcinomas e carcinomas de células escamosas cutâneo (KLEITER et al., 2004). A forma de atuação da COX-2 na carcinogênese ocorre por meio de mecanismos como a angiogênese, a apoptose, a imunomodulação e a proliferação celular (RISHIKESHI; SADHANA, 2003) e, ainda, também possui a capacidade de elevar o VEGF (ORTONNE, 2003).

Belshaw et al. (2010), realizaram estudo retrospectivo em cães com 42 amostras, coletadas por rinoscopia, de carcinomas nasais tratados por radioterapia com o intuito de avaliar o prognóstico, pela marcação da COX-2, e por fim estabelecer escore para avaliação da COX-2. Os autores concluíram de acordo com os resultados, que 90% das amostras foram positivas para a marcação por COX-2. Em doze cães (28%) considerou-se marcação heterogênea, que foi considerada pelos autores como marcação em diferentes áreas da membrana celular das células tumorais, e estes animais demonstraram tempo de sobrevida de 222 dias contra os 189 dias de sobrevida daqueles que os autores consideraram a marcação homogênea ou seja em apenas um campo. Estes autores observaram marcação citoplasmática na maioria dos casos, no entanto, consideraram em algumas células a marcação nuclear. Os autores, não conseguiram correlacionar o estágio da doença com o escore da COX-2, estabelecido por eles. Campos et al. (2013) também observaram forte expressão deste anticorpo em uma amostra de adenocarcinoma papilar sinonasal em um cão.

2.2 Neoplasias nasais

As neoplasias malignas que acometem a cavidade nasal e seios paranasais de cães são extremamente invasivas, reicidivantes e de difícil controle ao tratamento (RASSNICK et al., 2006). Podem acometer as cavidades nasais e rapidamente estendem para os seios paranasais, levando ao quadro de afecção nasossinusal ou sinonasal, raramente promovem metástase.

2.2.1 Neoplasias intranasais e nasossinusais

De acordo com a literatura, os cães machos com idade média de 10 anos e de raças de médio a grande porte são os animais mais acometidos por esta afecção (LANA; WITHROW, 2001; COHN, 2014). Aproximadamente dois terços destas neoplasias são de origem epitelial como os carcinomas e seus subtipos, e o restante de origem mesenquimal, representado pelos sarcomas (MADEWELL et al., 1976; LANA; WITHROW, 2001; LEFEBVRE; KUEHN; WORTINGER, 2005; COHN, 2014). Os carcinomas compreendem cerca de 70% destas neoplasias, seguindo pelos adenocarcinomas, carcinoma de células escamosas e carcinomas neuroendócrinos. Dentre os sarcomas, são descritos osteossarcomas, condrossarcomas, fibrossarcomas e hemangiossarcomas. Não é incomum nesta região outros tipos histológicos classificados em Tumor Venéreo Transmissível, melanomas e linfomas. O mastocitoma também já foi descrito, porém é raro (PATNIAK, 1989; LANA; WITHROW, 2001; YOSHITOSHI, 2003; LANGOVA et al., 2004; SAKO et al., 2005).

Os tumores intranasais acometem mais as cavidades nasais, do que os seios paranasais. Estas neoplasias se estendem rapidamente para a região dos seios paranasais, e vice-versa. Os cães de conformação craniana do tipo dolicocefálico e mesaticefálico são mais afetados (LANA; WITHROW, 2001; MALINOWSKI, 2005; ELLIOT; MAYER, 2009). As neoplasias intranasais malignas são extremamente invasivas, ocasionam obstrução do fluxo aéreo e destruição óssea resultando em distrição respiratória e epistaxe (GIEGER et al., 2013). No início da afecção a ocorrência e ou diagnóstico clínico de metástase é detectada entre 0% a 12% dos

casos (RASSNICK et al., 2006), no entanto, alguns estudos referem o desenvolvimento de metástase pulmonar e linfonodal em pelo menos 46% de cães com carcinoma nasal com doença avançada (PATNIAK, 1989; RASSNICK et al., 2006).

2.2.2 Diagnóstico e estadiamento

Os animais acometidos por neoplasia nasal comumente apresentam, em seu histórico clínico, manifestações características de acometimento em região de cavidade nasal como a ocorrência de secreção nasal unilateral ou bilateral intermitentes, acompanhadas de episódios de epistaxes e esternutações, e muitas vezes deformidade facial. Estas manifestações clínicas estão associadas ao curso da doença, da qual na maioria dos casos ocorre de forma progressiva e rápida. Dificuldade e/ou desconforto respiratório é frequente, principalmente durante a inspiração, acompanhada de ruídos respiratórios, engasgos e tosse. Conforme evolução do tumor, é freqüente o surgimento de deformidade facial, epífora, aumento de volume periorbital e desvio do globo ocular com atrofia muscular na região do crânio. Pode ocorrer o surgimento de manifestações neurológicas como convulsões conforme a extensão ou localização tumoral (LANA; WITHROW, 2001; GIEGER et al., 2013; COHN, 2014). As manifestações clínicas são pouco evidentes no início da doença, o que pode retardar o diagnóstico permitindo o avanço do tumor (MALINOWSKI, 2005). Durante a anamnese, é possível obter tais informações (McCARTHY, 2005; VENKERVAN HAAGEN, 2005). Ao exame físico observa-se a ocorrência de descarga nasal de, além da presença de crostas, lesões epiteliais, dor à palpação, ulcerações, despigmentação nas narinas, distorção das superfícies nasais e deformação facial. Alguns animais permitem a inspeção da cavidade oral, o que possibilita avaliar se há aumento de volume em região do palato ou maxila, indicando a progressão da afecção para a cavidade oral (NOONE, 2001; DAVIDSON et al., 2004; MCCARTHY, 2005; VENKERVAN HAAGEN, 2005; AULER; ANDRADE NETO; YOSHITOSHI, 2014). A anestesia geral é necessária, para a realização dos exames de imagem e a rinoscopia. Portanto, indica-se a realização prévia de hemograma completo, perfil bioquímico e avaliação cardiológica. Deve-se também

considerar a possibilidade de sangramento, principalmente durante a coleta de biópsia, sendo indicado realização de perfis de coagulação e reação cruzada caso haja a necessidade de uma transfusão sanguínea (NOONE, 2001; DAVIDSON et al., 2004).

2.2.2.1 Exames de imagem

O exame radiográfico da região cabeça é rotineiramente utilizado na Medicina Veterinária como auxílio no diagnóstico dos casos de afecções nasais e ou nasossinusais, devido suas principais vantagens como acessibilidade, rapidez, baixo custo, e em grande parte dos pacientes é possível sua realização sem requerimento de anestesia. Estas vantagens permitem que este seja um dos procedimentos mais indicados como método diagnóstico prévio nos casos suspeitos de afecção nasal, entretanto, não o torna exame de excelência diagnóstica, pois a interpretação radiográfica da cavidade nasal e das estruturas circundantes muitas vezes é prejudicada pela sobreposição de imagens, posicionamento inadequado do cão, além da variabilidade racial e estrutural do crânio destes animais (MYER, 1994; DOUST; SULLIVAN, 2004; DAVIDSON et al., 2004; POWDER; ROSE; CRAWFORD, 2006; DAVIDSON et al., 2004; LEFEBVRE; KUEHN; WORTINGER, 2005; ASHBAUGH, 2013; AULER et al., 2014)

Já a tomografia computadorizada de cabeça (TCC), além de excelente ferramenta diagnóstica, vem também, há algum tempo, sendo indicada para avaliar o estadiamento do curso de afecções neoplásicas, auxiliando na escolha da modalidade terapêutica e sugerindo o prognóstico (LEFEBVRE; KUEHN; WORTINGER, 2005; ADAMS et al., 2009; AULER et al., 2015), principalmente em casos de câncer na região de cabeça e pescoço.

Para avaliar a extensão de tumores intranasais e sinonasais, já foram descritos alguns sistemas de estadiamento em cães, associando o emprego da TCC em conjunto com exame radiográfico, para avaliação do tempo de sobrevida destes animais (ADAMS et al., 1998; KONDO et al., 2008; ADAMS et al., 2009).

Em 1993, foram propostas as primeiras duas classificações, em conjunto com o sistema TNM (Estadiamento de Tumores Malignos) proposto pela World Health

Organization (WHO) (OWEN, 1980), principalmente, para tratar dos fatores prognósticos, do qual até então, não havia sido citado nenhum sistema de estadiamento específico na literatura, nem mesmo para pacientes humanos. O estadiamento de tumores intranasais ou intraparanasais, iniciou-se por meio de imagens radiográficas, onde Théon et al. (1993) avaliou imagens de 77 cães acometidos por tumores malignos intranasais, que seriam submetidos, posteriormente, ao tratamento de radioterapia. Os estágios foram classificados em: S1 onde as imagens radiográficas apresentavam lesões sugerindo acometimento nasal uni ou bilateral, sem a extensão para os seios frontais; e em S2 para aqueles com alterações como acometimento bilateral com extensão aos seios frontais.

Com a introdução da tomografia computadorizada, outro estudo baseado no sistema TNM - WHO (OWEN, 1980), em conjunto com outro estadiamento realizado em humanos com câncer maxilar (WILLAT et al., 1987), foi proposto por Adams et al. (1998). Tratava-se de avaliar a eficiência do protocolo radioterápico empregado. As imagens obtidas por meio da TCC de 21 cães com neoplasias nasais foram utilizadas para avaliar o estadiamento da afecção, onde o estágio (1) foi considerado em animais com lesão tumoral unilateral em cavidade nasal seio paranasal e frontal sem envolvimento ósseo em turbinados; estágio (2) presença de envolvimento ósseo sem envolvimento de órbita, com a presença de efeito de massa no subcutâneo ou submucoso; estágio (3) presença de envolvimento de órbita, além das demais características. Incluiu-se o estágio (4) caracterizado pela extensão tumoral para a nasofaringe e ou osteólise em placa cribiforme, o que tornou o estadiamento mais específico. A avaliação do estadiamento clínico destes cães apresentou resultados significativos quanto a sobrevivência baseada no estágio da doença, mas foi pouco correlacionado aos fatores prognósticos.

Kondo et al. (2008) através de um estudo retrospectivo, com o intuito de avaliar o prognóstico, propuseram um sistema de estadiamento com seis parâmetros, relacionando as alterações visibilizadas por meio da TCC com o prognóstico comparando com o sistema TNM-WHO (1980). Os autores utilizaram categorias semelhantes as descritas na literatura por outros autores, porém, incluíram o envolvimento a nível cerebral. Estes autores classificaram como estágio (I) invasão do tumor bilateral em cavidade nasal e seio paranasal; (II) destruição óssea, e efeito massa em plano nasal ou face; (III) envolvimento da cavidade oral com destruição do palato; (IV) envolvimento orbital com compressão do globo

ocular; (V) envolvimento do seio frontal; e (VI) envolvimento cerebral com destruição óssea ou acometimento de placa cribiforme, e invasão tumoral em tecido cerebral. No estudo de Kondo et al. (2008) de acordo com os resultados, dentre os 112 cães avaliados, em nove anos, com neoplasia nasal, apenas 16% (n=18) foram classificados como estágio (I), 22 animais estágio (II), 32 animais estágio (III) e 40 estágios (IV). O prognóstico nos animais com duas ou mais alterações nas imagens tomográficas, principalmente no estágio II juntamente com estágio III foi melhor do que aqueles pacientes que apresentaram uma ou mais destas alterações somadas ao envolvimento cerebral (KONDO et al., 2008). O estadiamento, por meio da tomografia, proposto por estes autores, demonstrou maior acurácia, quando comparado ao sistema TNM - WHO (OWEN, 1980).

Adams et al. (2009), realizaram outro estudo prospectivo de 94 cães com tumores intranasais, seguindo a hipótese de que a extensão da neoplasia, visibilizada pela TCC, seu tipo histológico e o grau de invasão, estariam afetando a eficiência da radioterapia. Neste estudo, o estadiamento, já proposto pelo autor em 1998, é novamente modificado, onde inclui-se as lesões visibilizadas como fatores prognósticos. Então, comparou-se os sistemas classificatórios já descritos em outros estudos, e dois estágios foram reformulados e adicionados ao estudo. No estágio (3) a extensão tumoral para nasofaringe se manteve, e apenas no estágio (4) adicionou-se a presença de análise em placa cribiforme pela neoplasia. Como fatores prognósticos o método modificado apresentou resultado mais significativo, quando aplicado em conjunto com diagnóstico histopatológico, e também, maior sensibilidade se comparado aos sistemas descritos anteriormente. Além do exame tomográfico, outros métodos diagnósticos também foram sugeridos pelos autores, no intuito de auxiliar ainda mais no estadiamento da doença, como o exame radiográfico do tórax, a avaliação anatomopatológica do material coletado da cavidade nasal e de linfonodos regionais coletado por aspiração ou biópsia (ADAMS et al., 2009).

Baseado no estadiamento de Adams et al. (1998) e Geiger et al. (2013) avaliaram dados de seis instituições, totalizando 55 animais, entretanto, foram selecionados 37 animais com carcinoma nasal, onde 26 cães tinham sido submetidos à TCC (n=25) e ressonância magnética (n=1). Observaram em seus resultados 23% classificados como estágio 1 (n=6), 11% como estágio 2 (n=3), 7% no estágio 3 (n=2) e os restantes 60% no estágio 4 (n=15).

Mason et al. (2013), basearam-se no sistema de Adams (2009) para avaliar o estágio da afecção em 78 cães acometidos por neoplasia intranasal, por meio da TCC. Os resultados demonstraram que nenhum destes animais foram classificados como estágio 1, sendo 13% (10/76) classificados como estágio 2, três animais, ou seja 4% como estágio 3, os demais 24% (18/76) como estágio 3a, e finalmente, os 59% (45/76) restantes como estágio 4, portanto, classificou-se entre os estágios 3, 3a ou 4 dos 76 cães (87%). O levantamento dos casos, de quatro anos, com as imagens tomográficas de 76 cães, incluiu dados de cães de raças, sexo e idade variadas e com neoplasias epiteliais e mesenquimais, para avaliar o estágio da afecção os autores também utilizaram o estadiamento proposto por Adams (2009), porém, os autores subdividiram o estágio 3 em 3a, onde avaliou-se o acometimento de nasofaringe separadamente.

Apesar da tomografia computadorizada ser ferramenta diagnóstica de grande representação para o diagnóstico de neoplasias intranasais, a rinoscopia com a coleta de biópsia é ainda o método definitivo para a conclusão destes casos (McCARTHY, 2005; PIETRA et al., 2010; ASHBAUGH, 2013; HARRIS et al., 2014).

2.2.2.2 Rinoscopia

A rinoscopia é rotineiramente empregada na Medicina Veterinária como método diagnóstico das diferentes afecções nasais, principalmente quando não se conclui o diagnóstico apenas pelos exames físico, de imagem e complementares (FORD, 1990; ELIE; SABO, 2006). Possibilita a confirmação da existência de lesão suspeita, previamente visibilizada pelos exames de imagem (McCARTHY, 2005; PIETRA et al., 2010). A rinoscopia o exame que inspeciona, por meio de equipamento específico, diretamente as cavidades nasais e nasofaringe (Figura 1). Esta visibilização direta diferencia lesões das estruturas comuns inerentes à cavidade nasal, tornando esse método diagnóstico especificamente indicado para o diagnóstico de diferentes tipos de afecção nasal.

Figura 1 - Imagens de rinoscopia de cão

Fonte: (AULER, F.A.B. 2012)

Legenda: (A) Rinoscopia anterior onde se observa proliferação tecidual em cavidade nasal esquerda acometendo meato nasal comum médio, (B) Nasofaringoscopia onde se observa presença de proliferação tecidual bilateral em coanas na região de nasofaringe.

Esta técnica pode ser dividida em rinoscopia anterior e posterior, respectivamente (Figura 1), caracterizada por meio do acesso rostral à cavidade nasal permitindo a visibilização e inspeção do septo nasal, meato nasal comum dorsal, médio, ventral e as conchas nasal dorsal, ventral e os etmoturbinados, onde dependendo do tipo constitucional do paciente possibilita o acesso à nasofaringe, no entanto, na maioria dos casos a inspeção desta região requer o acesso cauda, posterior ou nasofaringoscopia, da qual permite a visibilização direta da nasofaringe, e coanas pela técnica de retroflexão do endoscópio flexível (WILLARD; RADLINSKY, 1999; DAVIDSON et al., 2004; McCARTHY, 2005).

Equipamentos de endoscopia de fibra óptica rígida ou flexível podem ser aplicados para realizar o exame de rinoscopia anterior, entretanto, o diâmetro do equipamento deve ser adequado para adentrar as cavidades nasais e nasofaringe (McCARTHY; McDEIRMAN, 1990; FORBES LENT; HAWKINS, 1992; DAVIDSON et al., 2004; ELIE; SABO, 2006; PIETRA et al., 2010).

O objetivo do procedimento é observar a ocorrência de secreção, e sua característica, assim como a presença de inflamação em conchas nasais, e ou pólipos, proliferações teciduais (Figura 1), corpos estranhos, placas fúngica e outras

alterações significativas. Considera-se qual a região acometida, e se há envolvimento uni ou bilateral (WILLARD; RADLINSKY, 1999; NELSON; COUTO, 2001; NOONE, 2001; McCARTHY, 2005; VENKERVAN HAAGEN, 2005). A coleta de material é realizada durante o procedimento endoscópico de forma direta e minimamente invasiva, pois é realizado sob orientação visual (McCARTHY; McDEIRMAN, 1990; DAVIDSON et al., 2004; VENKERVANHAAGEN, 2005; AULER et al., 2015).

As formações tumorais possuem diferentes formatos, e são facilmente distinguíveis das estruturas comuns da cavidade nasal (Figura 1). Apresentam diversa colorações, tamanho e superfície variada, o que não possibilita distinguir ou classificar o tipo tumoral (MALINOWSKI, 2005; McCARTHY, 2005). É comum a presença de secreções de aspecto mucoso, purulento, seroso ou sanguinolento, recobrando as neoplasias, e, ainda, podem estar presentes, coágulos, fibrina, além de necrose e inflamação ao redor da neoformação (McCARTHY, 2005; VENKERVANHAAGEN, 2005; PIETRA et al., 2010).

