

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

**SOBREVIVÊNCIA PÓS-CIRÚRGICA EM NEOPLASIAS DA
CAVIDADE ORAL NO CÃO E NO GATO
RELAÇÃO DO MARCADOR NUCLEAR Ki-67 COM A
SOBREVIVÊNCIA**

LISA ALEXANDRA PEREIRA MESTRINHO

Dissertação de Mestrado em Oncologia

2010

LISA ALEXANDRA PEREIRA MESTRINHO

**SOBREVIVÊNCIA PÓS-CIRÚRGICA EM NEOPLASIAS DA
CAVIDADE ORAL NO CÃO E NO GATO
RELAÇÃO DO MARCADOR NUCLEAR Ki-67 COM A
SOBREVIVÊNCIA**

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre
em Oncologia, submetida ao Instituto de
Ciências Biomédicas de Abel Salazar da
Universidade do Porto.

Orientadora

Doutora Maria Manuela Grave Rodeia Espada
Niza

Professora Associada com Agregação
Faculdade de Medicina Veterinária da
Universidade Técnica de Lisboa

Co-orientador

Doutor Carlos Alberto da Silva Lopes

Professor Catedrático

Instituto de Ciências Biomédicas de Abel
Salazar da Universidade do Porto

Agradecimentos

O Instituto Português de Oncologia de Lisboa (IPOL), Departamento de Imunohistoquímica em colaboração com a Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa permitiu a realização do Mestrado em Oncologia. Gostaria, por isso, de agradecer em primeiro lugar ao IPOL, na pessoa do Professor Doutor Jorge Soares, esta oportunidade que considero ter sido de grande valor.

Quero, no entanto, exprimir individualmente o meu agradecimento e gratidão:

- À minha orientadora Professora Doutora Maria Manuela Rodeia Niza pela sua orientação clínica e do projecto em todas as suas fases.
- Ao meu co-orientador Professor Doutor Carlos Lopes pela interface e orientação final na realização desta tese.
- À Dr.^a Teresa Carrapiço Pereira do Departamento de Imunohistoquímica do IPOL pelo seu profissionalismo, dedicação e paciência durante a fase de processamento das amostras.
- À Professora Doutora Conceição Peleteiro, Prof. Doutor Pedro Faísca e Doutora Tânia Carvalho pelos seus esclarecimentos e orientação no diagnóstico e contagem das lâminas.
- Ao Dr. Mauro Bragança pelo apoio e orientação no tratamento de dados.
- Aos meus colegas e amigos Mestre Ana Santana e Dr. Nuno Leal pela sua compreensão e ajuda no acompanhamento dos casos clínicos durante todo o período de estudo.
- A todos os colegas que referenciaram os casos que permitiram a realização deste trabalho.
- Ao Ricardo Santos pela sua preciosa ajuda nas formatações e leitura final.
- Aos meus pais e à minha irmã por estarem sempre presentes nas alturas mais difíceis da minha vida, pelo seu apoio incondicional.

Resumo

Objectivos: Neste estudo pretendeu-se determinar qual o tempo de sobrevivência em cão e gato com neoplasia oral maligna, submetidos a cirurgia correlacionando-o com os dados clínicos, histopatológicos e o marcador nuclear Ki-67.

Material e Métodos: Este estudo incluiu 47 animais, 29 cães e 18 gatos, com neoplasia maligna oral não odontogénica, submetidos a cirurgia durante o período de Janeiro de 2008 a Janeiro de 2009. Os critérios de inclusão foram: presença de neoplasia com indicação cirúrgica estabelecida através de exame histopatológico, avaliação radiográfica e/ou por tomografia axial computadorizada e acompanhamento clínico do paciente durante 1 ano após a cirurgia. Procedeu-se ao registo da idade, género e raça dos animais, localização, estadiamento T e N e classificação histopatológica do tumor, assim como o tempo de sobrevivência através do acompanhamento clínico. Foi realizado o estudo imunohistoquímico para o Ki-67 (clone MIB-1, Dako) nas amostras colhidas cirurgicamente e conservadas em blocos de parafina, utilizando o método do polímero (Envision, Dako). As amostras foram separadas de acordo com o limite de expressão em inferior e igual ou superior a 50%. Foi efectuada a estimativa do produto limite de Kaplan-Meier e a análise Cox para os dados clínicos, histopatológicos e imunohistoquímicos com influência no tempo de sobrevivência global.

