

Avaliação da resposta inflamatória sistêmica induzida por carcinoma ductal *in situ* em cadelas

Paulo Henrique Braz^{1*}, Marcel Capelini Sartoretto², Gustavo Lourenço Lima¹, Carolina Pereira Marinho³, Marcos Eufrasio Bonato Xavier², Sandrielle Goes de Campos Deboleto⁴

¹Docentes do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário da Grande Dourados – UNIGRAN. Dourados – MS Brasil. E-mail: pauloh.braz@hotmail.com

²Discente do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário da Grande Dourados – UNIGRAN. Dourados – MS Brasil. E-mail: m.c.marcel69@hotmail.com

³Médica Veterinária Aprimorada em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais no Centro Universitário da Grande Dourados – UNIGRAN. Dourados – MS Brasil. E-mail: carolmarinho207@gmail.com

⁴Biomédica do Laboratório de Patologia Clínica no Centro Universitário da Grande Dourados – UNIGRAN. Dourados – MS Brasil. E-mail: sandrieledeboleto@outlook.com

*Autor para correspondência

RESUMO. Em tumores mamários, é comum alterações inflamatórias, causadas principalmente em neoplasias que metastatizam. Este trabalho tem por objetivo avaliar a concentração de Proteína C Reativa, correlacionada as alterações de proteínas totais e albumina em cadelas com carcinoma ductal *in situ* e demonstrar as alterações hematológicas encontradas. Foram utilizadas 13 cadelas diagnosticadas com carcinoma ductal *in situ*, triados pelo exame citopatológico e confirmado pela histopatologia. Conclui-se que a PCR é uma proteína de fase aguda que se eleva independente das proteínas totais e albumina e as alterações hematológica são de pouca relevância para o diagnóstico de carcinoma ductal *in situ*.

Palavras chave: proteínas de fase aguda, inflamação, tumor mamário canino, biomarcadores

Evaluation of systemic inflammatory response induced by ductal carcinoma *in situ* in dogs

ABSTRACT. In breast tumors, inflammatory changes are common, mainly caused by neoplasias that metastasize. This work aims to evaluate the concentration of C Reactive Protein, correlating the alterations of total proteins and albumin in dogs with ductal carcinoma *in situ* and to demonstrate the hematological alterations found. Thirteen dogs diagnosed with ductal carcinoma *in situ* were screened by cytopathological examination and confirmed by histopathology. It is concluded that CRP is an acute phase protein that rises independently of total proteins and albumin and hematological changes are of little relevance for the diagnosis of ductal carcinoma *in situ*.

Keywords: acute phase proteins, inflammation, canine mammary tumor, biomarkers

Evaluación de la respuesta inflamatoria sistémica inducida por carcinoma ductal *in situ* en perras

RESUMEN. En tumores mamarios, es común cambios inflamatorios, causados principalmente en neoplasias que metastatizan. Este trabajo tiene por objetivo evaluar la

concentración de Proteína C Reactiva, correlacionada con las alteraciones de proteínas totales y albúmina en perras con carcinoma ductal *in situ* y demostrar los cambios hematológicos encontrados. Se utilizaron 13 perras diagnosticadas con carcinoma ductal *in situ*, clasificadas por el examen citopatológico y confirmado por la histopatología. Se concluye que la PCR es una proteína de fase aguda que se eleva independientemente de las proteínas totales y albúmina y los cambios hematológicos son de poca relevancia para el diagnóstico de carcinoma ductal *in situ*.

Palabras clave: proteínas de fase aguda, inflamación, tumor mamario canino, biomarcadores

Introdução

O organismo possui alguns mecanismos de defesa contra agentes agressores, a primeira reação a um destes agentes é a resposta inata, não específica. A resposta de fase aguda trata-se de uma reação sistêmica que se desenvolve após o organismo ser exposto a algum distúrbio local ou sistêmico, que podem ser ocasionados por agentes infecciosos, lesões tissulares, traumas ou procedimentos cirúrgicos, neoplasias ou processos inflamatórios (Gruys et al., 2005, Carvalho et al., 2008).