2.2.2.3 Biópsia e estudo histopatológico

Os exames de imagem e a rinoscopia complementam-se para diagnóstico, mas até o momento, por não serem inteiramente conclusivos, sem a biópsia não se descarta o estudo histopatológico da amostra tecidual coletada (WITHROW 2007; AULER et al., 2015). A biópsia pode ser adquirida por meio de diversas técnicas descritas na literatura, que diferenciam as neoplasias nasais. Usualmente são utilizadas técnicas de coleta indiretas e diretas. As técnicas indiretas mais comuns são a hidro propulsão nasal (ASHBAUGH, 2013), curetagem transnasal realizada por meio de seringa e agulha ou cureta sem visualização, aspiração por agulha fina ou “*punch*” de aumentos de volume faciais. Dentre as desvantagens dos métodos indiretos, a principal é a falta de visibilidade do local, o que pode resultar em amostras pouco representativas com diagnóstico inconclusivo, além do risco de lesões iatrogênicas. As técnicas diretas são realizadas por meio da rinoscopia e da rinotomia, da qual apresenta maior taxa de morbidade e mortalidade, quando comparada com a rinoscopia (McCARTHY; McDEIRMAN, 1990; NOONE, 2001).

Como a rinoscopia possibilita a visualização direta da lesão, o procedimento torna-se mais apropriado e freqüentemente permite obter quantidade suficiente de material de lesões proliferativas presentes na cavidade nasal e ou nasofaringe para estudo histológico (FORD, 1990; AULER et al., 2015). No entanto, a biópsia coletada por meio deste método pode ocasionar sangramento considerável com dificuldade para hemostasia completa, o que prejudica a coleta de mais amostras durante o mesmo procedimento, resultando em amostras pouco representativas. A presença de processos inflamatórios e necróticos, que geralmente acompanham estas neoplasias (FORD, 1990; DAVIDSON et al., 2004; McCARTHY, 2005; VENKERVAN HAAGEN, 2005), também podem dificultar a interpretação histopatológica conclusiva, necessitando novas coletas (AULER et al., 2015). A restrição de espaço da cavidade nasal, também, prejudica a coleta de material (DAVIDSON et al., 2004; McCARTHY, 2005; MILES et al., 2008; AULER et al., 2015).

2.2.3 Tratamento

Existe uma variedade de tratamentos descritos na literatura para neoplasias intranasais ou sino nasais incluindo cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou a combinação destes (LANA; WITHROW, 2001; SONES et al., 2012). A rinotomia não apresenta diferença significativa, quando utilizada, pois envolvimento destrutivo ósseo está presente na grande maioria dos casos de neoplasia intranasal, o que dificulta a remoção de margens livres de tumor. O tratamento cirúrgico quando empregado isoladamente é raramente curativo (LANA; WITHROW, 2001). Em estudo realizado com 16 cães com neoplasias intranasais variadas, sem tratamento, o tempo de sobrevida médio foi de 10,5 semanas ou dois meses e 40 dias, desde o início das primeiras manifestações clínicas (MORRIS et al., 1994).

A radioterapia é considerada o tratamento mais eficaz nestes casos, podendo ser utilizada, isoladamente ou juntamente com o procedimento cirúrgico aumentando a sobrevida entre oito a 25 meses, dependendo do protocolo (LANA; WITHROW, 2001; TUREK; LANA, 2007; ELLIOT; MAYER, 2009). Em outro estudo com 139 cães, o tempo de sobrevida sem nenhum tratamento, variou entre sete a 1114 dias, sendo a média de 95 dias (RASSNICK et al., 2006).

Alguns protocolos quimioterápicos, como no caso da cisplatina, administrado isoladamente, demonstrou benefícios no tratamento destes pacientes, onde 27% de onze cães demonstraram melhora clínica, mas ainda com sobrevida de cinco meses (HAHN et al., 1992). Em outro estudo, utilizando doxorrubicina em conjunto com carboplatina e piroxicam, como tratamento em oito cães com neoplasia maligna, demonstrou-se eficiência, havendo remissão completa do quadro em 50% dos casos, remissão parcial em 25% e melhora na qualidade de vida dos outros 25% (LANGOVA et al., 2004). Outro protocolo quimioterápico descrito, que demonstrou eficácia, foi a associação do inibidor de tirosina quinase em conjunto com o inibidor de COX-2 (piroxicam) no tratamento de carcinoma de células escamosas em seio frontal, porém, foi descrito em apenas um cão, o que torna-se necessário outros estudos deste protocolo em mais animais (DE VOS; RAMOS VEGAS; NOORMAN; DE VOS, 2011). Outros tratamentos como imunoterapia, crioterapia e terapia fotodinâmica, também são indicados (TUREK; LANA, 2007). As neoplasias malignas, por serem extremamente invasivas, tornando o estado clínico crítico quando sua localização é próxima aos bulbos oculares e cérebro, muitas vezes a eutanásia se torna a escolha do proprietário, devido a qualidade de vida ruim e limitada (LANA; WITHROW, 2001; TUREK; LANA, 2007; ELLIOT; MAYER, 2009).

3 OBJETIVO

O objetivo do trabalho é o de avaliar o efeito dos tratamentos quimioterápicos adjuvoriamente ou não ao procedimento cirúrgico nos cães com neoplasias nasais e sinonasais malignas, no que concerne ao tempo de remissão e sobrevida global, correlacionando com:

- ✓ Influência da idade, sexo, características clínicas e tipo tumoral;
- ✓ Graduação da afecção por meio de exame tomográfico;
- ✓ Presença e expressão dos marcadores tumorais COX-2, EGFR, VEGF, p53, Ki67 e PCNA

4 JUSTIFICATIVA

Devido a agressividade desta afecção que leva a qualidade de vida ruim com pouco tempo de sobrevida, o tratamento ou controle desta afecção se torna justificativa deste estudo, com o intuito de adquirir aumento do tempo sobrevida destes animais, principalmente pelo crescente número de casos na rotina clínico-cirúrgica veterinária. Outras informações relevantes são: a importância do estadiamento tomográfico, a expressão dos marcadores tumorais no que concerne a determinação do prognóstico dos pacientes acometidos e a influência no tempo de sobrevida, trazendo novas informações para o campo da oncologia veterinária.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram observados 54 animais da espécie canina, com idade e sexo variados, durante o período de 01/02/12 a 01/02/15 provenientes da rotina do Hospital Veterinário (HOVET) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ - USP) e encaminhados para o Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do Departamento de Cirurgia, com manifestações clínicas traduzidas em secreção nasal uni ou bilateral, esternutações com sangue, epistaxe, distrição respiratória e ou deformidade facial, sendo encaminhados para o Serviço de Diagnóstico de Imagem do Departamento de Cirurgia a fim de serem submetidos a exames radiográficos de cabeça e tórax, e de tomografia computadorizada de cabeça, e submetidos ao exame de rinoscopia com coleta de biópsia. Sendo inseridos no protocolo da pesquisa 25 pacientes (n=25) com resultado positivo para neoplasias malignas epiteliais ou mesenquimais, diagnosticados por meio da avaliação histopatológica, foram acompanhados até 01 de agosto de 2015 para obtenção dos dados a respeito da evolução do quadro clínico dos mesmos.

5.2 Critérios de inclusão e exclusão

Cães portadores de formação nasal e nasossinusais e sem tratamento quimioterápico anterior participaram da pesquisa, enquanto que foram excluídos animais que apresentassem afecções neoplásicas concomitantes ou contra-indicações como insuficiência renal e cardiopatia severa para a aplicação de quimioterapia. Tampouco, não foram submetidos a intervenção cirúrgica, pacientes com evidência de metástase pulmonar ou sinais relacionados à doença avançada (Fluxograma 1).

Fluxograma 1 – Descrição da inclusão dos cães no tratamento quimioterápico e cirúrgico

Fonte: (AULER, F. A. B. 2015)

5.3 Anestesia

Todos os animais foram submetidos à anestesia geral, conforme protocolos preconizados pelo Serviço de Anestesia do Departamento de Cirurgia junto ao Hospital Veterinário da FMVZ-USP (ASA I a IV), além de oxigenação e monitoração cardiovascular e respiratória, a fim de evitar riscos anestesiológicos durante os procedimentos de rinoscopia, tomografia computadorizada da cabeça, e nos casos em que se realizou a rinotomia. Os animais permaneceram com intubação oro traqueal durante os procedimentos ora referidos.

Para sedação utilizou-se acepromazina¹ na dose de 0,03 miligramas (mg) por quilo de peso (kg) e cloridrato de meperidina² 4mg/kg via intramuscular (IM). Na indução anestésica propofol³ na dose de 5mg/kg por via intravenosa (IV) e para manutenção anestésica, foi utilizado aparelho de anestesia inalatória⁴ com isoflurano⁵ como agente anestésico

5.4 Exames de imagem

Para realização dos exames radiográficos de cabeça e tórax utilizou-se aparelho de radiografia digital^{6,7} com técnica radiográfica utilizada de alto contraste, ou seja, alto mA (miliampères) e baixo kV (quilovoltagem), ajustados de acordo com o tamanho do animal e níveis adequados para cavidade nasal e tórax. Para pesquisa de metástase pulmonar, utilizou-se decúbito látero- lateral bilateral e ventro- dorsal, projeção dorso-ventral. As mesmas projeções foram empregadas para avaliação da cavidade nasal para a projeção.

O exame tomográfico da cabeça foi empregado para avaliar-se a região das cavidades nasais, seios paranasais e linfonodos retrofaríngeos, sendo realizado no Serviço de Diagnóstico por Imagem do Departamento de Cirurgia junto ao HOVET da FMVZ-USP. Estas imagens foram obtidas com auxílio do tomógrafo helicoidal⁸ “single slice” e a técnica tomográfica empregada foi de 120 kV, 150 mA e 1 segundo de tempo de aquisição de dados, com limitação de corte de 3,0 milímetros (mm) para 1,5mm de incremento, utilizando janela e níveis adequados para cavidade nasal. Aplicou-se como contraste por via intravenosa Iohexol⁹ de na concentração de 300 miligramas de iodo (mgI) e na dose de 1,5 a 2,0 mililitro (ml) por quilograma (kg), em cães que não apresentaram contra-indicação para sua aplicação. Para a realização da tomografia computadorizada, posicionou-se o paciente em decúbito esternal sem angulação.

1. - Acepram 0,2%® - Vetnil
2. - Dolosal ® 50mg/ml- Cristália
3. - Diprivam® - Astrazeneca
4. - Shogun - Takaoka® - Brasil
5. - Forane® - Abbot
6. - Modelo RT 500/125 - Ray-Tec 500mA 125 kV
7. - Modelo TD500 HF - Techno Design 500 mA 125 kV
8. - Tomógrafo Xpress/GX - Toshiba®
9. - Ominipaque 300mg® – GE Health Care do Brasil

5.5 Estadiamento tomográfico

A classificação do estadiamento foi estabelecida após a soma de uma ou mais alterações visibilizadas por meio do exame tomográfico baseado na classificação do sistema de estadiamento proposto por Adams (ADAMS et al., 2009), modificado por nós, para o presente estudo, onde os animais foram classificados como:

- T1 - Acometimento unilateral em cavidade nasal, unilateral em recesso maxilar ou seio frontal; lise óssea apenas em região de turbinados;
- T2 – Presença de lise óssea além dos turbinados; sem envolvimento de órbita ou sem presença massa em subcutâneo ou em submucosa; além de acometimento uni ou bilateral em cavidade nasal;
- T3 - Envolvimento da órbita; ou nasofaringe; ou presença de massa em subcutâneo; além de acometimento uni ou bilateral em cavidades nasais e ou em região de seios paranasais e lise;
- T4 - Lise em placa cribiforme; em conjunto com uma ou mais alterações descritas acima;
- T5 - Envolvimento cerebral; e uma ou mais lesões descritas acima;

Avaliou-se também a ocorrência de comprometimento de linfonodos submandibulares regionais, por meio do exame tomográfico, utilizando classificação elaborada por nós como:

- N0 - Sem envolvimento
- N1 – Aumento epitelial
- N2 - Heterogêneo

5.6 Rinoscopia

A rinoscopia foi realizada empregando-se o aparelho endoscópio rígido¹⁰ de 4,0 mm de diâmetro externo e 30 cm de comprimento total e campo de visão de 30° com sistema de amplificação de imagem, autoclavável, com camisa endoscópica¹¹ para proteção da ótica, e acoplado a sistema de captura e digitalização de imagens. Para realização da nasofaringoscopia em animais de pequeno porte, utilizou-se fibroendoscópio flexível¹² de 3,1 mm de diâmetro externo e 8,5 cm de comprimento total e campo de visão de 90°, e em cães de médio e grande portes, utilizou-se fibroendoscópio flexível¹³ com ângulo de visão de 140 graus e diâmetro externo de 9.8mm, e videoendoscópio¹⁴ acoplados a processadora¹⁵ e fonte de luz¹⁶.

O procedimento endoscópico confirmou a presença de proliferação tecidual e possibilitou a coleta de material para análise histopatológica. Os pacientes foram posicionados em decúbito lateral ou esternal com boca aberta e fixada por artefato específico durante a avaliação da nasofaringe. Para esta utilizou-se o endoscópio flexível inserido na cavidade oral com sua ponta pré-angulada dorsalmente cerca de 180°, caudal ao palato mole, e posicionado para a visualização das coanas, septo nasal, etmoturbinados, palato duro e parede da nasofaringe.

Após realizada a rinoscopia posterior, quando em decúbito lateral, houve mudança no decúbito do paciente para esternal para avaliação rostral das cavidades nasais. Antes da inserção do aparelho, inspecionou-se plano nasal e cavidade oral. Primeiramente, examinou-se o lado direito, após medir a distância entre as narinas e o canto medial do olho para evitar a penetração da placa cribriforme. A inserção do aparelho ocorreu a partir do meato nasal comum, avançando para o meato nasal comum dorsal e meato nasal comum ventral, divididos entre região anterior, média, posterior e suas limitações pelo septo nasal, concha dorsal, maxiloturbinados e etmoturbinados.

10 - Hopkins ® Telescope 30° - Karl Storz GmbH&Co - projeto FAPESP 2013/12113-4

11 - Camisa endoscópica - Karl Storz GmbH&Co - projeto FAPESP 2013/12113-4

12 - Broncoscópio LFDP – Olympus®

13 - Endoscópio XQ10 - Olympus®

14 - Videogastrosκόpio GIF-H180 - Olympus®

15 - Processadora CV180, linha Evis Exera II, Olympus®

16 - Fonte de Luz CLV180, linha Evis Exera II, Olympus®

Além dos aparelhos endoscópicos, utilizou-se pinça fórceps flexível, pinça rígida para biópsia e aspirador cirúrgico e outros equipamentos que compõe o uso do endoscópio rígido e dos fibroendoscópio, como fonte de luz fria de xênon 175w¹⁷, cabo de fibra óptica¹⁸ unidades de controle de câmera¹⁹, unidade de cabeça de câmera²⁰, monitor²¹ e impressora de fotos²².

Os endoscópios seguiram os padrões de lavagem e esterilização conforme as orientações do fabricante e lubrificados por uma solução salina estéril antes de adentrar a cavidade oral e nasal. Animais que apresentaram secreção copiosa, foram submetidos à lavagem com solução fisiológica e aspiração através de sonda uretral estéril para melhorar a visibilização, além de aplicação, por via tópica de vasoconstritor na tentativa de diminuir o edema e propiciar melhor visibilidade, assim como, nos casos de rinorragia ou hemorragia após coleta de biópsia.

5.7 Quimioterapia

As sessões de quimioterapia, foram realizadas em todos os cães, independente se portadores de neoplasia de origem epitelial ou mesenquimal, sendo realizado o mesmo protocolo quimioterápico, onde administrou-se a carboplatina²³ 300mg/ m² por via intravenosa e doxorubicina²⁴ 30mg/ m² via intravenosa, a cada 21 dias entre duas a dez sessões.

O protocolo quimioterápico foi realizado de acordo com as condições clínicas do paciente e adesão do proprietário ao tratamento. Em casos onde não havia contra-indicação, como insuficiência renal ou afecções gastrointestinais, prescreveu-se como anti-inflamatório o piroxicam²⁵ na dose de 0,3 mg/kg via oral uma vez ao dia. Seu uso foi descontinuado nos pacientes em que se observou efeitos colaterais secundários a administração da medicação como alterações renais, vômito e diarreia. Naqueles pacientes com a afecção em estágio avançado, onde não responderam satisfatoriamente ao piroxicam, foi prescrito anti-inflamatório esteroidal²⁶, na dose de 1 a 2 mg/kg via oral uma vez ao dia.

O uso de antibiótico também foi indicado naqueles nos animais que apresentaram infecção secundária pós quimioterapia ou sinusites, rinites ou infecção em cavidade oral devido a presença do tumor, sendo prescrito amoxicilina com

27 - Amoxicilina com clavulanato de potássio genérico - ache

28 - Metronidazol genérico - Md Saúde

29 - Transamin® - Nikho

clavulanato de potássio²⁷ na dose de 20mg/kg via oral a cada 12 horas durante 10 a 15 dias, com ou sem associação do metronidazol²⁸, na dose de 25 mg/kg uma vez ao dia durante sete dias.

Outros medicamentos foram prescritos como ácido tranexâmico²⁹ na dose de 10 a 15mg/kg, com o intuito de diminuir episódios de rinorragia e epistaxe, além de serem prescritos outras medicações para controlar os efeitos colaterais dos quimioterápicos aplicados, como exemplo analgésicos, protetores gástricos, suplementos vitamínicos e antieméticos. Os pacientes foram submetidos a coleta de sangue para realização de hemograma completo antes de cada sessão quimioterápica e submetidos ao método desde que aptos a recebê-lo.