Resultados: O tempo médio de sobrevivência global observado foi de 224,7 dias ($\bar{\delta} \pm 24,4$ dias) no cão, encontrando-se 42% dos animais vivos ao fim de 1 ano, e 73,8 dias ($\bar{\delta} \pm 12,0$ dias) no gato, verificando-se 0% de animais vivos ao fim de 1 ano e uma sobrevivência de 16% aos 90 dias. Os dados associados com a sobrevivência foram o tipo histológico, o estadiamento e a localização da neoplasia. Verificou-se uma associação positiva embora sem significado estatístico entre uma maior expressão de marcação de Ki-67 e um menor tempo de sobrevivência global.

Conclusão: Os resultados deste estudo sugerem que as neoplasias da cavidade oral em que a expressão de Ki-67 é maior, são acompanhadas de um menor tempo de sobrevivência. Contudo, são necessários mais estudos que permitam esclarecer cabalmente qual o valor do marcador Ki-67 como factor de prognóstico dos tumores malignos da cavidade oral dos carnívoros domésticos.

Palavras-chave: Neoplasia oral, Ki-67, tempo de sobrevivência, cão, gato

Abstract

Objectives: This study aims to determine the survival time in dogs and cats with non odontogenic oral malignancy submitted to surgery and to assess the prognostic value of clinical and histopatological factors and Ki-67 expression.

Methods and materials: This study included 47 animals, 29 dogs and 18 cats, with non odontogenic oral malignancy, submitted to surgery between January 2008 and January 2009. Inclusion criteria were: presence of oral neoplasia with surgical indication established through histopathological analysis, radiographic and/or tomographic evaluation of the tumor and one year *follow up* after surgery. Registration of age, gender, location, T and N stage, histopathological type and survival time were made.

The surgical samples were submitted to immuno-histochemical study for Ki-67 (clone MIB-1, Dako) and were performed on paraffin-embedded surgical collected tissues using the polymer system (Envision, Dako). The samples were separated according to the expression limit of inferior to 50% and equal or superior to 50%. Survival time was estimated using the Kaplan Meier product limit and Cox analysis was used to assess correlation of clinical, histopathological and immunohistochemical data with survival time.

Results: Median survival time was 224,7 days ($\bar{\delta}\pm 24,4$ days) in the dog, with 42% of live animals at one year. In the cat, median survival time was 73,8 days ($\bar{\delta}\pm 12,0$ days), with 0% of live animals at one year, 16% survival after 90 days. Factors associated with survival were histological type, stage and location of the neoplasia. A positive association was established between an increased expression of Ki-67 and a shorter survival time, although without statistical significance.

Conclusion: Results from this study suggested that oral neoplasia with increased Ki-67 expression is related with a shorter survival time. However further studies are needed to assess the prognostic value of Ki-67 in oral malignancy of the domestic carnivore.

Key words: oral malignancy, Ki-67, survival time, cat, dog

Índice geral

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice geral	vi
Índice de quadros e gráficos	viii
Índice de figuras	x
Índice de abreviaturas e símbolos	xi
1. Introdução	1
1.1 Enquadramento	2
1.2 Neoplasias da cavidade oral nos carnívoros domésticos	5
1.2.1 <i>Carcinoma espinocelular</i>	5
1.2.2 <i>Melanoma maligno</i>	7
1.2.3 <i>Fibrossarcoma</i>	8
1.2.4 <i>Outras neoplasias</i>	9
1.3 Estadiamento tumoral	9
1.4 Ki-67 como factor de prognóstico	11
1.5 Oncologia cirúrgica	13
1.6 Objectivo	15
2. Material e métodos	16
2.1 Introdução	17
2.2 Registo de dados	17
2.3 Estudo imunohistoquímico	18
2.4 Métodos de quantificação de imuno-reactividade e avaliação imunohistoquímica	19
2.5 Análise estatística	19
3. Resultados	21
3.1 Dados clínicos	22
3.2 Tempo de Sobrevivência global	26
3.2.1 <i>Espécie</i>	26
3.2.2 <i>Idade</i>	27
3.2.3 <i>Género</i>	27
3.2.4 <i>Localização</i>	27
3.2.5 <i>Estadiamento</i>	29
3.2.5.1 <i>Estadiamento T</i>	29
3.2.5.2 <i>Estadiamento N</i>	30
3.2.6 <i>Tipo histológico</i>	30
3.2.7 <i>Comparação de resultados por tipo histológico mais frequente</i>	32
3.2.8 <i>Mortalidade</i>	33

3.2.9 <i>Expressão para o marcador nuclear Ki-67</i>	33
3.2.9.1 <i>Relação entre a expressão de Ki-67 com a sobrevivência global</i>	33
4. Discussão	35
5. Conclusão e perspectivas futuras	46
5. Bibliografia	48
6. Anexo	56
Ficha de seguimento.....	57