Em processos inflamatórios ocorre a liberação por parte do organismo de proteínas de fase aguda (APPs), dentre as proteínas que aumentam na inflamação, chamadas de APPs positivas. A Proteína C-Reativa (PCR) é uma das mais importantes, pois tem uma função semelhante à de um anticorpo, devido ao fato de realizar a ativação do sistema complemento, fazendo com que fagócitos capturem patógenos. Além disso, a PCR pode neutralizar a produção de superóxido, realizar degranulação neutrofílica e minimizar o acúmulo de neutrófilos em tecidos inflamados (Gershov et al., 2000, Squassoni et al., 2011).

Realizar a quantificação das APPs é um método importante de verificar a resposta inata do sistema imunológico do organismo frente a agentes agressores ou alterações do próprio organismo. As APPs são classificadas como positivas quando estão aumentadas ou negativas quando estão diminuídas. As concentrações destas proteínas podem ter o seu valor aumentado ou diminuído em 25% em relação a valores normais, dependendo do distúrbio a que o organismo está sendo acometido (Archer, 2008, Jain, Gauta & Naseem, 2011).

Várias doenças em caninos acarretam em um aumento nos níveis séricos de PCR, como por exemplo, leptospirose, parvovirose, babesiose, também ocorre em tumores (linfoma e hemangiossarcoma) e traumas cirúrgicos, além de pancreatite aguda, anemia imunomediada, artrite,

glomerulonefrite e processos inflamatórios experimentais (Nakamura et al., 2008, Anziliero et al., 2013).

A prevalência dos tumores mamários faz com que diferentes técnicas laboratoriais sejam estudadas para auxiliar no prognóstico e tratamento do paciente com câncer mamário.

Material e Métodos

O experimento teve aprovação do Comitê de Ética para Uso Animal (CEUA-UNIGRAN) com protocolo 011/15 e executado no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, situado no Hospital Veterinário da UNIGRAN, localizado no município de Dourados-MS. As amostras de sangue foram colhidas entre os meses de novembro de 2015 a abril de 2016 para a obtenção de soro e execução dos exames de Proteína-C-Reativa, albumina, proteínas totais e hemograma.

Foram utilizadas 13 cadelas diagnosticadas com neoplasia mamária, do tipo carcinoma ductal *in situ*, triados pelo exame citopatológico e confirmado pela histopatologia. Após confirmado o diagnóstico, realizou-se a colheita de sangue venoso e o sangue acondicionados em dois tubos, sendo um com anticoagulante do tipo EDTA-K2 para realização da análise hematológica, e outro tubo sem anticoagulante para exames bioquímicos séricos de albumina e proteínas totais.

Para realização dos exames de PCR foi utilizado 25µl de amostra de soro, usando-se partículas de látex revestidas com anticorpo monoclonal anti-PCR por aglutinação indireta, para instilação no Kit comercial (Wama Diagnóstica®), considerado negativo quando havia total ausência de aglutinação, indicativo de concentração inferior a 6 mg/litro. Quando ocorreu aglutinação do soro, a concentração era igual ou superior a 6 mg/litro. As amostras positivas eram diluídas em salina (NaCl a 0,9%) nas proporções 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 para semi-quantificar o resultado.

Os resultados do PCR dos cães foram comparados aos testes bioquímicos de albumina, proteínas totais e do hemograma utilizando-se o teste de Exato de Fischer.

Resultado e discussão

Dentre os animais examinados, a PCR foi positiva em 23,1% (n=3). Quando correlacionado as alterações séricas de proteínas totais e albumina com os valores semi-quantitativos de PCR aumentados, com $p < 0,05$, foi possível notar que não houve relação de dependência entre os testes, isso ocorre devido a PCR ser uma proteína de fase aguda elevando-se independentemente das proteínas analisadas.

A hiperproteinemia ocorreu devido às complicações paraneoplásicas em 23,1% (n=3) dos animais estudados, como relatado por Dobson, Villiers & Morris (2006), em pacientes com mieloma ou leucemia crônica. Calazans et al. (2009), notaram que o valor de proteínas totais em cães sadios é menor do que em cães com linfoma.