5.8 Técnica cirúrgica

A técnica cirúrgica empregada nos animais em que não responderam ao tratamento quimioterápico ou com piora do quadro, foi a rinotomia. Nos animais com deformidade facial em plano nasal realizou-se abordagem dorsal, em decúbito esternal, e incisão na pele acompanhando a linha mediana dorsal, a partir da face caudal do plano nasal até o canto medial da órbita, seguida, de incisão do tecido subcutâneo e periósteo. Após, quando necessário incizou-se o tecido ósseo proposto adentrando-se a cavidade nasal na curetagem do material tumoral. Nos animais com acometimento apenas em palato, realizou-se rinotomia com abordagem ventral, com incisão cirúrgica em palato duro sob a massa tumoral seguindo padrões clássicos da técnica.

A sutura dos tecidos foi realizada com ponto simples separado com fio não absorvível, assim como a pele ou mucosa com pontos simples separados utilizando fio não absorvível monofilamentoso. Em todos os casos em que houve necessidade, foi prescrito medicamentos para o controle da dor destes animais.

27 - Amoxicilina com clavulanato de potássio genérico - ache

28 - Metronidazol genérico - Md Saúde

29 - Transamin® - Nikho

5.9 Avaliação da resposta ao tratamento

Os cães foram avaliados relativamente às características clínicas, resposta ao tratamento e o tempo de remissão da doença a partir da 1ª quimioterapia. Aqueles que não responderam ao tratamento quimioterápico entre a primeira e a segunda sessão de quimioterapia ou que demonstraram piora ao longo do tratamento quimioterápico, foram submetidos ao procedimento cirúrgico (Fluxograma 2).

Fluxograma 2 – Descrição da inclusão dos cães no tratamento quimioterápico e cirúrgico.

Os animais foram acompanhados durante todo o período de tratamento quimioterápico e pós-cirúrgico, quando realizado, até o óbito, sendo reavaliados a cada 21 dias. A remissão parcial ou controle da afecção foi considerada naqueles cães que apresentaram melhora clínica significativa nas manifestações, inclusive com diminuição visível do aumento de volume em plano nasal, se existente, quando submetidos ao protocolo quimioterápico e ou cirúrgico, até a recidiva. Nos casos de recidiva ou piora do padrão respiratório e qualidade de vida, foi realizado novo procedimento cirúrgico.

5.10 Imuno-histoquímica

O estudo imuno-histoquímico foi realizado no Laboratório de Patologia Morfológica e Molecular do Departamento de Patologia da FMVZ-USP. Para sua realização utilizou-se lâminas com cortes histológicos na espessura de 5,0 micrômetros (μm) de amostras coletadas por meio da rinoscopia e já com resultado histopatológico confirmado para neoplasia maligna de cavidade nasal de cão. Estas amostras, quando coletadas, foram conservadas em solução de formol a 10%, por 24 horas, posteriormente conservadas em álcool a 90%, e por fim, emblocadas em parafina pelo Serviço de Patologia da FMVZ/USP. Os cortes foram realizados pelo Serviço de Patologia de Faculdade de Medicina da USP e aderidos em lâminas sinalizadas.

Todas as lâminas foram submetidas aos procedimentos convencionais de desparafinização e hidratação por meio de soluções de xilol e álcoois e posteriormente foi realizado a recuperação antigênica ou desmascaramento dos cortes com solução tampão específica para cada anticorpo. Para todos os anticorpos realizou-se a lavagem dos cortes que foram incubados em câmara úmida, com os anticorpos primários (Quadro 1), diluídos nos títulos adequados em solução diluente (1% de albumina bovina-BSA e 0,1% azida sódica (NaN_3) em PBS (phosphate buffer saline sem tween), sendo aplicado 100 μl (microlitros) desta solução sob cada corte.

Após overnight a 4°C, novas lavagens com PBS foram realizadas, adicionou-se 100µl de polímero³⁰ em cada corte, como segundo anticorpo, e posteriormente realizou-se a incubação em câmara úmida na estufa a 37° (graus Celsius). Com o intuito de evidenciar as células positivas, utilizou-se solução de diaminobenzidina (DAB)³¹ durante cinco minutos, e em seguida novas lavagens foram realizadas, seguindo para contra-coloração com hematoxilina. Por fim, após lavagens, desidratação e diafinização por meio de processos convencionais, foi feita a montagem das lâminas para avaliação.

Quadro 1 - Descrição dos marcadores tumorais utilizados no estudo

Anticorpo	Tipo	Clone	Origem	Diluição	Fabricante	Código
Anti-VEGF	Policlonal	A-20	Coelho	1:200	Santa Cruz	GO512
Anti- EGFR	Policlonal	ab2430	Coelho	1:200	Abcam	GR1546532
Anti- COX- 2	Policlonal	4842S	Coelho	1:200	Cell Signaling	5082013
Anti-PCNA	Monoclonal	PC-10	Camundongo	1:2000	Dako	MO87901-2
Anti-Ki67	Monoclonal	MIB-1	Camundongo	1:100	Dako	MT24001-2
Anti-p53	Monoclonal	Pab -240	Camundongo	1:100	Abcam	GR161418-1

Fonte: (AULER, F. A. B. 2015)

Para cada anticorpo foram realizados protocolos, diversificados com diferentes soluções tampão e tempo de incubação do anticorpo secundário. Lâminas como controle negativo também foram inseridas em cada processo de imunohistoquímica, contendo cortes de tumores ou de processo inflamatório nasais, onde não se aplicou o anticorpo primário.

5.10.1 Protocolo de reação dos marcadores

A seguir estão descritos os protocolos utilizados para cada anticorpo, lembrando que em algumas amostras foram necessárias realização de mais de um procedimento imuno-histoquímico para não gerar nenhuma dúvida quanto ao padrão de marcação e expressão.

5.10.1.1 *VEGF, EGFR, COX-2*

Para avaliação dos marcadores VEGF, EGFR e COX-2, após o processo inicial padrão, os cortes histológicos foram submetidos ao desmascaramento em tampão de ácido cítrico (pH 6,0), durante 5 minutos em panela de pressão elétrica. Após o resfriamento por aproximadamente 20 minutos no próprio tampão, as amostras foram lavadas em água corrente por 5 minutos e, em seguida, tratadas para bloqueio de peroxidase endógena, por 30 minutos, em solução de peróxido de hidrogênio a 5%, seguindo-se lavagens das lâminas com três banhos em PBS de 5 minutos cada. Novas lavagens foram realizadas e as lâminas foram incubadas com anticorpo primário (Quadro 1), por 30 minutos em câmara úmida a 37°, seguindo para overnight. Posteriormente, para aplicação do segundo anticorpo³⁰, as lâminas seguiram para o processo de incubação onde permaneceram em câmara úmida por 30 minutos a 37°. Realizou-se novos banhos em PBS, seguindo para revelação. As células positivas foram reveladas após a coloração com DAB, seguindo de novas lavagens e coloração, dando continuidade ao processo de desidratação e montagem.

A determinação da positividade da expressão dos marcadores COX-2, VEGF e EGFR foi realizada por meio de escore baseado no padrão da intensidade da coloração na membrana celular. Utilizou-se microscópio de luz³¹ com aumento em visão panorâmica de menor aumento em 10x (vezes) e com avaliação em 40x, sendo as amostras classificadas de forma qualitativa de acordo com a intensidade da

coloração. Classificou-se nas células tumorais a presença de expressão, como ausente ou inespecífico (-); fraco (+); moderado (++); e forte (+++).

5.10.1.2 *PCNA, Ki67 e p53*

Os cortes histológicos para avaliação dos marcadores PCNA, Ki67 e p53, foram também submetidos ao desmascaramento, porém em solução tampão nitrato completo (pH 6,0) por 15 minutos em panela de pressão elétrica. As amostras também foram submetidas a lavagens em água corrente por 5 minutos e, em seguida, foram submetidas ao bloqueio de peroxidase endógena, também por 30 minutos, na mesma concentração da solução a 5%. Após os banhos em PBS as lâminas foram incubadas com anticorpo primário (Quadro 1), por 30 minutos em câmara úmida 37°, seguindo para overnight. Realizou-se novas lavagens para aplicação do segundo anticorpo, do qual também foi utilizado o polímero, no entanto, permaneceram em câmara úmida por 60 minutos a 37°, dando continuidade ao processo de revelação, coloração, desidratação e montagem.

A avaliação do índice de proliferação celular foi realizada por método quantitativo onde os núcleos positivos foram contabilizados em um mínimo de 1000 núcleos de células localizadas em 10 ou mais campos aleatórios por meio de objetiva com aumento de 40x. Os núcleos positivos e negativos foram quantificados manualmente, através da ferramenta Manual Tag do software³² e posteriormente determinou-se o resultado pela porcentagem dos núcleos positivos sob os núcleos negativos. Após contabilizar os núcleos, os animais foram divididos em dois grupos, onde: grupo 1 até 20% de núcleos positivos; grupo 2 acima de 20%.

5.11 Avaliação dos resultados

Os resultados foram avaliados seguindo o acompanhamento clínico de cada paciente, de acordo com a estabilidade ou progressão da afecção, ou seja, conforme a melhora ou piora das manifestações clínicas. Estes dados foram avaliados em conjunto com as lesões por meio das imagens tomográficas e também com o tempo

de remissão. Novas imagens tomográficas foram realizadas após oito a 10 sessões cerca de 21 dias após a última sessão de quimioterapia, e comparadas com as imagens obtidas durante o primeiro exame tomográfico.

Os resultados obtidos, destas variáveis, foram correlacionados entre si, e comparados com o tempo de sobrevida global, e finalmente relacionados com a expressão dos marcadores tumorais COX-2, VEGF, EGFR, p53, PCNA e Ki67, no tecido analisado.

5.12 Análise estatística

Foram descritas as características dos cães como sexo, idade, manifestações clínicas e tipo histológico com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, intervalo interquartis) para as variáveis quantitativas e frequências absolutas e relativas para as variáveis qualitativas (KIKIWOOD; STERNE, 2006).

Para o tempo de sobrevida global desde o diagnóstico e tempo de remissão da doença desde a 1ª quimioterapia foram estimados os tempos medianos segundo as características de interesse com uso da função Kaplan-Meier (KLEINBAUM, 1996) e comparados os tempos entre as categorias das características avaliadas com uso de testes log-rank (KLEINBAUM, 1996). Foram estimados os Hazard Ratios (HR) com os respectivos intervalos com 95% de confiança com uso da regressão de Cox bivariada (KLEINBAUM, 1996).

As variáveis que apresentaram significância estatística nos testes bivariados foram testadas conjuntamente com uso de modelos de regressão de Cox múltipla (KLEINBAUM, 1996).

Os testes foram realizados com nível de significância de até 5%.

6 RESULTADOS

Os resultados foram avaliados seguindo o acompanhamento clínico de cada animal de acordo com o controle ou progressão da afecção, conforme as manifestações clínicas; classificação do estadiamento; tipo histológico; e por fim, os marcadores tumorais.

6.1 Casos clínicos

Foram inclusos no presente estudo 25 cães de raça, sexo e idade variadas onde 40% (10/25) Sem Raça Definida (SRD), 16% Labrador (4/25), 12% Poodle (03/25), os demais 32% das raças Cocker Spaniel (1/25), Pinscher (1/25), Daschund ou Teckel (1/25), Schnauzer (1/25), Bichon Frise (1/25) e Pitbull (1/25), Maltês (1/25) e Pastor Canadense (1/25). A idade dos animais variou entre seis anos a 14 anos, sendo a média entre os cães de 10,08 anos. De acordo com a distribuição sexual 56% dos animais machos (14/25) e 44% fêmeas (11/25) (Quadro 2). Os 25 cães foram diagnosticados com neoplasias malignas.

Gráfico 1 - Estimativa do tempo de sobrevida de Kaplan-Meier segundo sexo dos animais

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

O tempo médio de seguimento dos animais tanto macho como fêmeas foi de 310,3 dias após o diagnóstico (DP = 182,7 dias), no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre o tempo de sobrevida em relação ao sexo dos animais, e também quanto a idade segundo teste de Kaplan-Meier (Gráficos 1 e 2). Apesar de maior tempo mediano de sobrevida das fêmeas, não houve resultado estatisticamente significativo (Tabela 1).

Gráfico 2 - Estimativa do tempo de sobrevida de Kaplan-Meier segundo faixa etária dos animais

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

Quadro 2 - Descrição da raça, sexo, tipo de tratamento, classificação histopatológica, estadiamento tumoral, marcação celular e tempo de sobrevida

Caso	ID	Raça	Sexo	Idade (anos)	RT QT	IC	HP	T	TS	COX 2	VEGF	EGFR	PCNA	Ki67	p53
1	101498	Teckel	M	13	N	S	M*	T4	247	++	+	+	1	1	-
2	87995	Poodle	F	14	S	N	E	T3	652	x	x	x	x	x	x
3	232147	SRD	M	8	N	S	M	T4	440	+	+++	+++	2	1	-
4	232549	Poodle	M	13	S	N	E	T4	74	+++	+++	+++	2	2	-
5	231837	Pit Bull	M	6	N	N	M	T5	103	-	-	-	2	1	-
6	187812	Cocker	F	7	N	S	M	T3	458	-	-	-	2	2	-
7	231188	SRD	M	8	S	S	M*	T3	385	-	-	-	1	1	-
8	228545	Bichon Frise	M	7	N	S	E	T5	189	+++	+++	++	1	1	-1%
9	141972	SRD	M	10	S	N	E	T3	155	++	+++	-	1	1	-
10	229883	Schnauzer	F	12	S	N	E	T4	71	+	+++	+++	1	2	1
11	225499	Labrador	M	8	S	N	E	T5	343	-	+++	-	2	2	-
12	231890	Poodle	F	13	S	N	E	T3	363	x	x	x	x	x	x
13	234968	SRD	M	10	S	N	E	T3	371	+	+	-	2	2	2
14	234120	SRD	M	14	S	N	E	T5	133	+++	+++	++	2	2	-
15	235888	SRD	F	12	N	N	M	T4	159	-	-	-	1	1	-
16	235470	Pinscher	F	6	S	S	E	T3	725	+	+++	-	1	1	-
17	187042	SRD	F	14	S	S	M	T4	395	+	++	+	2	2	2
18	238830	Labrador	F	7	S	S	E	T4	348	-	-	-	2	2	-
19	240293	Maltês	M	11	N	S	E	T5	195	++	+	-	2	1	-
20	241739	Labrador	M	10	S	N	E	T5	270	++	+	+	1	2	-
21	242672	SRD	M	9	N	S	M	T5	180	+	+++	-	2	2	- 1%
22	241974	SRD	F	13	S	S	E	T5	304	-	+	-	2	2	-
23	234131	Pastor	F	10	N	N	E	T4	180	x	x	x	x	x	x
24	242333	Labrador	M	7	N	N	M	T5	30	-	++	-	2	1	-
25	229960	SRD	F	10	N	S	M	T4	150	x	x	x	x	x	x

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

Legenda: ID: (identificação do prontuário HOVET-FMVZ/USP; SRD (Sem Raça Definida); M (macho); F (fêmea); RT (remissão temporária) QT (quimioterapia); IC (intervenção cirúrgica); HP (histopatológico); S (sim); N (não); E (epitelial); M (mesenquimal); M* (misto); T (estadiamento); T3 (envolvimento da órbita; ou nasofaringe; ou presença de massa em subcutâneo); T4 (lise em placa cribiforme; T5 (envolvimento cerebral); TS (tempo de sobrevida em dias) - (ausente no tecido tumoral ou marcação inespecífica); + (leve); ++ (moderado), +++ (forte); 1 (menos de 20% de núcleos marcados); 2 (mais de 20% de núcleos marcados)

De acordo com os relatos dos proprietários, estes animais, apresentavam inicialmente como principal manifestação clínica episódios de esternutações recorrentes (25/25) com evolução para esternutações com sangue, seguindo para a ocorrência constante de secreção nasal uni (56%) ou bilateral (44%) de aspecto mucóide, mucopurulento e ou sanguinolento, evoluindo rapidamente para distrição respiratória (25/25), episódios de epistaxe (22/25) e deformidade facial em 60% (15/25), além de secreção ocular (20/25) e epífora (15/25), com progressão e evolução do quadro clínico em média de 30 a 90 dias pré diagnóstico (Gráfico 3).

Outra manifestação clínica presente foi o envolvimento da cavidade oral (08/25) em 32% dos cães. Oito animais (32%) também apresentaram manifestações neurológicas como confusão mental, desequilíbrio e episódios constantes de convulsão.

Gráfico 3 - Distribuição gráfica dos animais de acordo com as manifestações clínicas

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

Com os resultados estatísticos, por meio do teste de Kaplan-Meier os animais com presença de epistaxe, epífora e ou deformidade facial demonstraram menor tempo de sobrevida (Gráficos 4,5 e 6). No entanto, o resultado foi estatisticamente significativo nos animais com epistaxe, sendo menor ($p = 0,015$) (Tabela 1). Tempo mediano de sobrevida sem epistaxe foi 652 dias e com epistaxe 189 dias.

Nas demais variáveis relacionadas às manifestações clínicas, não houve resultados com significância estatística.