Índice de tabelas e gráficos

Tabelas

Tabela 1	Neoplasias de origem não odontogénica descritas nos carnívoros doméstico	3
Tabela 2	Classificação TNM para tumores sólidos em animais domésticos	10
Tabela 3	Estadiamento clínico dos tumores da cavidade oral	11
Tabela 4	Caracterização da população em estudo	23
Tabela 5	Diagnóstico dos tumores com marcação positiva para o marcador nuclear Ki-67	24
Tabela 6	Distribuição da expressão do marcador nuclear Ki-67 para a totalidade das amostras estudadas	26
Tabela 7	Distribuição da expressão do marcador nuclear Ki-67 pelas neoplasias coradas positivamente	25 27
Tabela 8	Caracterização das amostras em estudo por tipo histológico mais frequente (CE, FS e MM)	32
Tabela 9	Causas de morte no cão e no gato submetidos a cirurgia de neoplasia oral	33

Gráficos

Gráfico 1	Curva de Kaplan-Meier mostrando o tempo de sobrevivência global estratificado por espécie em 29 cães e 18 gatos	27
Gráfico 2	Curva de Kaplan-Meier relacionando o tempo de sobrevivência global de 28 cães submetidos a cirurgia com a localização da neoplasia	28
Gráfico 3	Curva de Kaplan-Meier relacionando o tempo de sobrevivência global de 17 gatos submetidos a cirurgia com a localização da neoplasia	28
Gráfico 4	Curva de Kaplan-Meier descrevendo a sobrevivência global de 29 cães submetidos a cirurgia por estadiamento T	29
Gráfico 5	Curva de Kaplan-Meier descrevendo o tempo médio de sobrevivência global de 17 gatos submetidos a cirurgia por estadiamento T	30
Gráfico 6	Curva de Kaplan-Meier descrevendo o tempo de sobrevivência global de 29 cães submetidos a cirurgia por estadiamento N	30
Gráfico 7	Curva de Kaplan-Meier descrevendo o tempo de sobrevivência global	31

dos 28 cães submetidos a cirurgia para neoplasia oral por tipo histológico

Gráfico 8 Curva de Kaplan-Meier descrevendo o tempo de sobrevivência global de 13 gatos com CE submetidos a cirurgia 31

Gráfico 9 Curva de Kaplan-Meier descrevendo a sobrevivência global de 25 cães e gatos submetidos a cirurgia, estratificados por expressão para o marcador nuclear Ki-67 34

Índice de figuras

- Figura 1** Neoplasias orais em cães submetidos a cirurgia (A – CE com 22
localização mandibular, B - MM com localização na mucosa)
- Figura 2** Neoplasias orais em gatos submetidos a cirurgia (A – FS com 23
localização maxilar, B - CE com localização mandibular)
- Figura 3** Fotomicrografias (ampliação 400X) de amostras com marcação positiva 24
para Ki-67 em mais de 50% das células (A – MM, cão, B – FS, gato, C
– CE, cão, D – OS, cão)
- Figura 4** Fotomicrografias (ampliação 400X) de amostras com marcação positiva 26
para Ki-67 em menos de 50% das células (A – CE, gato, B – MM, cão,
C – CE, cão, D – CE, gato)

Índice de abreviaturas e de símbolos

%	Porcentagem
µl	Microlitro
µm	Micrometro
AgNOR	Silver stained nucleolar organizer regions
CD117	Cluster of differentiation 117
CE	Carcinoma espinocelular
c-erbB2	Gene c-erbB2
cm	Centímetros
DAB	Diaminobenzidina
FS	Fibrossarcoma
G0	Fase G0 do ciclo celular
G1	Fase G1 do ciclo celular
G2	Fase G2 do ciclo celular
GR1	Grupo 1
GR2	Grupo 2
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogénio
HE	Hematoxilina eosina
IHQ	Imunohistoquímica
IM	Intra-muscular
Kg	Quilograma
Ki-67	Factor de proliferação nuclear Ki-67
LF	Linfoma
M	Fase de Mitose do ciclo celular
mg	Miligramas
MIB-1	Clone do anticorpo Ki-67
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MM	Melanoma Maligno
OMS	Organização Mundial de Saúde
OS	Osteossarcoma
<i>p</i>	Nível de significância
p.v.	Peso vivo
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
pH	Potencial hidrogeniónico
RT-PCR	Reverse transcriptase polycycle chain reaction
S	Fase S do ciclo celular
SC	Sub-cutânea
SG	Sobrevivência global
TAC	Tomografia axial computadorizada
TBS	Solução tampão 0.1 mol/l Tris base, 0.9% NaCl; pH 7.4
TNM	<i>Tumor Node Metastasis</i> (classificação de tumores malignos (OMS))
X ²	Qui-quadrado
δ	Desvio padrão