Foi observado que a principal alteração nos níveis séricos de albumina foi a hipoalbuminemia, ocorrendo em 46,1% (n=6) dos animais estudados. De acordo com Murata, Shimada & Yoshimoka

(2004), a hipoalbuminemia em mamíferos portadores de neoplasias ocorre devido a albumina ser uma proteína de fase aguda negativa, por isso quando há presença de inflamação aguda, a concentração sérica diminui.

A necessidade de correlação entre o desenvolvimento do câncer e inflamação ocorre, devido a resposta inflamatória de defesa como moderadora para a reparação e regeneração tecidual. Isso pode ocorrer devido aos danos teciduais de forma infecciosa ou não infecciosa (Balkwill & Mantovani, 2002, Coussens & Werb, 2002, Braz et al, 2017). Braz et al. (2016) demonstraram que presença de infiltrado inflamatório em neoplasias, dificultando o diagnóstico, podendo as células neoplásicas serem confundidas com células displásicas, causadas pela inflamação.

Foi possível notar que os carcinomas mamários ductal *in situ* geram uma inflamação do tipo leve, sendo que em todos os casos a concentração de PCR foi de 6mg/dL. A PCR geralmente se eleva em processos inflamatórios leves com aumento entre de 10-40 mg/L. Já em inflamações mais severas e infecções bacterianas, as concentrações séricas elevam-se entre 40-200 mg/L (Aguiar et al., 2013).

Tabela 1. Valores Hematológicos dos 13 animais com carcinomas mamários ductal *in situ*, diagnosticados entre o período de novembro de 2015 a abril de 2016.

Índice	Média	Desvio Padrão	Valores de Referência
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	12607,69	5868,096	6.000 - 17.000
Hemácias (milhões/mm ³)	5,28	0,75	5,5 – 8,0
Hemoglobina (g/dL)	11,12	1,9	10,0 - 18,0
Hematócrito (%)	35,9	8,02	35 – 55
Neutrófilos (células/ μl)	9379,554	4901,22	3.000 - 11.5000
Linfócitos (células/ μl)	1472,954	820,7222	1.000 - 4.800
Eosinófilos (células/ μl)	804,2923	1184,562	150 - 1.250
Plaquetas (/mm)	184.077	89800,17	180.000 - 400.000

Todos os parâmetros hematológicos dos cães examinados permaneceram dentro dos valores de referência. Resultados diferentes foram observados por Silva et al., (2014), que encontraram alterações em 24,2% dos pacientes (39/161), sendo 18 animais com alterações no eritrograma e 30 no leucograma.

Em animais com neoplasias é comum à ocorrência de alterações hematológicas como anemia e trombocitopenia, porém existem poucos

relatos, sobre a incidência, prevalência e sua importância clínica, apesar de ser descrita na literatura veterinária. (Childress, 2012).

Para Coussens & Werb (2002) as agressões aos tecidos causadas pelos tumores, provocam uma resposta inflamatória a fim de sanar as lesões desencadeadas, para isso ocorre à liberação de leucócitos como neutrófilos, monócitos, e eosinófilos na corrente sanguínea, para que alcancem o local acometido. Devido à produção

de citocinas e quimiocinas pelas células tumorais, vários leucócitos são atraídos ao local da lesão, como neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, eosinófilos, mastócitos e linfócitos. Nas neoplasias são encontradas células inflamatórias e plaquetas ativadas (Dvorak, 1986, Mueller & Fusenig, 2004).

Conclusões

A PCR pode ser utilizada para acompanhar o quadro clínico do paciente, com diagnóstico de inflamações agudas precocemente, visto que as neoplasias desencadeiam um processo inflamatório. A hiperproteinemia e a hipoalbuminemia foram achados importantes para correlacionar com a alteração da PCR.

Os valores hematológicos não demonstraram boa sensibilidade para o acompanhamento do quadro clínico do animal com carcinoma ductal *in situ*, quando analisado isoladamente. No entanto, em quadros crônicos é possível que haja alterações, com aumento de neutrófilos em bastões, embora não tenha sido encontrado neste estudo.