Gráfico 4 - Estimativa do tempo de sobrevida de Kaplan-Meier segundo presença de epistaxe

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

Gráfico 5 - Estimativa do tempo de sobrevida de Kaplan-Meier segundo presença de epífora

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

Gráfico 6 - Estimativa do tempo de sobrevida de Kaplan-Meier segundo presença de deformidade facial

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

Tabela 1 - Estimativa dos tempos de medianos de sobrevida segundo características de interesse como manifestações clínicas, tipo histológico e estadiamento tomográfico com resultados comparativos

Variável	Tempo mediano	IC (95%)		Óbitos	Total	%	HR	IC (95%)		p
		Inferior	Superior					Inferior	Superior	
Sexo										0,064
Macho	189	115,7	262,3	14	14	100,0	1,00			
Fêmea	348	150,6	545,4	10	11	90,9	0,44	0,18	1,07	
Faixa etária										0,169
Menos de 10 anos	343	222,1	463,9	9	10	90,0	1,00			
10 anos ou mais	180	129,5	230,5	15	15	100,0	1,79	0,77	4,17	
Epistaxe										0,015
Não	652	189,5	1114,5	2	3	66,7	1,00			
Sim	189	87,9	290,1	22	22	100,0	8,64	1,13	66,36	
Deformidade facial										0,816
Não	343	0,0	757,4	5	5	100,0	1,00			
Sim	195	67,9	322,1	19	20	95,0	1,13	0,42	3,06	
Cavidade oral										0,859
Não	159	110,0	208,0	15	16	93,8	1,00			
Sim	270	202,8	337,2	9	9	100,0	0,93	0,40	2,16	
Epífora										0,79
Não	150	77,2	222,8	9	10	90,0	1,00			
Sim	343	244,5	441,5	15	15	100,0	0,89	0,37	2,15	
Convulsão/acometimento neurológico										0,699
Não	247	126,0	368,0	16	17	94,1	1,00			
Sim	195	0,0	470,8	8	8	100,0	1,19	0,50	2,82	
Cirurgia										0,055
Não	155	107,3	202,7	14	14	100,0	1,00			
Sim	348	199,1	496,9	10	11	90,9	0,45	0,20	1,04	
Remissão										0,001
Não	103	0,0	220,6	4	4	100,0	1,00			
Sim	304	160,5	447,5	20	21	95,2	0,14	0,04	0,55	
HP										0,987
Epitelial	195	38,5	351,5	14	15	93,3	1,00			
Mesenquimal	247	75,0	419,0	10	10	100,0	0,99	0,43	2,29	
ADAMS										0,006
Envolvimento de órbita e/ou nasofaringe; massa em subcutâneo	385	349,1	420,9	6	7	85,7	1,00			
Lise em placa cribiforme	180	118,6	241,4	9	9	100,0	3,83	1,16	12,64	
Envolvimento cerebral	189	25,4	352,6	9	9	100,0	7,59	1,97	29,26	
Total	247	114,8	379,2	24	25	96,0				

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

6.2 Rinoscopia e biópsia

A rinoscopia possibilitou a visualização das proliferações teciduais intranasais e nasofaríngeas em 100% dos casos (n=25) e a coleta de biópsia das mesmas, das quais foram encaminhadas para o estudo histopatológico, exceto em um cão (caso 11) onde foi necessária coleta de biópsia por incisão cirúrgica devido ao diagnóstico histopatológico inconclusivo na primeira coleta, e, onde, posteriormente diagnosticou-se adenocarcinoma. Os tipos histológicos encontrados nestes pacientes foram epiteliais 60% (15/25) e 32% (8/25) mesenquimais, sendo classificados. Em dois casos os tipos histológicos foram classificados em neoplasia mista, vale dizer, com presença de células de origem mesenquimal e epitelial (8%) (Quadro 2). Os demais tipos histológicos foram classificados como carcinomas (8/25), adenocarcinomas (4/25), condrossarcomas (4/25), carcinomas de células

escamosas (3/25), osteossarcoma (2/25), fibrossarcomas (1/25), hemangiossarcomas (1/25). Não houve diferença estatisticamente significativas entre os tipos histológicos, tempo de sobrevida e remissão.

6.3 Exame tomográfico e estadiamento

Por meio do exame tomográfico de cabeça realizou-se a graduação desta afecção com base no estadiamento proposto por Adams (ADAMS et al., 2009) modificado para avaliação dos cães presentes neste estudo. De acordo com os resultados dos casos avaliados (Apêndice A), nenhum dos cães foi classificado com alterações correspondentes ao estágio T1 e ou T2.

Dos 25 cães cerca de 28% (7/25) foram classificados como T3 (Figura 2) e 36% (9/25) como T4 (Figuras 2 e 4). Os demais 36% (9/25) foram classificados no estágio T5 (Figura 5 e 6).

Figura 2 - Imagens tomográficas computadorizadas em cortes transversais de cabeça de cão a nível de cavidades nasais (A) e seios frontais (B) com diagnóstico conclusivo de neoplasia nasal maligna: classificado como T3 (caso 09)

Fonte: (SERVIÇO DE DIAGNÓSTICO POR IMAGEM, HOVET, FMVZ/USP, 2015)

Legenda: (a) opacificação em conchas nasais principalmente do lado esquerdo; (b) desvio do septo nasal e lise aparente; (c) lise em região de vômer; (d) lise em osso nasal do lado esquerdo; (e) comprometimento recesso maxilar; (f) massa em subcutâneo lado esquerdo; (g) opacificação em seio frontal. Para estes tomogramas foram utilizadas seleções de janela e nível adequados para avaliação de tecidos moles, sem contraste.

De acordo com a distribuição das regiões acometidas pelo estadiamento (Tabela 2) cinco animais (casos 2, 9, 11, 12, 23) apesar de apresentaram acometimento unilateral em cavidade nasal por massa tumoral (Figura 2) não foram considerados como estágio T1 ou T2, pois foram visibilizadas outras alterações que os classificaram em um estágio mais avançado. Os demais 20 cães apresentaram acometimento bilateral em cavidade nasal e região de nasofaringe por massa tumoral.

Figura 3 - Imagens tomográficas computadorizadas em cortes transversais de cabeça de cão a nível de cavidades nasais (A) e seios frontais (B) com diagnóstico conclusivo de neoplasia nasal maligna classificado como T4 (caso 10)

Fonte: (SERVIÇO DE DIAGNÓSTICO POR IMAGEM, HOVET, FMVZ/USP, 2015)

Legenda: (a) opacificação bilateral em conchas nasais; (b) lise em região de vômer; e septo nasal; (c) lise em osso nasal do lado esquerdo; (d) lise em região de palato e aumento de partes moles; (e) opacificação bilateral em região de coanas e nasofaringe; (f) opacificação bilateral em seios frontais. Para estes tomogramas foram utilizadas seleções de janela e nível adequados para avaliação de tecidos moles. Na figura (A) imagem sem contraste; (B) imagem contrastada

Os recessos maxilares e seios frontais, considerados os principais seios paranasais no cão, neste estudo, apresentaram alteração em 100% dos casos avaliados (25/25) com acometimento uni ou bilateral dos recessos maxilares (Figuras 02), e 28% (7/25) extensão tumoral para a região de seios frontais (casos 3, 5, 6, 7, 17, 18, 21 e 22) (Figuras 4 e 5).

Figura 4 - Imagens tomográficas computadorizadas em corte no plano dorsal de cabeça de cão classificado como T5 (caso 5)

Fonte: (SERVIÇO DE DIAGNÓSTICO POR IMAGEM, HOVET, FMVZ/USP, 2015)

Legenda: (a) acometimento em região de placa cribiforme, onde se observa lise com extensão intracraniana da massa tumoral, evidenciado pelo realce pós contraste. Para este tomograma utilizou-se seleção de janela e nível adequados para avaliação de tecidos moles.

Em alguns animais, devido a sua conformação craniana (casos 2, 12 e 23), na região de seios frontais não havia aeração, o que não permitiu a avaliação adequada destas regiões nestes cães.

Presença de massa em subcutâneo ou submucosa, (Figuras 2, 3, 5 e 6) foram lesões consideradas em animais em que apresentaram pelo exame tomográfico aumento de volume na região de plano nasal e ou na cavidade oral (palato) (Figura 3)

Figura 5 - Imagens tomográficas computadorizadas em cortes transversais de cabeça de cão a nível de cavidades nasais (A e B) com diagnóstico conclusivo de neoplasia nasal maligna classificado como T4 (caso 17)

Fonte: (SERVIÇO DE DIAGNÓSTICO POR IMAGEM, HOVET, FMVZ/USP 2015)

Legenda: (a) lise e opacificação em conchas nasais em região etmoturbinados; (b) opacificação bilateral em região de coanas; (c) massa em subcutâneo; (d) lise do osso nasal lado direito; (e) desvio da órbita por efeito de massa do tumor. Para estes tomogramas foram utilizadas seleções de janela e nível adequados para avaliação de tecidos ósseo (A) e moles (B) pós contraste

Destruição ou lise em placa cribiforme (Figura 4), também esteve presente em 76% dos casos (19/25), no entanto, nem todos os cães que apresentaram este tipo de lesão, manifestaram algum tipo de alteração neurológica

Presença de lise e opacificação em região de seios frontais (Figura 2 e 3), também foram lesões consideradas como acometimento desta região, entretanto, não foi possível afirmar invasão por massa tumoral em alguns casos, porém, estas alterações não descartaram a possibilidade de haver extensão da neoplasia para o seio frontal. Invasão na região da órbita pela extensão do tumor foi visibilizada em onze animais (Figuras 5 e 6), sendo considerado, também, envolvimento da órbita naqueles cães em que apresentaram lise óssea periorbital sem invasão tumoral.

Figura 6 - Imagens tomográficas computadorizadas em cortes transversais de cabeça de cão a nível de cavidades nasais e seios frontais (A) e seios frontais (B) com diagnóstico conclusivo de neoplasia nasal maligna classificado como T5 (caso 24)

Fonte: (SERVIÇO DE DIAGNÓSTICO POR IMAGEM, HOVET, FMVZ/USP 2015)

Legenda: (a) opacificação bilateral em conchas nasais; (b) lise de septo nasal; (c) lise de osso nasal do lado direito; (d) massa em subcutâneo lado direito; (e) lise em região de palato; (f) acometimento em região de nasofaringe, principalmente lado direito; (g) lise e opacificação seio frontal direito; (h) lise periorbital. Para estes tomogramas foram utilizadas seleções de janela e nível adequados para avaliação de tecidos moles

O bulbo olfatório foi a localização principal do acometimento cerebral das extensões neoplásicas (Figura 7) sendo possível visibilizar acometimento tumoral

com desvio de linha média em um paciente (caso 24). Em todos os exames após aplicação de contraste observou-se realce heterogêneo.

Pelo exame tomográfico de cabeça, também avaliou-se o comprometimento de linfonodos submandibulares e retro faríngeos. Entretanto, em seis animais não se realizou a extensão do exame tomográfico até a porção final dos linfonodos submandibulares e retrofaríngeos. Dos dezenove animais onde foi possível avaliar a região dos linfonodos 15% (n=3) foram considerados N1 (unilateral móvel) e 10%(n=1) considerado fixo (N2), os demais não apresentaram qualquer alteração.

Figura 7 - Imagens tomográficas computadorizadas em construção transversal de cabeça de cão a nível de seios frontais com diagnóstico conclusivo de neoplasia nasal maligna classificado como T5 (caso 24)

Fonte: (SERVIÇO DE DIAGNÓSTICO POR IMAGEM, HOVET, FMVZ/USP, 2015)

Legenda: (a) extensão tumoral para bulbo olfatório hiperatenuante com halo hipoatenuante (seta) e efeito de massa devido a desvio da linha média sendo visibilizado em melhor definição na imagem (B). Para estes tomogramas utilizou-se seleção de janela e nível adequados para avaliação de tecidos moles. (A) imagem sem contraste; (B) imagem contrastada

Novas imagens tomográficas foram realizadas em 28% (7/25) dos cães (casos 2, 3, 7, 12, 13, 15, 16) que foram submetidos a oito e dez sessões de quimioterapia, com o exame realizado cerca de 21 dias após a última sessão (Apêndice B). As imagens foram comparadas com as primeiras obtidas durante o

primeiro exame tomográfico, onde observou-se que 71% (5/7) destes pacientes apresentaram piora na graduação do estadiamento, entretanto, não manifestaram piora clínica durante este período, apresentaram melhora ou estabilidade do quadro, apesar da progressão da afecção. Outros 28% (2/25) mantiveram a graduação comparando com o primeiro exame.

Figura 8 - Imagem tomográfica computadorizada com renderização de volume de cabeça de cão com diagnóstico conclusivo de neoplasia nasal maligna classificado como T5 (caso 24)

Fonte: (SERVIÇO DE DIAGNÓSTICO POR IMAGEM, HOVET, FMVZ/USP, 2015)

Legenda: Lise em região de osso nasal direita (seta)

Tabela 2 - Descrição das regiões avaliadas e acometidas, pela extensão tumoral e sua distribuição, seguindo dados coletados a partir da TCC

LOCAL	DISTRIBUIÇÃO PORCENTUAL
Cavidade nasal unilateral	20%
Cavidade nasal bilateral	80%
Lise óssea (turbinaos)	100%
Nasofaringe	96%
Recesso maxilar	100%
Seio frontal	72%
Massa em subcutâneo/submucosa	96%
Placa cribiforme	76%
Lise periorbital	80%
Invasão órbita	44%
Cérebro	32%

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

Na tabela 1 (página 63) nota-se que a sobrevida global dos animais diminuiu conforme aumento da classificação segundo estadiamento ($p = 0,006$). Quando aplicado o teste de regressão Cox bivariada, observa-se que o risco de mortalidade nos animais com envolvimento cerebral é 5,86 vezes o risco do animal com envolvimento da órbita e/ou nasofaringe ($p = 0,040$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultado do modelo de regressão de Cox múltipla para explicar as alterações que influenciam na sobrevida dos animais, por meio do estadiamento utilizado

Variável	HR	IC (95%)		p
		Inferior	Superior	
Envolvimento de órbita e/ou nasofaringe; massa em subcutâneo	1,00			
Lise em placa cribiforme	2,09	0,49	8,85	0,316
Envolvimento cerebral	5,86	1,09	31,58	0,040

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

Os resultados estatísticos avaliados sobre o estadiamento sugerem que há diferenças na sobrevida dos animais conforme a classificação do estadiamento (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Estimativa do tempo de sobrevida de Kaplan-Meier segundo estadiamento (ADAMS, modificado)

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

6.4 Tratamento e sobrevida

Realizou-se rinotomia em 48% (12/25) dos casos, ou seja, naqueles animais em que não houve resposta ao tratamento quimioterápico ou nos casos de progressão, mesmo com resposta inicial. Os restantes 52% (13/25) dos animais foram submetidos apenas ao protocolo quimioterápico (Quadro 2). O protocolo quimioterápico instituído em todos os pacientes foi a carboplatina 300mg/ m² intercalada com a doxorrubicina 30mg/ m², administradas por via intravenosa, a cada 21 dias (entre uma a dez sessões), conforme explicitado no capítulo material e método.

Devido contra-indicações na aplicação, não realizou-se a doxorrubicina em apenas um paciente (caso 14), devido sua cardiopatia. Em outro paciente, a

administração da doxorubicina foi suspensa pelo seu efeito cardiotóxico após terceira sessão (caso 06). Em conjunto com o tratamento quimioterápico, prescreveu-se piroxicam 0,3 mg/kg por via oral uma vez ao dia, a cada 48 horas, caso não apresentasse reação adversa, a administração foi alterada para todos os dias até novas recomendações. No início do tratamento, administrou-se piroxicam em todos os animais que não apresentassem quaisquer contra-indicação para sua administração, porém, devido aos seus efeitos colaterais, como diarreia e êmese, em apenas 23% (n=4) seu uso foi mantido. Nos animais com a doença já avançada, foi prescrito corticosteróide (1 a 2 mg/kg) por via oral uma a duas vezes ao dia sendo realizado pelo proprietário. Todos os animais apresentaram efeitos colaterais, entre dois a sete dias após aplicação de quimioterapia, como inapetência, um a três episódios de êmese e diarreia, apenas um (caso 19) apresentou queda de pelos.

Nenhum dos cães avaliados apresentaram metástase pelo exame radiográfico de tórax, no entanto, posteriormente ao diagnóstico, três casos foram sugestivos de metástase, onde em um dos casos, cerca de um ano após o diagnóstico inicial de condrossarcoma nasal e tratamento, realizou-se controle radiográfico de tórax, onde observou-se nódulo pulmonar, sugerindo metástase (caso 03). Em outro paciente, também cerca de um ano posterior ao diagnóstico de hemangiossarcoma nasal e tratamento (caso 17), o animal iniciou quadro de dor em região toraco-lombar e paresia de membros posteriores evoluindo para paralisia, sendo solicitado ressonância magnética. Ao exame visibilizou-se massa centrada localizada em forame intervertebral (vértebras torácicas 13 e lombar 1) com destruição óssea, de aspecto infiltrativo à musculatura paravertebral, e invadindo a medula, sendo o diagnóstico suspeito de hemangiossarcoma.

Outro cão (caso 10) com diagnóstico de adenocarcinoma nasal, apresentou aumento de volume de consistência firme em linfonodo unilateral, cerca de 10 dias após o diagnóstico, antes de realizar a primeira sessão de quimioterapia, sendo submetido a punção para avaliação citológica, com resultado sugestivo de células epiteliais de caráter maligno. Após a sessão de quimioterapia houve redução expressiva do aumento de volume tanto em região de linfonodo como em cavidade nasal. Os demais animais que tiveram tempo de sobrevivência semelhante, não apresentaram sinais de metástase pulmonar.

Devido aos episódios constantes de convulsão seis animais vieram a óbito, sendo um deles (caso 24) diagnosticado com epilepsia desde filhote, do qual fazia

uso diário de medicamento anti-convulsivante. Outro paciente (caso 10) após vários episódios convulsivos, diagnosticou-se hiperlipidemia, onde, mesmo com tratamento, o paciente veio a óbito. Houve controle da doença ou remissão em 80% dos animais (n=20) sendo o tempo médio de sobrevida dos animais 276,8 dias, variando entre 30 dias a 725 dias, sendo acompanhados durante três anos e meio a partir da data do diagnóstico até a data do óbito.