1. Introdução

1.1 Enquadramento

A oncologia comparada é uma área do conhecimento que integra o estudo de neoplasias de ocorrência espontânea no paciente veterinário, inserindo-se nos estudos de biologia do cancro nos campos da patogenia, diagnóstico e tratamento (MacEwen, 1990). Embora os estudos de oncologia comparada incidam sobretudo no cão (*Canis familiaris*) outras espécies possuem também interesse comparativo nomeadamente o gato (*Felis catus*) (MacEwen, 1990). Muitos dos tumores presentes nos animais de companhia partilham com alguma frequência factores de risco com os seres humanos (Snyder *et al.*, 2004). O facto de estas espécies terem um curto tempo de vida, determina uma rápida progressão das neoplasias, o que associado à circunstância de existirem diversas semelhanças anatómicas, biológicas, histopatológicas, genéticas e moleculares com os tumores do Homem, faz com que o cão e o gato surjam como modelos experimentais úteis para estudos clínicos em medicina humana (MacEwen, 1990; Vail e MacEwen, 2000; Bretone *et al.*, 2003; Hansen e Khanna, 2004; DiBernardi *et al.*, 2007).

A ocorrência de neoplasias nos carnívoros domésticos tem vindo a aumentar, devido sobretudo ao desenvolvimento de melhores cuidados médico-veterinários que tem contribuído para uma diminuição da mortalidade associada a problemas nutricionais e infecciosos, aumentando a sua esperança média de vida. Também os avanços conseguidos na área do diagnóstico e da terapêutica, associados a uma maior sensibilidade e a um aumento do poder de compra por parte dos proprietários, muito tem contribuído para esta situação (Withrow e Vail, 2007).

Nos carnívoros domésticos a cavidade oral é a quarta localização mais frequente de desenvolvimento de neoplasias, representando cerca de 3 a 7% de todos os cancros no cão e aproximadamente 3% no gato (Oakes *et al.*, 1993; Liptak e Withrow, 2007). Os tumores da cavidade oral podem ter origem no lábio, gengiva, mucosa oral, mandíbula, maxila, palato duro, soalho bucal, língua, estruturas dentárias e amígdalas (Head *et al.*, 2002). Estão descritas neoplasias com origem em todos os tecidos que constituem a cavidade oral (Tabela 1). A sua drenagem linfática inclui o centro linfático mandibular, os linfonodos retrofaríngeos, os da cadeia cervical até ao pré-escapular e o mediastínico anterior (Saar e Getty, 1986).

Os tumores que ocorrem com maior frequência no cão são, por ordem decrescente, o melanoma maligno (MM), o carcinoma espinocelular (CE), o fibrossarcoma (FS) e o osteossarcoma (OS) (Horsting *et al.*, 1998; Dennis *et al.*, 2006). No gato surge com maior frequência o CE, seguido do FS, linfoma (LF) e MM (Stebbins *et al.*, 1989; Liptak e Withrow, 2007). Estes tumores têm comportamentos variáveis em relação ao envolvimento dos linfonodos regionais e à sua capacidade de metastização à distância.

Enquanto o MM frequentemente metastiza à distância ou nos linfonodos regionais, o mesmo já se não verifica no CE ou no FS. Neste último, a metastização ganglionar é infrequente, no entanto, ambas as neoplasias manifestam-se localmente de forma agressiva, invadindo frequentemente o tecido ósseo (Liptak e Withrow, 2007).

Tabela 1 – Neoplasias de origem não odontogénica descritas nos carnívoros domésticos (Adaptado de Head *et al.*, 2002).