Referências bibliográficas

- Aguiara, F.J.B., Ferreira-Júnior, M. Salec, M.M., Cruz-Neto, L.M., Fonseca, L.A.M., Sumitac, N.M., Duarte, N.J.C., Lichtenstein, A. & Duarte, A.J.S. 2013. Proteína C reativa: aplicações clínicas e propostas para utilização racional. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 59:585-592.
- Anziliero, D., Bassi, E., Pain, K.M., Valle, S.F. & Kreutz, L.C. 2013. Determinação dos níveis séricos de proteína C reativa (crp) em cães com alterações dos parâmetros hematológicos. *Ciência Animal Brasileira*, 14, 265-272.
- Balkwill, F., Mantovani, A. 2002. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. v.357, 539-545.
- Braz, P.H., Brum, K.B., Souza, A.I. & Abdo, M.A.G.S. 2016. Comparação entre a citopatologia por biópsia com agulha fina e a histopatologia no diagnóstico das neoplasias cutâneas e subcutâneas de cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 36, 197-203.
- Braz, P.H., Kuhn, L.S., Deboletto, S.G.C., Matos, A.T. & Fraga, T.L. 2017. Comportamento da Proteína C Reativa em vacas leiteiras, comparado ao California Mastitis Test. *Pubvet*. 11, 860-863.
- Calazans, S.G., Daleck, C.R., Fagliari, J.J., Repetti, C.F., De Nardi, A.B., Castro, J.H.T., Fernandes, S.C., César, J.R.F. & Rodigheri, S.M. 2009. Proteinograma sérico de cães saudáveis e com linfoma obtido por eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 61, 1044-1048.
- Carvalho, C.C.D., Rêgo, E.W., Queque, M. & Soares, P.C. 2008. Avaliação da proteína C reativa, fibrinogênio e leucograma em cadelas com e sem piometra. *Medicina Veterinária*. 2, 3-10.
- Childress, M.O. 2012. Hematologic Abnormalities in the Small Animal Cancer Patient. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 42, 123-155.
- Coussens, L.M. & Werb, Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature*, 420, 19-26.
- Dobson, J., Villiers, E. & Morris, J. 2006. Diagnosis and management of leukaemia in dogs and cats. *Practice*, 28, 22-31.
- Dvorak, H. F. 1986. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *New England Journal of Medicine*. 315, 1650-1659.
- Gershov, D., Kim, S., Brot, N. & Elkon, K.B. 2000. C-Reactive Protein Binds to Apoptotic Cells, Protects the Cells from assembly of the Terminal Complement Components, and Sustains an Antiinflammatory Innate Immune Response: Implications for Systemic Autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine*. 192, 1353-1363.
- Gruys, E., Toussaint, M.J.M., Niewold T.A., & Koopmans, S.J. 2005. Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University Science*. 6, 1045-1056.
- Jain, S., Gautan, V. & Naseem, S. 2011. Acute phase proteins: a diagnostic tool. *Journal of Pharmacy and Biomedical Sciences*, 3, 118-127.
- Magalhães, A.M., Ramadina, R.R., Barros, C.S.L. & Peixoto, P.V. 2001. Estudo comparativo entre citopatologia e histopatologia no diagnóstico de neoplasias caninas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 21, 23-32.
- Mueller, M. M. & Fusenig, N. E. 2004. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4, 839-849.
- Murata, H., Shimada, N. & Yoshimoka, M. 2004. Current research on acute phase proteins in

veterinary diagnosis: an overview. *Veterinary Journal*, 168, 28-40.

Nakamura, M., Takahashi, M., Ohno, K. & Tsujimoto, H. 2008. C-reactive protein concentration on dogs with various diseases. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70, 127-131.

Rakoff-Nahoum, S. 2006. Why Cancer and Inflammation?. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 79, 123-130.

Silva, A.H.C., Silva, D.M., Ribas, C.R., Dittrich, R.L., Dornbusch, P.T. & Guérios, S.D. 2014. Alterações no hemograma de cadelas com

neoplasia mamária. *Ciência Animal Brasileira. Goiânia*, 15, 87-92.

Squassoni, G. F., Motheo, T.F., Feliciano, M.A.R. & Vicente, W.R.R. 2011. Concentração sérica de proteína c-reativa em cadelas hípidas, gestantes ou com piometra. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 9, 1-8.

Article History:

Received 4 August 2017

Accepted 5 September 2017

Available on line 10 October 2017

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 4.0, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.