Tabela 4 - Estimativa dos tempos medianos de remissão da doença a partir da 1ª sessão de quimioterapia segundo características de interesse como manifestações clínicas, tipo histológico e estadiamento tomográfico com resultados comparativos

Variável	Tempo mediano	IC (95%)		Óbitos	Total	%	HR	IC (95%)		p
		Inferior	Superior					Inferior	Superior	
Sexo										0,220
Macho	154	36,4	271,6	12	14	85,7	1,00			
Fêmea	119	26,7	211,3	9	11	81,8	0,54	0,20	1,47	
Faixa etária										0,456
Menos de 10 anos	154	107,5	200,5	8	10	80,0	1,00			
10 anos ou mais	157	35,1	278,9	13	15	86,7	0,69	0,26	1,84	
Epistaxe										0,023
Não	438	23,5	852,5	3	3	100,0	1,00			
Sim	119	89,9	148,1	18	22	81,8	7,77	1,00	60,49	
Deformidade facial										0,050
Não	438	111,1	764,9	4	5	80,0	1,00			
Sim	119	100,1	137,9	17	20	85,0	4,04	0,90	18,10	
Cavidade oral										0,485
Não	179	24,4	333,6	13	16	81,3	1,00			
Sim	154	107,5	200,5	8	9	88,9	1,40	0,54	3,63	
Epifora										0,406
Não	80	0,0	180,4	9	10	90,0	1,00			
Sim	157	94,7	219,3	12	15	80,0	0,69	0,28	1,67	
Convulsão/acometimento neurológico										0,098
Não	179	90,3	267,7	14	17	82,4	1,00			
Sim	119	70,2	167,8	7	8	87,5	2,32	0,83	6,51	
Cirurgia										0,978
Não	100	56,4	143,6	11	14	78,6	1,00			
Sim	157	105,7	208,3	10	11	90,9	0,99	0,40	2,47	
HP										0,417
Epitelial	113	58,7	167,3	15	15	100,0	1,00			
Mesenquimal	252	106,0	398,0	6	10	60,0	0,67	0,25	1,78	
ADAMS										0,114
Envolvimento de órbita e/ou nasofaringe; massa em subcutâneo	193	157,1	228,9	7	7	100,0	1,00			
Lise em placa cribiforme	113	0,0	233,5	7	9	77,8	2,11	0,66	6,71	
Envolvimento cerebral	100	49,7	150,3	7	9	77,8	3,55	1,02	12,31	
Total	154	100,5	207,5	21	25	84,0				

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

Algumas características clínicas influenciaram na ocorrência de remissão ou controle da doença, e quando comparadas com o grau de estadiamento dos pacientes e a remissão, aparentemente, apenas epistaxe e deformidade facial demonstraram significância estatística, segundo o teste de Kaplan - Meier (Gráficos 8 e 9). Quando se realizou a estimativa entre os tempos medianos de remissão ou controle da afecção a partir da primeira sessão de quimioterapia, o tempo até a remissão foi estatisticamente menor nos animais com epistaxe ($p=0,023$) e nos animais com deformidade facial ($p=0,050$) (Tabela 4).

Gráfico 8 - Estimativa do tempo de remissão de Kaplan-Meier segundo epistaxe dos animais

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

Gráfico 9 - Estimativa do tempo de remissão de Kaplan-Meier segundo deformidade facial nos animais

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

Nos casos dos animais submetidos ao procedimento cirúrgico, nota-se tempo de sobrevida maior, onde o tempo mediano de sobrevida sem cirurgia foi 155 dias e

com cirurgia 348 dias, lembrando que alguns animais foram submetidos por mais de um procedimento cirúrgico (Gráfico 10), porém, sem resultado estatisticamente significativo tanto em relação ao tempo de sobrevida global (Tabela 1), mas com ganho maior no tempo de remissão.

Gráfico 10 - Estimativa do tempo de sobrevida de Kaplan-Meier segundo cirurgia em algum momento do seguimento dos animais

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

De acordo com os resultados estatísticos empregados para avaliar o tempo de sobrevida global foi estatisticamente maior e animais que entraram em remissão com ou sem tratamento cirúrgico ($p = 0,001$) (Tabela 1). Pelo resultado do teste de regressão de Cox múltipla (Tabela 5), o risco de mortalidade nos animais que entraram em remissão ou controle da doença foi 98% menor.

Tabela 5- Resultado do modelo de regressão de COX múltipla para explicar a remissão dos cães avaliados

Variável	HR	IC (95%)		p
		Inferior	Superior	
Remissão				
Não	1,00			
Sim	0,02	0,00	0,24	0,003

(Fonte: AULER, F. A. B, 2015)

6.5 Imuno-expressão dos marcadores

No material de alguns casos, em algumas lâminas (casos 02, 12 e 23) a quantidade insuficiente de tecido tumoral não permitiu a marcação adequada para avaliação dos anticorpos utilizados, e além destas amostras, em outra lâmina (caso 25) devido ao excesso de tecido cartilaginoso não houve reação específica do anticorpo no tecido tumoral não havendo expressão para avaliação. Portanto, a avaliação da expressão dos marcadores em quatro animais foi desconsiderada.

Figura 9 - Fotomicrografias em objetiva com aumento de 40x da marcação imuno-histoquímica com anticorpo VEGF em tumores epiteliais, com contra- coloração por hematoxilina

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

Legenda: (A) ausente de marcação ; (B) marcação considerada leve (+). Barra de escala = 5 µm.

Figura 10 - Fotomicrografias em objetiva com aumento de 40x da marcação imuno-histoquímica com anticorpo VEGF em tumores epiteliais, com contra-coloração por hematoxilina

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

Legenda: (A) marcação considerada moderada (++); (B) marcação considerada forte (+++). Barra de escala = 5 μ m

A expressão do anticorpo VEGF foi considerada ausente ou inespecífica no tecido tumoral em cerca 24% (5/21) das amostras. Classificada como leve em 24% (5/21); moderada 9,5% (2/21) e os demais 43% (9/21) forte. Nas neoplasias de origem epitelial o VEGF foi expresso em todas as amostras (12/21), sendo em maioria considerado forte (n=7). Nas neoplasias mesenquimais esteve presente em 50% (5/10) das amostras, sendo sua expressão considerada forte em dois animais (caso 03 e 21) (Figura 9 e 10). Nos tumores de origem epitelial a expressão foi considerada forte nos animais, em que o tempo médio de sobrevida foi de 241 dias. Naqueles com expressão considerada leve, o tempo de sobrevida foi de 297,6 dias, em nenhum destes pacientes foi encontrado expressão moderada em suas amostras. Nos animais com tumores mesenquimais o tempo médio de sobrevida daqueles com expressão forte foi 372 dias, e os de expressão moderada 213, 5 dias. Apenas um cão teve em sua amostra a expressão considerada leve (caso 17), sendo o seu tempo de sobrevida 395 dias) De acordo com os resultados estatísticos a expressão do VEGF não apresentou, significativamente, nenhum resultado entre o tempo de sobrevida e remissão dos animais avaliados (Tabela 6 e 7).

Figura 11 - Fotomicrografias em objetiva com aumento 40x, da marcação imuno-histoquímica com anticorpo VEGF em neoplasias de origem mesenquimal com contra- coloração por hematoxilina

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

Legenda: (A) marcação considerada forte (+++) por VEGF em tumor mesenquimal. Barra de escala = 5 µm

Tabela 6 - Estimativa dos tempos medianos de remissão da doença a partir da 1ª sessão de quimioterapia segundo características de interesse dos marcadores tumorais com resultados comparativos

COX 2										0,324
Ausente/Fraco	154	59,7	248,3	11	14	78,6	1,00			
Moderado/Forte	80	59,5	100,5	7	7	100,0	1,63	0,61	4,34	
VEGF										0,428
Ausente/Fraco	157	98,9	215,1	8	10	80,0	1,00			
Moderado/Forte	72	0,0	188,2	10	11	90,9	1,47	0,56	3,86	
EGFR										0,021
Ausente/Fraco	157	55,2	258,8	13	16	81,3	1,00			
Moderado/Forte	48	39,4	56,6	5	5	100,0	3,72	1,12	12,35	
PCNA										0,862
Até 30%	123	7,2	238,8	7	8	87,5	1,00			
Acima de 30%	119	54,6	183,4	11	13	84,6	1,09	0,41	2,90	
Ki67										0,300
Até 30%	157	149,5	164,5	7	10	70,0	1,00			
Acima de 30%	100	29,9	170,1	11	11	100,0	1,66	0,63	4,42	
p53										0,202
Negativo ou menos de 1%	119	101,2	136,8	15	18	83,3	1,00			
Algum percentual de marcação	193	0,0	466,7	3	3	100,0	0,39	0,09	1,76	
Total	123	69,2	176,8	18	21	85,7				

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

Tabela 7 - Estimativa dos tempos de medianos de sobrevida segundo características de interesse dos marcadores tumorais com resultados comparativos

COX 2										0,006
Ausente/Fraco	343	262,3	423,7	13	14	92,9	1,00			
Moderado/Forte	155	98,5	211,5	7	7	100,0	5,03	1,42	17,91	
VEGF										0,989
Ausente/Fraco	247	78,1	415,9	10	10	100,0	1,00			
Moderado/Forte	189	41,2	336,8	10	11	90,9	0,99	0,41	2,42	
EGFR										0,284
Ausente/Fraco	270	158,3	381,7	15	16	93,8	1,00			
Moderado/Forte	133	6,3	259,7	5	5	100,0	1,75	0,62	4,96	
PCNA										0,881
Até 30%	159	111,9	206,1	7	8	87,5	1,00			
Acima de 30%	304	130,2	477,8	13	13	100,0	0,93	0,37	2,36	
Ki67										0,874
Até 30%	189	133,2	244,8	9	10	90,0	1,00			
Acima de 30%	304	77,4	530,6	11	11	100,0	1,08	0,44	2,63	
p53										0,866
Negativo ou menos de 1%	195	74,4	315,6	17	18	94,4	1,00			
Alguns percentual de marcação	371	0,0	851,1	3	3	100,0	0,90	0,26	3,15	
Total	247	125,9	368,1	20	21	95,2				

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

Quanto ao anticorpo EGFR sua expressão foi avaliada como ausente em 62% (13/21); leve 9,5 % (2/21); moderada em 9,5 % (2/21) e forte em 14,2% (3 /21) das amostras de tecido tumoral.

Figura 12 - Fotomicrografia em objetiva com aumento 40x, da marcação imuno-histoquímica com anticorpo EGFR em neoplasias nasais com contra- coloração por hematoxilina

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

Legenda: (A) marcação EGFR considerado moderado (++) em tumor epitelial; (B) marcação EGFR considerado forte (+++) em tumor mesenquimal. Barra de escala = 5 µm

Nos tumores de origem epitelial, o EGFR teve a expressão considerada forte em dois cães (caso 04 e 10), com tempo médio de 72,5 dias de sobrevida. Os cães de expressão moderada em tumores epiteliais (n=3), obtiveram tempo médio de sobrevida de 159 dias, e no material em que a expressão foi considerada leve, a sobrevida foi de 270 dias. Assim como nos casos de neoplasias epiteliais, em apenas dois pacientes com tumores mesenquimais (casos 01 e 17), a expressão foi considerada leve e o tempo de sobrevida em média de 321 dias, nenhum animal foi avaliado com marcação moderada, e apenas um o cão (caso 3) a marcação foi forte em sua amostra e sua sobrevida foi de 440 dias (Figura 12).

Nos animais em que as amostras foram classificadas com a expressão do EGFR de forma moderada e forte, apresentaram estatisticamente um tempo menor de remissão quando comparados aos animais que apresentaram expressão fraca ($p= 0,021$), de acordo com a estimativa entre os tempos medianos de remissão ou controle da afecção a partir da primeira sessão de quimioterapia (Tabela 6), entretanto, com uso da regressão de Cox bivariada, a influência, nos animais com expressão forte e moderada foi 3,72 vezes o risco de remissão nos animais com expressão fraca ou ausente (Tabela 8). Não houve resultados estatisticamente significantes quanto a expressão do EGFR e o tempo de sobrevida (Tabela 7).

Tabela 8 - Resultado do modelo de Cox múltipla para explicar o tempo de remissão dos animais segundo as variáveis avaliadas

Variável	HR	IC (95%)		p
		Inferior	Superior	
EGFR				
Ausente/Fraco	1,00			
Moderado/Forte	3,72	1,12	12,35	0,032

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

A expressão do anticorpo COX-2 foi considerada ausente nas amostras de tecido tumoral em cerca de 39% (8/21), sendo avaliada com marcação leve em 28,5% (6/21), moderada em 19% (4/21) e forte em 14% (3/21) (Figura 13).

Os animais com neoplasias epiteliais que foram classificados como expressão leve obtiveram tempo de sobrevida médio de 389 dias, com marcação moderada 206,6 dias de tempo médio de sobrevida, e por fim, os de expressão considerada forte 132 dias.

Figura 13 - Fotomicrografias em objetiva com aumento de 40x da marcação imuno-histoquímica com anticorpo COX-2 com contra- coloração por hematoxilina

(Fonte: AULER, F. A. B. 2015)

Legenda: (A) ausência de expressão em tumor epitelial; (B) expressão considerada leve em tumor epitelial (+); (C) expressão considerada moderada em tumor mesenquimal (++) ;(D) expressão considerada forte em tumor epitelial (+++). Barra de escala = 5 μ m

Nos tumores mesenquimais o tempo médio de sobrevida foi de 338,3 dias nos animais de expressão leve, e no cão (caso 01) onde sua amostra apresentou expressão moderada, seu tempo de sobrevida médio foi de 247 dias. Não houve nenhuma amostra de tumores mesenquimais com expressão forte.

Segundo o gráfico 11 há diferença na sobrevida dos animais conforme a expressão do marcador COX-2. Também foi possível evidenciar que a sobrevida global dos animais foi estatisticamente menor em animais com graus mais avançados do COX-2 ($p = 0,006$) (Tabela 7). Não houve resultados significativos entre a remissão da afecção e a expressão da COX-2.

Gráfico 11 - Estimativa do tempo de sobrevida de Kaplan-Meier segundo COX 2 nos animais

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

O risco de mortalidade nos animais que expressaram COX 2 em grau moderado ou forte apresentam risco de mortalidade 18,78 vezes o risco de animais com COX 2 ausente ou fraco (Tabela 9).

Tabela 9 - Resultado do modelo de regressão de Cox múltipla para explicar a expressão de COX -2 que influenciam na sobrevida dos animais

Variável	HR	IC (95%)		p
		Inferior	Superior	
COX 2				
Ausente/Fraco	1,00			
Moderado/Forte	18,78	1,99	177,24	0,010

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

Figura 14 - Fotomicrografias em objetiva com aumento de 40x da marcação nuclear por imuno- histoquímica do anticorpo Ki67 com contra- coloração por hematoxilina

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

Legenda: (A) marcação nuclear em tumor epitelial (seta); (B) marcação nuclear em tumor mesenquimal (seta). Barra de escala = 5 μ m

A expressão do anticorpo Ki67 foi verificada em 100% (21/21) dos animais (Figura 13), no entanto, em quantidades diferentes, onde 7,6% (10/21) demonstraram até 20% de suas células positivas na amostra tecidual (grupo 1) onde a menor porcentagem foi de 2% de células marcadas em um paciente com sobrevida de 725 dias e o tempo médio de sobrevida foi de 263 dias. Acima de 20% de núcleos positivos (grupo 2), foram classificados em 52% (11/21) cães, onde o tempo médio de sobrevida 252 dias, e entre estes animais o maior tempo de sobrevida foi de 458 dias e a positividade nuclear esteve em 43% das células.

A expressão nuclear do anticorpo PCNA, também esteve presente em todas as amostras avaliadas e assim como o Ki67 em porcentagens diferentes de núcleos marcados (Figura 15), onde 38% (8/21) pertenceu ao grupo 1, e sobreviveram em média 254,5 dias. Outros 61% (13/21) as positivities dos núcleos foram classificadas como grupo 2 e o tempo médio de sobrevida foi cerca de 266 dias.

Figura 14 - Fotomicrografias em objetiva com aumento de 40x da marcação nuclear por imuno- histoquímica do anticorpo PCNA com contra- coloração por hematoxilina

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

Legenda: (A) marcação nuclear em tumor epitelial (seta); (B) marcação nuclear em tumor mesenquimal (seta). Barra de escala = 5 μ m

Quando avaliou-se o anticorpo p53 nas amostras em cerca de 24% (5/21) houve marcação nuclear (Figura 14), no entanto, em dois animais esta marcação foi desconsiderada, pois menos de 1% dos núcleos foram marcados. Entretanto, em dois pacientes (caso 13 e 17) a marcação foi bem expressiva, em 69% e 38% de células positivas (grupo 2), na amostra do outro paciente (caso 10) a expressão foi de 13% (grupo 1). O tempo de médio de sobrevida dos pacientes com maior expressão foi de 383 dias, e o paciente com menor expressão 71 dias. Os animais que não apresentaram marcação ou foram desconsiderados devido à pouca quantidade de material (18/21) demonstraram em média dias de vida.

Figura 14 - Fotomicrografias em objetiva com aumento de 40x da marcação nuclear por imuno-histoquímica do anticorpo p53 com contra- coloração por hematoxilina

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

Legenda: (A) marcação nuclear em tumor epitelial (seta); (B) marcação nuclear em tumor mesenquimal (seta). Barra de escala = 5 μ m

Em nenhum dos marcadores nucleares houve diferença estatisticamente significativas entre o tempo de sobrevida e remissão da afecção (Tabela 6 e 7).

7 DISCUSSÃO

Os animais avaliados neste estudo eram provenientes da casuística do Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do Departamento de Cirurgia da FMVZ da Universidade de São Paulo, e consultados, após triagem, no Hospital Veterinário (HOVET). A presente pesquisa foi realizada de forma prospectiva com acompanhamento clínico dos animais e retornos posteriores aos procedimentos terapêuticos indicados. Os proprietários estiveram de acordo com a realização dos procedimentos de rinoscopia, tomografia, quimioterápicos e cirúrgico, quando recomendado e os pacientes foram acompanhados até o óbito. A casuística utilizada não refere a totalidade dos casos atendidos pela instituição, portanto estas informações não devem servir de base para um levantamento epidemiológico. Também, todos os procedimentos nos animais foram realizados após a aprovação do protocolo na CEUA da FMVZ-USP e com o consentimento esclarecido por escrito do proprietário (Anexo).