Tumores malignos de origem não odontogénica
Tumores epiteliais
Carcinoma espinocelular
Carcinoma verrucoso
Adenocarcinoma
Carcinoma indiferenciado
Carcinoma secundário
Tumores neuroendócrinos
Carcinóide (carcinoma neuroendócrino)
Tumores melanocíticos
Melanoma
Tumores mesenquimatosos
Fibrossarcoma
Leiomiossarcoma
Rabdomiossarcoma
Hemangiossarcoma
Hemangiopericitoma
Neurofibrossarcoma
Sarcoma associado ao <i>Spirocerca lupi</i>
Sarcoma indiferenciado
Outros (Histiocitoma, lipoma, etc)
Tumores das células granulosas
Tumor maligno das células granulosas
Tumores do osso
Osteossarcoma
Condrossarcoma
Tumor Multilobular do osso
Tumores hematopoéticos e dos tecidos relacionados
Linfoma
Plasmocitoma
Mastocitoma

Apesar dos avanços na área da oncologia oral, tanto a nível do diagnóstico como da terapêutica, o prognóstico das neoplasias orais permanece muito pobre. Independentemente de parâmetros com importância no prognóstico como o tipo, o grau histológico, o estadiamento TNM (*Tumor, Node, Metastasis*) e a localização, os tumores da cavidade oral embora apresentem uma agressividade variável, esta é normalmente bastante marcada. Mesmo dentro do mesmo tipo histológico a evolução clínica bem como a resposta à terapêutica são muito variáveis (Klein, 2003).

Actualmente as modalidades de tratamento das neoplasias orais não odontogénicas incluem a cirurgia como tratamento primário preferencial, seguida de

terapêutica adjuvante que inclui a radioterapia, a quimioterapia, a hipertermia, a criocirurgia, a terapia fotodinâmica e a imunoterapia (McCaw *et al.*, 2000; Boria *et al.*, 2004; DiBernardi *et al.*, 2007; Grier e Mayer, 2007; Coyle e Garret, 2009). Têm sido realizados diversos estudos com o objectivo de avaliar diferentes protocolos de tratamento pós-cirúrgico que, de uma maneira geral, têm conduzido ao aumento do tempo de sobrevivência. A cirurgia utilizada como tratamento único depende essencialmente, ou em grande parte, do estadiamento, do tipo e do grau histológico do tumor (Gillette e Gillette, 1995; Blackwood e Dobson, 1996; Theon *et al.*, 1997; Bateman *et al.*, 1999; Soergel *et al.*, 1999; Kessler 2006).

Em oncologia são reconhecidos vários factores de prognóstico (Withrow e Vail, 2007). Podem ser individuais como o sexo ou a idade, ou relacionados directamente com a neoplasia como a dimensão, a invasão loco-regional, entre outros.

Os factores de prognóstico identificados e estudados nos tumores orais baseiam-se na sua classificação histológica, localização e no seu estadiamento (Théon *et al.*, 1997; Proulx *et al.*, 2003; Northrup *et al.*, 2006). A classificação histológica do tumor assume um papel de destaque, na medida em que se encontra associada a diferentes comportamentos biológicos em termos de invasão local e metastização (Northrup *et al.*, 2006; Liptak e Withrow, 2007). Está demonstrado que o CE tem um melhor prognóstico comparativamente com o FS e o MM (Theon *et al.*, 1997; Northrup *et al.*, 2006; Coyle e Garret, 2009). Também a localização dos tumores orais se reveste de grande importância. Sabe-se que a localização rostral tem um melhor prognóstico em termos de resposta à cirurgia do que a localização caudal, assim como a localização mandibular comparativamente com a maxilar, a sublingual ou a tonsilar (Verstraete, 2005; Kessler, 2006; Northrup *et al.*, 2006). A dimensão da neoplasia é também relevante como factor determinante de prognóstico sobretudo no que diz respeito ao seu controlo local através da radioterapia (Hammer *et al.*, 1995; Théon *et al.*, 1997; Proulx *et al.*, 2003; Northrup *et al.*, 2006; Liptak e Withrow, 2007).

Recentemente tem-se verificado um interesse crescente sobre os mecanismos moleculares do cancro e a identificação de marcadores biológicos com importância no diagnóstico, prognóstico e tratamento de neoplasias, na tentativa de identificar factores que promovam uma melhor resposta às diversas estratégias terapêuticas (Klein, 2003; Hansen e Khanna, 2004).

Os marcadores biológicos no cancro são constituídos por oncogenes, factores de crescimento, marcadores de ciclo celular e moléculas relacionadas com a angiogénese (Withrow e Vail, 2007). A sua identificação permite prever a agressividade tumoral, delinear tratamentos mais adequados bem como identificar novos alvos terapêuticos. A baixa eficácia associada a protocolos de terapêutica única, tem reforçado a necessidade

de se recorrer a novas abordagens, quer multimodais, quer dirigidas a alvos específicos do cancro (Modiano *et al.*, 1999; Millanta *et al.*, 2002; Klein, 2003; Scase *et al.*, 2006).