Os cães de raça mista ou SRD (40%) foram os mais acometidos e está ocorrência pode estar relacionada a predominância destes animais presentes na casuística do HOVET. De acordo com a distribuição dos casos, por sexo, o resultado foi conforme descrito em outros estudos sendo os cães machos mais afetados. A maioria dos animais avaliados foram machos (56%), com idade média de 10,1 anos (DP = 2,7 anos). Apesar do tempo de sobrevida entre os sexos não ter apresentado resultados significativos pela estatística, as fêmeas apresentaram em média 41 dias a mais de sobrevida que os machos, e em sua maioria, animais com conformação craniana do tipo dolicocefálico e mesaticefálico (LANA; WITHROW, 2001; COHN, 2014).

As manifestações clínicas observadas vão ao encontro das apresentadas na literatura, com progressão rápida da afecção e de forma destrutiva, onde a maioria dos animais apresentaram mais de uma forma clínica da afecção (LANA; WITHROW, 2001; MCCARTHY, 2005; GIEGER et al., 2013; COHN, 2014), sendo as esternutações com sangramento nasal, secreção nasal e distrição respiratória as principais manifestações (100%) seguindo para epistaxe (88%), epífora (60%), deformidade facial (60%), envolvimento da cavidade oral (32%) e manifestações neurológicas como confusão mental, desequilíbrio e convulsão (32%). Os animais

com distrição respiratória apresentavam algum grau de obstrução nasal caracterizada por dificuldade inspiratória e ruídos.

Nos animais com deformidade facial, o tempo de remissão foi menor estatisticamente ($p=0,05$), e o mesmo ocorreu na presença de epistaxe ($p=0,023$), apresentando resultados significativos estatisticamente, com tempo mediano até remissão de 438 dias naqueles sem epistaxe e sem deformidade facial, e 119 dias que apresentaram epistaxe e deformidade facial.

De acordo com os testes estatísticos os animais com epistaxe demonstraram menor tempo de sobrevida. Nos casos de epistaxe em média 232 dias e sem: 580 dias, sendo significativos estatisticamente ($p=0,015$). Estes resultados corroboram com o outro estudo (RASSNICK et al., 2006) onde, cães com epistaxe, demonstraram maior risco de óbito comparado aos cães que não tiveram epistaxe. Neste estudo o tempo médio de sobrevivência de 22 animais foi em média 232 dias, porém com tratamento, já no estudo de Rassnick et al. (2006) em 107 cães com epistaxe o tempo médio de sobrevida foi de 88 dias, sem nenhum tratamento.

Epífora e deformidade facial também influenciaram no tempo de sobrevida, onde estes animais demonstraram um tempo menor em relação aos que não apresentaram estas manifestações, apesar desta influência, os resultados não foram significativos estatisticamente.

Os animais classificados nos estágios mais avançados, apresentaram resultados estatísticos significativos em relação ao tempo de sobrevida, ou seja, conforme o aumento da classificação do estadiamento, menor o tempo de sobrevida e também maior o risco óbito (5,86 vezes maior). Pelas imagens tomográficas, os resultados encontrados demonstraram que 72% ($n=18$) dos pacientes já apresentavam estágio avançado do tumor, dos quais foram classificados pelo estadiamento entre o estágio T4 e T5, corroborando com os resultados de Geiger et al. (2013) e Mason et al. (2014). No estudo de Mason et al. (2014) foram classificados 59% (45/76) dos casos como T4, e nos achados de Geiger et al. (2013) 60% dos animais com carcinomas (15/26) foram também classificados como T4. Estes autores utilizaram sistema semelhante ao utilizado neste trabalho, de classificação de tumores sinonasais em cães (ADAMS et al., 1998). Kondo et al. (2008), desenvolveram outro modelo de classificação tumoral, e também obtiveram em seus resultados maior índice nos cães entre o estágio III (32/112) e IV (40/112). Já no estudo de Langova et al. (2004) os animais avaliados foram classificados em

sua maioria entre o estágio T2 (4/8) e T3 (1/8). Em outro estudo com 94 cães (ADAMS et al., 2009) os cães com tumores unilaterais sem lise óssea além dos turbinados, obtiveram maior tempo de sobrevida daqueles que apresentaram envolvimento da placa cribiforme. Neste estudo, não houveram animais entre os estágios iniciais, mas aqueles no estágio menos avançado viveram mais, em média 444 dias, e no estágio avançado (T5) a sobrevida foi em média 184,6 dias.

No presente estudo, o número de animais avaliados pelo estadiamento, por meio da TCC foi menor, comparado aos outros estudos pois nem todos os cães atendidos contemplaram os critérios de inclusão, e não por falta de casuística. O tempo de segmento e tratamento que os demais autores utilizaram, também foram diferentes, sendo na maioria estudos de levantamento de dados, ou seja, estudo retrospectivo o que aumenta o número de casos (KONDO et al., 2008; ADAMS et al., 2009; GIEGER et al., 2013; MASON et al., 2014), o que difere deste estudo, do qual foi prospectivo. Pode se dizer que para a realização deste estudo o sistema de estadiamento que empregamos, apresentou resultados satisfatórios, principalmente, como fator prognóstico, onde seus resultados foram comprobatórios na questão do grau de extensão da afecção em relação ao tempo de sobrevida, o que pode trazer informações mais concretas sobre a sobrevida deste paciente em relação ao grau da afecção, porém, as alterações avaliadas não influenciaram na resposta ao tratamento ou na remissão da afecção de acordo com os resultados estatísticos.

Não houve relação com resultados estatisticamente significativos neste estudo entre os achados histopatológicos em relação ao grau do estadiamento, mas observou-se que os animais acometidos por tumores epiteliais foram em sua maioria classificados como T5 (6/15) e aqueles com tumores mesenquimais como T4 (5/10), porém, a casuística dos tumores epiteliais foi 20% maior.

O emprego do exame de rinoscopia foi satisfatório em todos os casos para a conclusão diagnóstica, possibilitando visibilizar o acometimento das cavidades nasais e nasofaringe por proliferações teciduais, assim como descrito por outros autores (WILLARD; RADLINSKY, 1999; NELSON; COUTO, 2001; NOONE, 2001; McCARTHY, 2005; VENKERVAN HAAGEN, 2005; PIETRA et al., 2010; AULER et al., 2015). Não foi possível avaliar pela rinoscopia o tipo tumoral, e também não se realizou nenhum teste comparativo entre os achados endoscópicos, com estudo histopatológico e sobrevida. No entanto, em cinco animais (caso 2, 11, 13, 14 e 16)

em que realizou-se controle do estadiamento após o tratamento de quimioterapia sem intervenção cirúrgica, observou-se diminuição do tumor por meio da rinoscopia.

A coleta de material realizada durante o procedimento endoscópico ocorreu de forma direta e minimamente invasiva sem intercorrências dignas de nota (McCARTHY; McDEIRMAN, 1990; DAVIDSON et al., 2004; MALINOWSKI, 2005; McCARTHY, 2005; VENKERVANHAAGEN, 2005; PIETRA et al., 2010; AULER et al., 2015). De acordo com estes resultados considera-se a rinoscopia, além de excelente método de diagnóstico, apto para coleta de material de forma minimamente invasiva, onde em apenas um animal foi necessário nova coleta de biópsia por meio de incisão cirúrgica.

Os resultados estatísticos deste trabalho mostram que os animais submetidos ao procedimento cirúrgico em conjunto com a quimioterapia, alcançaram maior tempo de sobrevida, mas quando calculado tempos medianos de sobrevida dos animais operados, este resultado não foi significativo para o teste estatístico. Entretanto, pelo cálculo da média de sobrevida dos animais submetidos ao tratamento quimioterápico em conjunto com a cirurgia (335 dias), o tempo médio foi maior do que nos animais tratados apenas com o protocolo quimioterápico isolado (204 dias). No entanto, o número dos animais tratados por quimioterapia foi maior.

Baseando-se no tempo médio de sobrevida de 95 dias sem nenhum tratamento (MORRIS et al., 1994; RASSNICK et al., 2006), pode-se dizer que a sobrevida dos animais tratados com os protocolos utilizados neste trabalho foi maior. No estudo realizado por Langova et al. (2004) utilizando o mesmo protocolo quimioterápico, com administração de piroxicam, sem intervenção cirúrgica, relatam como resultados remissão completa do quadro (4/8), remissão parcial (2/8) e doença estável (2/8), porém dentre estes animais, a remissão completa de dois casos ocorreu em cães classificados pelo estadiamento de Adams (1998) como T2, sendo apenas um animal classificado como T3 e o outro como T4. A remissão completa citada pelos autores permaneceu nestes cães em média 285,7 dias, e dos demais animais que apresentaram melhora parcial de 290 dias e daqueles com doença considerada estável foi de 617, 5 dias. Os autores referem-se aos animais com remissão completa, após controle tomográfico durante o tratamento, onde observou-se redução tumoral significativa, no entanto, houve recidiva da doença nasal diagnosticada com base nas manifestações clínicas e posteriormente confirmada pela TCC em todos os casos, e naqueles em que houve morte, a causa foi

relacionada com a recorrência da afecção (LANGOVA et al., 2004). Campos et al. (2013) realizaram em um cão com diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma papilar sinonasal, procedimento cirúrgico adjutoramente com tratamento quimioterápico com cloridrato de gencitabina e carboplatina, relatando aumento da sobrevida do paciente em 420 dias, entretanto, apesar de bom resultado, é apenas relato de um animal.

De acordo com as análises histopatológicas as neoplasias de origem epitelial (60%) foram mais freqüentes, como os carcinomas, adenocarcinomas e carcinomas de células escamosas, e os outros 40% restantes de origem mesenquimal, representado pelos condrossarcomas, fibrossarcomas, hemangiossarcoma e osteossarcomas. Estes resultados corroboram com os descritos por outros autores (MADEWELL et al., 1976; LANA; WITHROW, 2001; LEFEBVRE; LANGOVA et al., 2004; KUEHN; WORTINGER, 2005; KONDO et al., 2008; COHN 2014). Os resultados comparativos entre tempo de sobrevida global, de remissão e os tipos tumorais não foram estatisticamente significativos.

Neste trabalho os cães com tumores epiteliais demonstraram como média de sobrevida 280 dias, sendo o mínimo 71 dias e o máximo 725 dias (caso 16) do qual manteve-se livre da doença durante 210 dias. Neste caso o tratamento preconizado foram as sessões de quimioterapia, em conjunto com a cirurgia, sendo administrado piroxicam durante quatro meses consecutivos. Neste estudo não foi comparado o uso do piroxicam com o tempo de sobrevida, pois a maioria dos cães não se adaptaram a medicação. Em ambos os casos os animais foram classificados no estágio T3, sendo que o paciente com o tempo de sobrevida menor foi submetido a eutanásia por opção do proprietário, antes de finalizar todas as sessões. Os animais com tumores de origem mesenquimal alcançaram em média 264 dias de sobrevida, onde o menor tempo foi 30 dias e o maior 458 dias, lembrando que foram inclusos os dois animais com neoplasias de origem mista, pois de acordo com o exame histopatológico as prevalências das células tumorais eram de origem mesenquimal.

O caso de menor tempo de sobrevida fora classificado por meio do estadiamento em T5 com invasão do tumor a nível cerebral (caso 24) em que se realizou apenas uma sessão de quimioterapia, vindo a óbito em decorrência de episódios convulsivos intermitentes, e o de maior tempo de sobrevida (caso 6), foi submetido a três intervenções cirúrgicas, com cerca de quatro meses entre um procedimento e outro. Além do paciente que faleceu 30 dias após o diagnóstico,

outros dois animais com neoplasias mesenquimais não foram submetidos ao procedimento cirúrgico, em um deles devido à localização e extensão tumoral contra-indicando o procedimento cirúrgico (caso 5) e em outro animal preferiu-se manter algumas sessões do tratamento quimioterápico antes de realizar a cirurgia (caso 15). O tempo de crescimento deste tumor em comparação ao de origem epitelial foi mais rápido e a resposta ao tratamento quimioterápico foi menor, entretanto, não se realizou a comparação entre o tempo de crescimento dos tipos tumorais. A radioterapia vêm sendo o tratamento de escolha para as neoplasias nasais malignas, pois de acordo com a literatura apresentam maior sobrevida e controle da afecção. São vários os protocolos descritos na literatura (LANA; WITHROW, 2001; TUREK; LANA 2007; ELLIOT; MAYER, 2009; GIEGER et al., 2013). Entretanto, quando somados os resultados referentes ao tempo médio de sobrevida de algumas pesquisas (cerca de 377 dias) (ADAMS et al., 1998; KONDO et al., 2008; ADAMS et al., 2009; SONES et al., 2012; GIEGER et al., 2013) não se nota diferença tão expressiva aos resultados deste trabalho na questão de tempo médio de sobrevida dos animais tratados com quimioterapia e cirurgia (335 dias), porém os resultados não foram comparados ao número de animais e ao tempo de segmento dos demais trabalhos, e nem foram realizados testes estatísticos entre os trabalhos.

Os animais submetidos ao procedimento cirúrgico demonstraram resultados significativos, porém, o tempo de controle da afecção entre as modalidades terapêuticas utilizadas nesta pesquisa, não apresentou resultados significativo, mas o tempo de sobrevida global dos pacientes foi maior com resultados significativos naqueles animais que demonstraram remissão ($p=0,001$).

Em relação aos marcadores tumorais (VEGF, EGFR, COX-2, Ki67, PCNA e p53), não houve correlação em relação ao sexo, idade e raça, e também entre as manifestações clínicas e estadiamento tumoral. Apesar de pouca relação entre os tipos tumorais, não houve resultados estatísticos significativos entre as neoplasias e a expressão dos marcadores.

A expressão do VEGF neste estudo foi detectada em 80% das amostras, e em 100% das amostras de origem epitelial, resultados semelhantes aos do estudo de Shiomitsu et al. (2009), sendo em sua maioria expressão considerada forte. Já nos tumores mesenquimais a expressão foi visibilizada em 50% das amostras destes tipos histológicos, onde sua graduação variou mesmo dentre os subtipos

tumorais comuns como nos condrossarcomas, osteossarcomas e nos tumores mistos. Em relação ao tempo de sobrevida e remissão, a expressão do VEGF, não demonstrou nenhum resultado estatístico significativo, de acordo com os testes utilizados. Embora existam vários estudos demonstrando a expressão positiva do VEGF nas células tumorais utilizando metodologias distintas e analisando algumas outras variáveis, não foram encontrados resultados que confirmem a possível relação entre a expressão da proteína VEGF e outros fatores prognósticos, o que não possibilitou comparar a ausência de correlação significativa aqui observada entre a expressão tumoral de VEGF com o tempo de sobrevida e remissão da afecção, visto que 58% dos tumores epiteliais e 50% expressaram fortemente o VEGF.

As amostras avaliadas demonstraram a expressão do EGFR em 38% dos tumores avaliados com graduação diversificada entre os tipos e subtipos tumorais, entretanto com maior ocorrência nos epiteliais. Este resultado demonstra que o EGFR pode estar presente em neoplasias malignas de cães com origem mesenquimal e epitelial assim como observado em outros estudos (GAMA et al., 2009; SHIOMITSU et al., 2009; SELVARAJAH et al., 2012; CAMPOS et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2014; HANAZONO et al., 2015). O índice de positividade do EGFR entre as amostras avaliadas em comparação com outros estudos foi menor (SHIOMITSU et al., 2009; HANAZONO et al., 2015), este resultado pode estar relacionado ao número de amostras avaliadas ou ao tempo de fixação do tecido que podem influenciar na imunoreatividade deste marcador (SHIOMITSU et al., 2009). Quanto a ausência do marcador nos osteossarcomas nasais, o resultado foi semelhante ao do estudo realizado por Selvarajah et al. (2012), onde cães com osteossarcoma com expressão de EGFR fraca ou ausente demonstraram pior prognóstico. Estes resultados podem justificar a contradição entre os testes estatísticos que demonstram a influência da expressão do EGFR, onde na avaliação estimativa dos tempos medianos, o tempo de remissão foi menor naqueles animais em que a expressão foi moderada e forte, mas pelo teste multivariado (Cox) o que influenciou no tempo de remissão foi a expressão fraca ou ausente.

Os resultados foram significativos estatisticamente, na expressão moderada ou forte do EGFR em relação ao menor tempo de remissão da afecção pelos pacientes. Outros estudos não conseguiram correlacionar estatisticamente os resultados com a expressão do EGFR e o segmento clínico da afecção

(SELVARAJAH et al., 2012; HANAZONO et al., 2015). Assim como a participação do VEGF no prognóstico, a escassez de estudos de expressão de EGFR também é notória, o que impossibilita uma confrontação de resultados mais produtiva.

A detecção da expressão pela COX-2 em neoplasias nasais já foi descrita por outros autores em graus forte e moderado (BORZACCHIELLO; PACIELLO; PAPPARELLA, 2004; IMPELLIZZERI; ESPLIN, 2008; BELSHAW, 2010; CAMPOS et al., 2013). Neste estudo esta expressão foi detectada em cerca 62% das amostras. Já no estudo de Impellizeri e Esplin (2008), a expressão de COX-2 foi evidenciada em 95% dos casos. Belshaw et al. (2010), também alcançaram resultados semelhantes em 42 biópsias, onde 90% foram positivas para o COX-2. No entanto, em ambos os estudos, foram consideradas nas amostras além da marcação citoplasmática, a marcação nuclear, o que foi desconsiderado nas amostras avaliadas para este trabalho, sendo consideradas apenas expressão em membrana citoplasmática. Os resultados estatísticos que avaliaram a expressão da COX-2 foram significativos em relação ao tempo de sobrevida, onde os animais que demonstraram expressão considerada forte, obtiveram menor tempo de sobrevida em relação a aqueles com marcação ausente ou fraca, sendo diferente dos resultados descritos por Belshaw et al. (2010) dos quais não obtiveram resultados significativos entre o tempo de sobrevida e a expressão da COX-2 nos tecidos de carcinomas intranasais. Outros estudos não fizeram a correlação com o tempo de sobrevida e a expressão deste marcador em tumores intranasais, sendo apenas estudos em que comprovam a presença da COX-2 nestes tipos de tumores (CAMPOS et al., 2013). Entretanto, o resultado desta expressão não foi estatisticamente significativo na correlação com o tempo de remissão da doença, e também não houve associação estatisticamente significativa entre a expressão de COX-2 e o tipo histológico, diferentemente dos resultados demonstrados em outro estudo de neoplasias malignas em mama (HELLER et al., 2005).

O Ki67 e PCNA demonstraram marcação em todas as neoplasias malignas avaliadas. Altos níveis de PCNA em amostras tumorais de cães são geralmente associadas ao menor tempo de sobrevida e a resistência ao tratamento. No caso de tempo de sobrevida, neste trabalho os resultados não foram aos encontrados na literatura (NEWMAN, 2003). Já o Ki67, quando esteve presente em maior quantidade nos tecidos indicou menor tempo de sobrevida, pior prognóstico nos animais avaliados corroborando com a literatura (NEWMAN, 2003). No estudo,

realizado por Fu et al. (2014), apesar da expressão do Ki67 detectada nos núcleos das células avaliadas, não houve resultados estatisticamente significativos com a sobrevida, entretanto, os autores observaram que os animais com maior índice de expressão demonstraram menos tempo de sobrevida e menor resposta ao tratamento. Apesar de superexpressão dos marcadores Ki67 e PCNA, não foi possível correlacionar estes achados com o tempo de sobrevida e a remissão por meio dos testes estatísticos utilizados, porém, quando se calcula a média do tempo de sobrevida entre o grupo 1 e o grupo 2, nota-se, maior tempo de sobrevida entre aqueles que expressaram o Ki67 em menor quantidade (grupo 1), mas não houve relação com a resposta ao tratamento. Esta observação também esteve presente entre os grupos que expressaram o marcador PCNA.

A expressão do gene p53, foi visibilizado em apenas cinco animais, sendo possível de quantificar em apenas três animais, sendo dois tumores epiteliais e outro mesenquimal, diferentemente dos resultados de Gamblin et al. (1997) que observaram superexpressão deste anticorpo em adenocarcinomas nasais. Este resultado pode estar relacionado com a fixação do tecido ou baixo índice de apoptose nas células das amostras avaliadas. Neste estudo não foi possível correlacionar estatisticamente os resultados da expressão do p53 com o tempo de sobrevida e remissão da afecção.

Apesar da existência de inúmeros estudos sobre as expressões de marcadores, na espécie humana, os resultados relacionados com o prognóstico e a utilização de terapias dirigidas sob a expressão de marcadores, ainda permanece controverso. Na Medicina Veterinária, as pesquisas ainda são escassas, mas com o aumento da expectativa dos animais e o avanço da especialidade oncológica, a necessidade de desenvolvimento de mais pesquisas vem aumentando, sendo cada vez mais importante a investigação de indicadores que possam colaborar com novas terapias. No entanto, se na espécie humana, o comportamento tumoral é distinto em vários processos e desigual em várias de suas interações, o desafio é ainda maior no âmbito veterinário, por abranger um número maior de espécies, e dentro das espécies inúmeras raças.

Os resultados do presente estudo revelaram-se promissores no sentido em que demonstraram a expressão dos marcadores VEGF, EGFR, COX-2, Ki67, PCNA e p53 nos tumores epiteliais e mesenquimais de cavidade nasal e seios paranasais, inclusive resultados significativos quanto ao tempo de sobrevida e tempo de

remissão como indicadores de prognóstico. Em relação as manifestações clínicas, outro dado importante referente a sobrevida e remissão, do qual foi principalmente a presença de epistaxe, epífora e deformidade facial. Os resultados também foram promissores quanto a rinoscopia e o emprego do exame tomográfico, inclusive a utilização do estadiamento (ADAMS et al., 2009), modificado por nós, que demonstrou resultados significativos que podem ser úteis no prognóstico desta afecção. E, por fim, apesar de não curativo e sem resultados estatisticamente significativos, as modalidades terapêuticas utilizadas apresentaram aumento no tempo do controle ou remissão da afecção influenciando no tempo da sobrevida global, principalmente na qualidade de vida destes pacientes.

Estas constatações podem abrir portas para investigações a respeito de novas abordagens diagnósticas, prognósticas e terapêuticas, para neoplasias nasais e sinonasais em cães.

8 CONCLUSÃO

A análise dos resultados obtidos permitiu concluir:

✓ Os animais que foram submetidos ao procedimento cirúrgico em conjunto com a quimioterapia, demonstraram aumento no tempo de sobrevida estatisticamente significativo, mas não obtiveram os mesmos resultados significativos quanto ao tempo de controle ou remissão da afecção, entretanto os cães que apresentaram controle ou remissão da doença, alcançaram aumento significativo no tempo de sobrevida global em relação aos que não apresentaram remissão.

✓ Presença de epífora, deformidade facial, foram correlacionadas respectivamente com menor sobrevida e menor tempo de remissão. Epistaxe, quando presente, demonstrou pior prognóstico, com menor tempo de sobrevida e menos tempo no controle da afecção, segundo resultados dos testes estatísticos.

✓ O estadiamento utilizado no estudo apresentou resultados estatisticamente significativos sendo considerado útil como indicador de prognóstico nos animais portadores de neoplasia nasal e sinonasal.

✓ A expressão moderada e forte da COX-2 demonstrou estatisticamente diminuição no tempo de sobrevida global nos animais avaliados.

✓ Os resultados estatísticos da expressão do EGFR foram significativos na influência do tempo de remissão, porém não foram significativos no tempo de sobrevida.

✓ Os demais marcadores, VEGF, Ki67, PCNA e p53, apesar de expressos em grande parte das amostras avaliadas, não apresentaram resultados significativos em relação ao tempo de sobrevida e de remissão.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, W. M.; KLEITER, M. M.; THRALL, D. E.; KLAUER, J.M.; FORREST, L. J.; LA DUE, T. A.; HAVINGHURST, T. C. Prognostic significance of tumor histology and computed tomographic staging for radiation treatment response of canine nasal tumors. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 50, n. 3, p. 330-35, 2009.
- ADAMS, W. M.; MILLER, P.; VAIL, D.; FORREST, L.; MACEWEN, E. An accelerated technique for irradiation of malignant canine nasal and paranasal sinus tumor. **Veterinary Radiology**, v. 39, p. 475-81, 1998.
- ALMEIDA, E. M. P.; PICHE, C.; SIROIS, J.; DORE, M. Expression of cyclo-oxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. **The Journal of histochemistry & cytochemistry**, v. 49, n. 7, p. 867-875, 2001.
- ARISAWA, E. A. L.; MORAES, E.; DA ROCHA, R. F.; ALMEIDA, J. D. Marcadores Biológicos: PCNA e Ki67- Breve Revisão. **Revista Faculdade de Odontologia São José dos Campos**, v. 2, n. 1, p. 54-60, 1999. Disponível em: <<http://ojs.fosjc.unesp.br/index.php/cob/article/viewFile/37/17>> Acesso em: 31 Jul 2015.
- AULER, F. A. B.; ANDRADE NETO, J. P.; YOSHITOSHI, F. N. Doenças em cavidade nasal e seios paranasais. In: JERICÓ, M. M.; ANDRADE NETO, J. P.; KOGIKA, M. M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. seção B, cap. 145. p. 1257-69.
- AULER, F. A. B.; TORRES, L. N.; PINTO, A. C. B. C.F.; UNRUH, S. M.; MATERA, J. M., STOPIGLIA, A. J. Tomography, radiography, and rhinoscopy in diagnosis of benign and malignant lesions affecting the nasal cavity and paranasal sinuses in dogs: comparative study. **Topics In Companion Animal**, v. 30, n. 2, p. 39 - 42, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1938973615000458>> Acesso em: 26 Jun 2015.
- BARBOSA, T. V.; ROSAS, M. R. P. R.; COSTA, A. C.; RAPOPORT, A. Valor prognóstico do Ki67 no carcinoma indiferenciado de grandes células de glândula salivar maior: estudo de 11 casos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 69, n. 5, p. 629-34, 2003.
- BASERGA, R. Growth regulation of the PCNA gene. **Journal of Cell Science**, v. 98, p- 433-36, 1991.
- BELSHAW, Z.; CONSTANTINO- CASAS, F.; BREARLEY, M. J.; DUNNING, M. D. HOLMES, M. A.; DOBSON, J. M. COX-2 expression and outcome in canine nasal carcinomas treated with hypofractionated radiotherapy. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 9, n. 2, p. 141–148, 2010. Disponível em<<http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1476-5829.2010.00243.x/asset/j>> Acesso em: 20 Jan 2015.

BORZACCHIELLO, G.; PACIELLO, O.; PAPPARELLA, S. Expression of cicloxygenase-1 and -2 in canine nasal carcinomas. **Journal Comparative Pathology**, v. 131, p. 70-76, 2004.

BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Monoclonal antibody Ki- 67: its use in histopathology. **Histopathology**, v. 17, p. 489-03, 1990.

BURA, M.; SEIWERTH, S.; VLADIKA, I.; PEROVI, D.; NAGY, CORIC, M.; BIJELI, L.; KRAJINA, Z.; MITRECIC, Z. Possible prognostic significance of P53 and Ki 67 in inverted Sinonasal Papilloma. **Collegium Antropologicum**, v. 31, n. 2, p.545–49. 2007. Disponível em: < <http://www.researchgate.net/publication/5992486> > Acesso em: 15 Jul 2015.

CAMPOS, L. C.; SILVA, J. O.; SOUZA, C. M.; CAMPOS, C. B.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; HORTA, R.S.; LAVALLE; G. E.; CASSALI, G. D. Adenocarcinoma papilar de seio nasal em cão: Abordagem histomorfológica, imunofenotípica e terapêutica. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, n.16, p. 1-6. 2013. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/actavet/41-suple-1/CR_16.pdf> Acesso em: 20 Set 14.

CAMPOS, M.; DUCATELLE, R.; KOOISTRA, H. S.; RUTTERMAN, G.; DUCHATEAU, L.; POLIS, I.; DAMINET, S. Immunohistochemical Expression of potential therapeutic targets in canine thyroid carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, p. 564-70, 2014. Disponível me :<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvim.12330/epdf>> Acesso em: 23 Jul 2015.

CECCARELLI, C.; PIAZZIL, G.; PATERINI, P.; PATALEO, M. A.; TAFFURELI, M.; SANTINI, D.; MARTINELLI, G. N.; BIASCO, G. Concurrent EGFR and Cox-2 expression in colorectal cancer: proliferation impact and tumour spreading. **Annals of Oncology**, v. 16, n. 4, p. 74-79, 2005. Disponível em: <http://annonc.oxfordjournals.org/content/16/suppl_4/iv74.short> Acesso em: 10 Jul 2015.

CIARDELLI F.; TROIANI, T.; BIANCO, R.; ORDITURA, M.; MORGILLO, F.; MARTINELLI, E.; MORELLI, M.P.; CASCONI, T.; TORTORA, G. Interaction between the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathways: a rational approach for multi-target anticancer therapy. **Annals of Oncology**, v. 17, p. 109-114, 2006.

COHN, L. A. Canine Nasal Disease. **Veterinary Clinical Small Animal**, v. 44, p. 75– 89, 2014.

DAVIDSON, A.P.; MATHEWS, K. G.; KOBLIK, P. D.; THÉON, A. Doenças do nariz e dos seios nasais, In: ETTINGER, S. J., FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Seção 8. cap 123.p. 1059- 82.

DE NARDI, A. B.; DALECK, C. R.; SOUZA, C. H. M.; AMORIN, R. L.; RODASKI, S.; CALDERON, C.; TORRE, R. Cyclooxygenase-2 expression in mamarian tumors in dogs and correlation to histologic and biologic behavior. **Veterinay and Comparative Oncology**, v. 3, n. 1, p. 56-57. 2005.

DE VOS, J.; RAMOS VEGA, S.; NOORMAN, E.; DE VOS, P. Primary sinus squamous cell carcinoma in three dogs treated with piroxicam with carboplatin or toceranib. **Veterinary Comparative Oncology**, v. 10, n. 3, p. 206-13, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22236048>> Acesso em: 24 Abr 12.

ELLIOT, M. K.; MAYER, M. N. Radiation therapy for tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses in dogs. **The Canine Veterinary Journal**, v. 50, p. 309-12, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2643460/>> Acesso em: 25 Out 2009.

FEARON, E. R.; BOMMER, G. T. Progressing from Gene Mutations to Cancer. In: ABELOFF, M. D.; ARMITAGE, J. O.; LICHTER, A. S.; NIEDERHUBER, J. E.; KASTAN, M. B.; MCKENNA, W. G. **Clinical oncology**, 4. ed. Philadelphia: Elsevier, 2008. p. 207-222.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LeCOURTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 669-76, 2003.

FETTE-CONTE, A. C.; SALLES, A. B. C. F. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia**, v. 24, n. 2, p. 85-89, 2002.

FONATSCH, C.; DUCHROW, M.; RIEDER, M. H.; SCHLÜTER, C.; GERDES, J. Assignament of the human Ki67 genes (mk 167) to 10q25-qter. **Genomics**, v. 11, p. 476-77, 1991.

FU, D. R.; KATO, D.; WATABE, A.; ENDO, Y.; KADOSAWA, T. Prognostic utility of apoptosis index, Ki67 and survivin expression in dogs with nasal carcinoma treated with orthovoltage radiation therapy. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.76, n.11, p. 1505–12. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4272984/pdf/jvms-76-1505.pdf>> Acesso em: 16 Jul 2015.

GAMA, A.; GÄRTNER, F.; ALVES, A.; SCHIMITT, F. Immuno- histochemical expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in canine mammary tissues. **Research of Veterinary Science**, v. 87, p. 432–437, 2009.

GAMBLIN, R. M.; SAGARTZ, J. E.; COUTO, C. G. Overexpression of p53 tumor supressor protein is spontaneously arising neoplasms of dogs. **American Journal Veterinary Research**, v. 58, n. 8, p. 857-863, 1997.

GHOSH, N.; CHAKI, R.; MANDAL, V.; MANDAL, S.C. COX-2 as a target for cancer chemotherapy. **Pharmacological Report**, v. 62, p. 233-44, 2010.

GIEGER, T.; SIEGEL, S.; ROSEN, K.; JACKSON, D.; WARE, K.; KISELOW, M.; SHIOMITSU, K. Reirradiation of canine nasal carcinomas treated with coarsely fractionated radiation protocols: 37 Cases. **Journal Of American Animal Hospital Association**, v. 49, p. 318–324, 2013.

GUIMARÃES, M. J.; CARVALHO, M. I.; PIRES, I.; PRADA, J.; GONZALEZ - GIL, A.; LOPES, C.; QUEIROGA, F. L. Concurrent Expression of Cyclo-oxygenase-2 and Epidermal Growth Factor Receptor in Canine Malignant Mammary Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 150, p. 27-34. 2014. Disponível em :<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997513001151>>Acesso em: 10 Jul 2015.

HAHN, K. A.; KNAP, D. W.; RICHARDSON, R. C. Clinical response of nasal adenocarcinoma to cisplatin chemotherapy in 11 dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 200, p. 355-57, 1992.

HALL, P. A.; LEVINSON, D. A. Review: assessment of cell proliferation in histological material. **Journal Of Clinical Pathology**, v. 43, n.2, p. 184-2, 1990.

HANAZONO, K.; FUKUMOTO, S.; KAWAMURA, Y.; ENDO, Y.; KADOSAWA, T.; IWANO, H.; UCHIDE, T. Epidermal growth factor receptor expression in canine transitional cell carcinoma. **The Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 77, n. 1, p. 1–6. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4349531/pdf/jvms-77-001.pdf>>Acesso em: 25 Jun 2015.

HARLEY, C. B. Telomerase and cancer therapeutics. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, p. 167- 179. 2008.

HARRIS, B. J.; LOURENÇO, B. N.; DOBSON, J. M.; HERRTAGE, M. E. Diagnostic accuracy of three biopsy techniques in 117 dogs with intra-nasal neoplasia . **Journal of Small Animal Practice**, v. 55, p. 219–224, 2014. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jsap.12187/epdf>> Acesso em 12 Out 2015.

HARTWELL, L. H., WEINERT, T. A., Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, v. 246, p. 629-33, 1989.

HELLER, D. A.; CLIFFORD, C. A.; GOLDSCHMIDT, M. H.; HOLT, D. E.; SHOFR, F. S.; SMITH, A.; SORENMO, K. U. Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. **Veterinary Pathology**, v. 42, p. 776–780. 2005.

HOWE, R. L. Inflammation and breast cancer. Cyclooxygenase/prostaglandin signaling and breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 9, p. 210- 219, 2007.

HUANG, J.; ZHANG, D.; XIE, F.; LIN, D. The potential role of COX-2 in cancer stem cell-mediated canine mammary tumor initiation: an immunohistochemical study.

Journal of Veterinary Science, v. 16, n. 2, p. 225-231, 2015. Disponível em: <<http://synapse.koreamed.org/Synapse/Data/PDFData/0118JVS/jvs-16-225.pdf>> Acesso em: 25 Jul 2015.

IMPELLIZERI, J. A.; ESPLIN, D. G. Expression of ciclooxigenase-2 in canine nasal carcinomas. **The Veterinary Journal**, v. 176, p. 408-410, 2008.