Em medicina veterinária as publicações sobre factores de prognóstico no cancro têm vindo a aumentar, embora no que diz respeito às neoplasias da cavidade oral continuem a ser limitadas. Um estudo em gato que incluiu 55 amostras de CE oral, demonstrou que a expressão da ciclo-oxigenase 2, constituía um marcador imunohistoquímico preditivo de prognóstico e uma potencial molécula alvo em terapia dirigida (Hayes *et al.*, 2006), o que foi posteriormente corroborado através da utilização de anti-inflamatórios não esteróides como terapia neoadjuvante no CE oral (DiBernardi *et al.*, 2007). Makaichi *et al.* (2007) estudaram a expressão da actividade de genes codificantes das metaloproteinases de matriz tipo 2 em diferentes neoplasias oro-nasais em cães por métodos de biologia molecular (RT-PCR). Concluíram que existia uma possível relação entre a expressão destes genes e a malignidade tumoral, uma vez que a sua expressão foi superior nas amostras de tumores malignos tais como o MM e o CE, comparativamente com as amostras de tumores benignos como a epulide acantomatosa. Num outro trabalho realizado em 62 amostras de tumores melanocíticos orais e cutâneos de cães, foram identificados factores com importância no prognóstico, nomeadamente a localização (oral vs cutânea), a presença de invasão linfática, tendo ainda sido relacionada a expressão positiva de Ki-67 (clone MIB-1) com a diminuição do tempo de sobrevivência global (Millanta *et al.* 2002).

1.2 Neoplasias da cavidade oral nos carnívoros domésticos

1.2.1 Carcinoma espinocelular

O CE é o tumor oral mais frequente no gato representando 60 a 75% das neoplasias da cavidade oral, e o segundo mais frequente no cão com 20 a 30% dos casos (Stebbins *et al.*, 1989; Kosovsky *et al.*, 1991; Horsting *et al.*, 1998; Head *et al.*, 2002; Withrow e Vail, 2007). Atinge sobretudo animais idosos, com uma idade média de 8 a 9 anos no cão (Liptak e Withrow, 2007) e 10 anos no gato (Head *et al.*, 2002). Não há predisposição racial ou de género (Head *et al.*, 2002). Foi demonstrado que cães com peso superior a 23 kg possuem o dobro de probabilidades de desenvolver CE não tonsilar (Todoroff *et al.*, 1979; Dhaliwal *et al.*, 1998; Liptak e Withrow, 2007; Coyle e Garret, 2009).

Em medicina veterinária, têm sido publicados nos últimos anos alguns trabalhos sobre análise de risco em oncologia oral. Num estudo de caso controlo foi demonstrado que existe um risco cinco vezes superior para a ocorrência de CE oral nos gatos que

usam coleira anti-parasitária (Bretone *et al.*, 2003). Outros factores de risco, com significado estatístico também identificados nesta espécie, incluem a alimentação predominantemente pastosa e a dieta composta por atum em lata, em que se verificou um aumento de risco de 3,6 e 4,7 vezes, respectivamente. A exposição de gatos a um ambiente com tabaco conduziu a um aumento de risco de desenvolverem CE duas vezes superior relativamente a gatos não expostos (Bretone *et al.*, 2003). Um estudo posterior veio estabelecer uma forte associação, embora sem significado estatístico, entre a mutação do gene *p53* e a exposição ao tabaco (Snyder *et al.*, 2004), o que sugere que este tem um papel importante como mediador da mutação do gene. Estes resultados estão de acordo com os verificados em medicina humana, em que se constatou que o tabaco constitui um factor de risco para CE oral (Brennan *et al.*, 1995; Hart *et al.*, 1999). Também à semelhança do que se observou em gatos, no Homem são considerados como factores de risco a dieta (Franceschi *et al.*, 1999), a higiene oral (Moreno-Lopez *et al.*, 2000) e a exposição ocupacional a pesticidas (Schildt *et al.*, 1999).

No gato tanto a gengiva mandibular como a maxilar constitui a localização em que o CE ocorre com maior frequência, seguida da sublingual, tonsilar e faríngea (White, 1992; Snyder *et al.*, 2004; Liptak e Withrow, 2007). No cão é a gengiva maxilar e mandibular, o palato-duro, o palato-mole, a faringe e a tonsila as localizações mais comuns (Todoroff *et al.*, 1979; Kosovsky *et al.*, 1991; Dhaliwal *et al.*, 1998; Liptak e Withrow, 2007). Em ambas as espécies a ulceração e a invasão óssea são frequentes, embora o CE apresente uma capacidade de metastização moderada (Liptak e Withrow, 2007).

A localização rostral é tida como um factor de prognóstico favorável, enquanto a caudal tem um pior prognóstico uma vez que os linfonodos omo-laterais se encontram envolvidos em 5 a 10% dos casos, e a metastização à distância ocorre em 3% dos animais (Kosovsky *et al.*, 1991; Theon *et al.*, 1997; Boria *et al.*, 2004; Hayes e Adams, 2007).

O CE tonsilar é frequente no cão mas raro no gato (Liptak e Withrow, 2007). Não existe predisposição de raça nem de género. A invasão neoplásica é frequentemente bilateral. No entanto, a observação macroscópica de uma forma geral apenas permite identificá-la numa das tonsilas mas a linfadenopatia bilateral é normalmente palpável (Todoroff *et al.*, 1979; Borthwick *et al.*, 1982). A metastização linfática ou pulmonar está presente em 10 a 50% dos casos pelo que o prognóstico destes animais é reservado (MacEwen, 1990; Theon *et al.*, 1997; Liptak e Withrow, 2007).

Os estudos epidemiológicos existentes são escassos. Contudo, foi referido que o CE tonsilar no cão ocorre com maior frequência em animais de zonas urbanas, o que pode estar relacionado com a presença de poluentes ambientais (Reif e Cohen, 1971).

O CE lingual é raro no cão, com a idade média de ocorrência situada entre os 9 e os 10 anos. Apresenta um comportamento biológico intermédio entre o CE tonsilar e o CE não tonsilar, sendo a metastização menos frequente que no CE tonsilar. No gato o CE lingual surge mais frequente e mais precocemente a partir dos 7 anos, sendo mais comum na face ventro-lateral. O seu comportamento biológico é similar ao do cão (Beck *et al.*, 1986; Carpenter *et al.*, 1993; Liptak e Withrow, 2007)

O CE é a neoplasia oral mais frequente no Homem. Encontra-se associada ao consumo de tabaco e de álcool, sobretudo em indivíduos com mais de 40 anos (Boyle *et al.*, 1995; Moreno-Lopez *et al.*, 2000). É um tipo de tumor que ocorre muitas vezes associado a outras neoplasias primárias localizadas noutros órgãos como o esófago e o pulmão (Syrigos *et al.*, 2009). O prognóstico e a delineação de estratégias terapêuticas com recurso a cirurgia, radioterapia e quimioterapia, encontra-se dependente de factores clínicos, histológicos e moleculares e de estadiamento tumoral (Valente *et al.*, 1994; De Aguiar *et al.*, 2007; Grier e Mayer, 2007; Syrigos *et al.*, 2009). O CE no cão e no gato apresenta semelhanças epidemiológicas, biológicas e clínicas com o Homem, sendo por isso considerados modelos reconhecidos de estudo (MacEwen, 1990).

1.2.2 Melanoma maligno

O MM é o tumor oral mais frequente no cão representando 30 a 40% das neoplasias orais, ao contrário do que acontece no gato, em que surge raramente, não se conhecendo a sua incidência (Stebbins *et al.*, 1989; Kosovsky *et al.*, 1991; Horsting *et al.*, 1998; Head *et al.*, 2002; Liptak e Withrow, 2007). No cão, a incidência do MM da cavidade oral aumenta com a idade, situando-se a idade média dos animais afectados entre os 10 e os 12 anos. Tem uma maior prevalência em machos e as raças com maior representação são a Teckel, a Cocker e a Caniche (Head *et al.*, 2002; Kessler, 2006; Liptak e Withrow, 2007).

Desconhecem-se quais são os factores de risco para o MM nos carnívoros domésticos. Em relação aos melanomas sabe-se, de uma forma geral, que os cutâneos são normalmente benignos, contrastando com os melanomas localizados na cavidade oral, nos dedos e no olho que são geralmente malignos. No Homem o melanoma ocorre devido a mutações induzidas por repetidas exposições a radiação ultravioleta, o que não constitui um factor de risco no melanoma oral (Modiano *et al.*, 1999).

No Homem e no rato existem genes específicos responsáveis pela ocorrência do melanoma familiar (Sulaimon e Kitchel, 2003), mas o papel destes genes no cão e no gato é ainda desconhecido. No cão parece haver uma predisposição racial ou familiar para o desenvolvimento de MM oral, existindo raças mais predispostas como a Cocker Spaniel assim como um risco acrescido em cães com a mucosa oral pigmentada. Com base

nestas constatações alguns autores sugerem uma componente hereditária para o desenvolvimento e/ou progressão desta neoplasia (Modiano *et al.*, 1999; Ramos-Vara *et al.*, 2000; Sulaimon e Kitchel, 2003; Dennis *et al.*, 2006).