JANKOWSKI, M.; SPUŽAK, J.; KUBIAK, K.; GRZEGORY, M.; HALOŃ, A.; GLIŃSKA-SUCHOCKA, K.; NICPOŃ, J.; VLIZLO, V.; MAKSYMOWYCH, I. Rhinoscopy in dogs. **Tom 12**, v.3, n. 45, p. 323- 27. 2010.<Disponível em [https:// www.irbis-nbuv.gov.ua](https://www.irbis-nbuv.gov.ua)> Acesso em: 15 Out 2015.

JOST, M. K. C.; RODECK, U. The EGF receptor-an essencial regulator of multiple epidermal functions. **European Journal of Dermatology**, v. 10, p. 505-10, 2000.

KARI, C. C. T.; ROCHA DE QUADROS, M.; RODECK, U. Targeting the epidermal growth factor in cancer: apoptosis takes center stage. **Cancer Research**, v. 38, p. 73-80, 2003

KERBEL, R. S. Tumor angiogenesis. **New England Journal of Medicine**, v. 358, p. 2039-49, 2008.

KENNEDY, A. S.; RALEIGH, J. A.; PEREZ, G. M.; CALKINS, D. P.; THRALL, D. E.; NOVOTNY, D. B.; VARIA, M. A. Proliferation and hypoxia in human squamous cell carcinoma of the cervix: first report of combined immunohistochemical assays. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 37, p. 897–905, 1997.

KIRKWOOD, B. R.; STERNE, J. A. C. **Essential medical statistics**, 2 ed. Massachusetts:Blackwell Science, 2006. p. 502.

KLEINBAUM, D. G. **Survival analysis: a self-learning text**. 1 ed. New York: Springer, 1996. p. 324.

KLEITER, M.; MALARKEY, D. E.; RUSLANDER, D. E.; THRALL, D. E. Expression of cyclooxygenase-2 in canine epithelial nasal tumors. **Veterinary Radiology & Ultrassound**, v. 45, n. 3, p. 255-260, 2004.

KONDO, Y.; MATSUNAGA, S.; MOCHIZUKI, M.; KADOSAWA, T.; NAKAGAWA, T.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N. Prognosis of Canine Patients with Nasal Tumors According to Modified Clinical Stages Based on Computed Tomography: A Retrospective Study. **The Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 70, n. 3, p. 207-212, 2008. Disponível em: <[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/70/3/70_3_207/ article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/70/3/70_3_207/article)> Acesso em: 21 Out 2010.

KUMMER, C.; COELHO, T. C. B. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 4, p. 498-512, 2002.

LANGOVA, V.; MUTSAERS, A. J.; PHILIPS, B.; STRAW, R. Treatment of eight dogs with nasal tumours with alternating doses of doxorubicin and carboplatin in conjunction with oral piroxicam. **Australian Veterinary Journal**, v. 82, n. 11, p. 676-80, 2004.

LEFEBVRE, J; KUEHN, N. F.; WORTINGER, A. Computed tomography as an aid in the diagnosis of chronic nasal disease in dog. **Journal of Small Animal Practice**, n. 46, p. 280-85, 2005.

LEVINE, A. J.; PERRY, M. E.; CHANG, A.; SILVER, A.; DITTMER, D.; WU, M.; WELSH, D. The 1993 Walter Hubert lecture: the role of p53 tumour suppressor gene in tumorigenesis. **British Journal of Cancer**, v. 29, n. 3, p. 409-6, 1994.

LYNCH, H.T.; BOLAND, C.R. Genética do câncer, In: GOLDMAN, L.; SCAFER, A. I. **Goldman Cecil Medicina**; 24. ed. Rio de Janeiro: Saunders-Elsevier, 2014. p. 1357-59.

MASON, S. L.; MADDOX, T. W.; LILLIS, S. M.; BLACKWOOD, L. Late presentation of canine nasal tumours in a UK referral hospital and treatment outcomes. **Journal of Small Animal Practice**, v. 57, n. 7, p. 347-53, 2013.

MALINOWSKI, C. Canine and feline neoplasia. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, n. 2, v. 21, p. 89-94, 2005.

McCARTHY, T. C.; McDEIRMAN, S. L. Rhinoscopy. 1990. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 20, n. 5. p 1265-90.

McCARTHY, T. C. Rhinoscopy: the Diagnostic Approach to Chronic Nasal Disease, In: McCARTHY, T.C. **Veterinary Endoscopy**. St. Louis: Saunders Elsevier, 2005. p. 137-200.

MODIANO, J. F.; BREEN, M. **The Etiology of Cancer**, In: WITHROW; MACEWEN: Small Animal Clinical oncology. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 3-12

MORRIS, R. S.; DUNN, K. J.; DOBSON, J. M.; WHITE, R. A. S. Effects of radiotherapy alone and surgery and radiotherapy on survival in dogs with nasal tumors. **Journal of Small Animal Practice**, v. 35, p. 567-73, 1994.

NEWMAN, J. S. Diagnostic pathology for the cancer patient. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 21, n.2. p. 89-94, 2005.

NICHOLSON, R. I. G. J, HARPER, M. E. EGFR and cancer prognosis. **European Journal of Cancer**, v. 18, n. 2, p. 139-144. 2003.

NOONE, K. E. Rhinoscopy, pharyngoscopy and laryngoscopy. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 31, n. 4, p. 671-689, 2001.

NORTH, M. S. **An introduction to the principles of tumour biology**. In: NORTH; BANKS. Small Animal Oncology, Elsevier: Londres, 2009. p. 5-9

ONCEL, S.; COSGUL, T.; CALLI, C.; PINAR, E. Evaluation of P53, P63, P21,

- P27, Ki67 in paranasal sinus squamous cell carcinoma and inverted papilloma. **Indian Journal of Otolaryngology Head Neck Surgery**, v. 63, n. 2, p. 172– 177, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3102174/pdf/12070_2011_Article_252.pdf> Acesso em: 25 Jul 2015.
- ORTONNE, J. P. Anti-inflammatory vs. inflammatory treatments for actinic keratoses. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 2, n. 3-4, p. 135-140. 2003.
- OWEN, L.N. **TNM Classification of tumors in domestic animals**. Geneve: World Health Organization. p. 48-49, 1980.
- PAN, J.; KONG, L.; LIN, S.; CHEN, G. CHEN, Q.; LU, J. J. The clinical significance of coexpression of cyclooxygenase -2, vascular endothelial growth factors, and epidermal growth factor receptor in nasopharyngeal carcinoma. **The Laryngoscope**, v. 118, p. 170-75, 2009.
- PATNIAK, A.K. Canine sinonasal neoplasms: Clinicopathological study of 285 cases. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 25, p. 103-114, 1989.
- PIETRA, M.; SPINELLA, G.; PASQUALI, F.; ROMAGNOLI, N.; BETTINI, G.; SPADARI, A. Clinical findings, rhinoscopy and histological evaluation of 54 95 dogs with chronic nasal disease. **Journal of Veterinary Science**, v. 11, p. 249–255, 2010. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2924487/>> . Acesso em: 18 Set 2010
- PONDER, B. A. Cancer Genetics. **Nature**, v. 411, p. 336-41, 2001.
- RASSNICK, K. M.; GOLDKAMP, C. E.; ERB, H.N.; SCRIVANI, P. V.; NJAA, B. L.; GIEGER, L. T.; TUREK, M. M.; McNIEL, E. A.; PROULX, D. R.; CHUN, R.; MAULDIN, G. E.; PHILIPS, B. S.; KRISTAL, O. Evaluation of factors associated with survival in dogs with untreated nasal carcinomas: 139 cases (1993-2003). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 229, n. 3, p. 401-406, 2006.
- REIF, J. S. BRUNS, C., LOWER, K. S. Cancer of the nasal cavity and paranasal sinuses and exposure to environmental tobacco smoke in pet dogs. **American Journal of Epidemiology**, v. 147, n. 5, p. 488-92, 1998.
- RIEDEL, F., G. K., KI, M., HORMANN, K., GRANDIS, J. R. EGFR antisense treatment of human HNSCC cell lines down-regulates VEGF expression and endothelial cell migration. **International Journal of Oncology**, v. 21, p. 11-16, 2002.
- RUNGSIPAT, A.; TATEYAMA, S.; YAMAGUCHI, R.; UCHIDA, K.; MIYOSHI, N.; HAYASHI, T. Immunohistochemical Analysis of c-yes and c-erbB-2 Oncogene Products and p53 Tumor Suppressor Protein in Canine Mammary Tumors. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 61, n. 1, p. 27–32, 1999.
- RISHIKESH, M. K.; SADHANA, S. S. Prostaglandins and cyclooxygenase: their probable role in cancer. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 35, n. 1, p. 3-12, 2003.

- SAKO, T. Y.; AKIHARA, Y. T.; OHMACHI, T.; YAMASHITA, K.; KADOSAWA, T.; NAKADE, T.; UCHIDA, E.; OKAMOTO, M.; HIRAYAMA, K.; TANIYAMA, H. Neuroendocrine carcinoma in the nasal cavity of ten dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 155-63, 2005.
- SAWHNEY, N.; HALL, P. A. Ki67 structure, function and new antibodies. **The Journal of Pathology**, v. 168, p. 161-62, 1992.
- SELVARAJAH, G. T.; VERHEIJE, M. H.; KIK, M.; SLOB, A.; ROTTIER, P. J.; MOL, J. A.; KIRPENSTEIJN, J. Expression of epidermal growth factor receptor in canine osteosarcoma: association with clinicopathological parameters and prognosis. **Veterinary Journal**, v. 193, p. 412-419, 2012.
- SERRANO, R.; THEODORO, T. R.; PINHAL, M. A. S. Oncogenes, genes supressores de tumores, microRNAs e o desenvolvimento de tumores. **Revista Brasileira de Medicina - Especial Oncologia**, v. 71, p. 4-10, 2014. Disponível em: <http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=5869> Acesso em: 27 Jul 2015.
- SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes and Development**, v. 13, p. 1501-12, 1999.
- SHIOMITSU, K.; JOHNSON, C. L.; MALARKEY, D. E.; PRUIT, A. F.; THRALL, D. E. Expression of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor in malignant canine epithelial nasal tumours. **Veterinary Comparative Oncology**, v. 7, p. 106-114, 2009.
- SONES, E.; SMITH, A.; SCHLEIS, S.; BRAWNER, W.; ALMOND, G.; TAYLOR, K.; HANEY, S.; WYPIJ, J.; KEYSERLEBER, M.; ARTHUR, J.; HAMILTON, T.; LAWRENCE, J.; GIEGER, T.; SELLON, R.; WRIGHT, Z. Survival times for canine intranasal sarcomas treated with radiation therapy: 86 cases (1996-2011). **Veterinary Radiology Ultrasound**, v. 54, n. 2, p. 194-201, 2013. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vru.12006/epdf>> Acesso em: 24 Set 2015.
- TUREK, M. M.; LANA, S. E. Canine nasosinal tumors. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, G. **Small animal clinical oncology**. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007, p. 525-39.
- TSOU, Y. A.; HUANG, H. J.; WANG, T. C.; TAI, C. J.; CHEN, C. M.; CHEN, C. Y. C. Evaluation of correlation of cell cycle proteins and Ki67 interaction in paranasal sinus inverted papilloma prognosis and squamous cell carcinoma transformation. **Biomed Research International**, v. 2014, p. 1-16, 2014. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/634945/>> Acesso em: 15 Jul 2015.
- VENKER-van HAAGEN, A. The nose and nasal sinuses, In: VENKER-van HAAGEN, A. **Ear, nose, throat and tracheobronchial diseases in dogs and cats**, Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft, 2005. p. 51-81.

WILLAT, D.J., MCCORNICK, M.S.; MORTON, R.P., STELL, P.M. Staging of maxillary cancer, which classification? **Annals of Otology. Rhinology. Laryngology**, v.96, p.137-40, 1987.

WITHROW, S. J. Tumors of the respiratory system, In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, G. **Clinical veterinary oncology**, Philadelphia: J.B.Lippincott, 1989. p 215-33.

WITHROW, S. J. Cancer of nasal Planum, In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, G.: **Small animal clinical oncology**, St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p.511-14.

VANEHERNBERGHEN, M.; DAY, M. J.; DELVAUX, F.; GABRIEL, A.; CLERCX, C.; PEETERS, D. An immunohistochemical study of the inflammatory infiltrate associated with nasal carcinoma in dogs and cats. **Journal of Comparative Pathology**, v. 141, p. 17-26, 2009.

VOGELSTEIN, B.; KINZLEIR, K. W. Cancer genes and the pathways they control. **Nature Medicine**, v. 10, p.789-99, 2004.

XIONG, Y.; ZHANG, H.; BEACH, D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. **Cell**, v. 71, p. 505-14.1992.

YOSHITOSHI, F. N. **Contribuição ao estudo da rinoscopia na avaliação de afecções nasais no cão (Canis familiaris)**. 2003. 135 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

APÊNDICE A - Descrição da classificação dos animais baseado no estadiamento modificado de Adams (2009), de acordo com as alterações encontradas pela extensão tumoral

N	ID	Cavidade Nasal	Lise óssea	Seio paranasal	Seio frontal	Massa SC/SM	Nasofaringe	Placa cribiforme	Lise periorbital	Órbita	Cérebro	T
1	101498	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	4
2	87995	1	Sim	Sim	Sem	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	3
3	232147	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	4
4	232549	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	4
5	231837	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	5
6	187812	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	3
7	231188	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	3
8	228545	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	5
9	141972	1	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	3
10	229883	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	4
11	225499	1	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	5
12	231890	1	Sim	Sim	Sem	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	3
13	234968	2	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	3
14	234120	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	5
15	235888	2	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	4
16	235470	2	Sim	Sim	Sem	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	3
17	187042	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	4
18	238830	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	4
19	240293	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	5
20	241739	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	5
21	242672	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	5
22	241974	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	5
23	234131	1	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	4
24	242333	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	5
25	229960	2	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	4

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

Legenda: ID (identificação do prontuário HOVET-FMVZ/USP); SC (subcutâneo); SM (submucosa); T (estadiamento).

APÊNDICE B - Descrição da classificação animais após segundo exame tomográfico baseado no estadiamento de modificado de Adams (2009), de acordo com as alterações encontradas pela extensão tumoral

N	ID	Cavidade Nasal	Lise óssea	Seio paranasal	Seio frontal	Massa SC/SM	Nasofaringe	Placa cribiforme	Lise periorbital	Órbita	Cérebro	T
2	87995	1	Sim	Sim	-	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	4
3	232147	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	5
7	231188	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	4
11	225499	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	5
12	231890	2	Sim	Sim	-	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	5
13	234968	2	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	3
15	235888	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	4
16	235470	2	Sim	Sim	-	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	3

Fonte: (AULER, F. A. B., 2015)

Legenda: ID (identificação do prontuário HOVET-FMVZ/USP); SC (subcutâneo); SM (submucosa); T (estadiamento).

ANEXO A**Formulário de adesão ao estudo entregue aos proprietários****Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1) O objetivo do estudo, do qual seu cão participa, é avaliar a contribuição e eficácia do tratamento de neoplasias malignas em cavidade nasal, utilizando quimioterapia isoladamente, ou rinotomia associadas, e a comparação dos métodos quanto a estabilidade da doença.

2) Após ser submetido à rinoscopia e com resultado confirmado histologicamente como neoplasia maligna (tumores epiteliais) e sem tratamento anterior, será realizada tomografia computadorizada de cabeça e tórax com o intuito de avaliar a extensão da lesão e possível ocorrência de metástase. De acordo com o resultado do exame tomográfico o paciente será submetido a terapia adjuvante ou coadjuvante, ou seja, apenas quimioterapia ou quimioterapia e cirurgia combinada. A opção do protocolo quimioterápico será baseada no estadiamento clínico do paciente. A técnica cirúrgica empregada será a rinotomia convencional. Serão realizadas coletas de sangue para hemograma completo e exames bioquímicos de função hepática e função renal.

3) Os riscos anestésicos devem ser considerados, como parada cardiorrespiratória ou anafilaxia, porém os animais são devidamente monitorados e os protocolos anestésicos são seguros, minimizando intercorrências significativas. Os desconfortos gerados por meio da tomografia seria reação alérgica ao contraste (Iohexol®) que será aplicado por via intravenosa durante o procedimento, já a quimioterapia pode trazer efeitos colaterais como náusea, vômito, diarreia, perda de pelos (pouco frequente) entre outros que serão devidamente explicados. Nos casos de

cirurgia, a dificuldade respiratória e dor seriam as maiores complicações.

4) Não há benefício direto ao proprietário ou a cura total do animal. Trata-se de um estudo experimental e comparativo de protocolos utilizados no tratamento de câncer em cavidade nasal de cães. Somente no final do estudo será concluído os benefícios do estudo.

5) Durante as etapas do estudo caberá ao profissional responsável pelo estudo esclarecer eventuais dúvidas. A responsável pelo estudo é a pós-graduanda **Fernanda Auler**, seu telefone comercial **3091-1229** e seu e-mail: fe_bueno@hotmail.com ou feauler@usp.br, e seu orientador Prof. Dr. Angelo João Stopiglia.

6) É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento de deixar de participar do estudo, porém é necessário estar ciente de que pode haver piora clínica do paciente, mas caso opte por dar continuidade ao tratamento nesta Instituição, não deverá ser negado.

7) As informações obtidas (relativas tanto ao proprietário quanto ao animal) serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgados informações pessoais, portanto está garantido o direito de confidencialidade.

8) O pesquisador ou responsável pelo estudo tem o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa ou após aprovação da CEUAVET.

Declaro e afirmo ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim descrevendo o estudo, e autorizo voluntariamente incluir meu animal neste estudo, ficando claro seus propósitos, os procedimentos a serem realizados em meu animal e seus desconfortos e riscos. Estando ciente de que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou perda de qualquer benefício que meu animal possa ter adquirido ou em seu atendimento neste Serviço.

Proprietário

Testemunha (casos de analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o consentimento deste proprietário para a participação de seu animal neste estudo.

Responsável pelo estudo

Data ____/____/____