A localização anatômica mais frequente do MM oral no cão é a gengiva com 42 a 63% dos casos, seguindo-se a mucosa oral, o lábio, o palato-duro, o palato-mole, a língua e as tonsilas (Ramos-Vara *et al.*, 2000; Liptak e Withrow, 2007).

O MM caracteriza-se por um comportamento biológico muito variável, o que aliás também se verifica no Homem (MacEwen, 1990; Vail e MacEwen, 2000). No cão a metastização linfática regional é frequente, ocorrendo em 59 a 80% dos casos e a metastização à distância observa-se em 51 a 66% dos casos, atingindo principalmente o pulmão, numa fase ainda precoce da doença (Kosovsky *et al.*, 1991; White, 1992; Théon *et al.*, 1997; Proulx *et al.*, 2003; Liptak e Withrow, 2007). Nesta espécie estão identificados como factores determinantes do comportamento biológico do MM, a localização, o tamanho, o estadiamento e a classificação histológica (Modiano *et al.*, 2003; Sulaimon *et al.*, 2003). O comportamento agressivo desta neoplasia com infiltração local e metastização precoces, leva a que o tempo médio de sobrevivência seja de apenas 1 ano (Theon *et al.*, 1997; Murphy *et al.*, 2005).

No gato o comportamento do MM é semelhante ao do cão. Contudo, nesta espécie não está determinado qual o tempo médio de sobrevivência (Patnaik e Mooney, 1988).

1.2.3 Fibrossarcoma

O FS é um tumor frequente, ocorrendo no cão em 10 a 20% e no gato em 13 a 17% das neoplasias orais. É a terceira neoplasia maligna mais comum com esta localização em cães e a segunda em gatos (Stebbins *et al.*, 1989; Kosovsky *et al.*, 1991; Liptak e Withrow, 2007). A idade média de ocorrência é de 7 e de 10 anos, respectivamente. Contudo, alguns subtipos histológicos surgem em animais com menos de 5 anos de idade. Cerca de 25% destes têm lugar em cães de raça grande ou gigante, e são mais comuns em machos do que em fêmeas (Ciekot *et al.*, 1994).

O FS ocorre mais frequentemente na mucosa labial, no palato duro e na gengiva (Ogilvie *et al.*, 1995). Apresenta um comportamento biológico agressivo, devido a ser muito invasivo localmente, atingindo rapidamente o osso subjacente, apesar da ocorrência de metastização linfática acontecer apenas em 19 a 22% dos casos. É um tumor radorresistente, embora histologicamente seja considerado de baixo grau de malignidade, sendo o seu controlo local mais problemático do que o da metastização à distância (Ciekot *et al.*, 1994; Gillette e Gillette, 1995; Dhaliwall *et al.*, 1998; Head *et al.*, 2002).

O tamanho da neoplasia aquando do diagnóstico desempenha um papel importante na resposta do paciente ao tratamento. Uma vez que o FS é radorresistente e

quimiorresistente, a terapêutica baseia-se sobretudo na cirurgia. No cão o tempo médio de sobrevivência pós-cirúrgica no estágio inicial é de 45 meses, enquanto que em estádios mais avançados situa-se nos 31 meses (Ciekot *et al.*, 1994).

Em gatos com FS oral a percentagem de animais vivos ao fim de 1 ano varia entre 25 e 67% de acordo com os diferentes trabalhos (Ciekot *et al.*, 1994; Northrup *et al.*, 2006; Liptak e Withrow, 2007). Num estudo efectuado em 42 gatos com FS com localização mandibular, a cirurgia foi considerada curativa tendo-se verificado tempos de sobrevivência pós-cirúrgica superiores a um ano (Northrup *et al.*, 2006).

1.2.4 Outras neoplasias

Os OS com localização oral representam cerca de 25% deste tipo de tumores, maioritariamente com sede no esqueleto apendicular (Heyman *et al.*, 1992). Ao contrário destes, a localização oral está associada a uma capacidade moderada de metastização. Em medicina veterinária não existem estudos epidemiológicos do OS oral devido sobretudo à sua baixa incidência. Estima-se que a sobrevivência ao fim de um ano se situe entre 35 e 71% no cão (Heyman *et al.*, 1992; Hammer *et al.*, 1995; Straw *et al.*, 1996). Em gatos a ocorrência deste tipo histológico é ainda mais rara (Stebbins *et al.*, 1989; Northrup *et al.*, 2006; Liptak e Withrow, 2007).

1.3 Estadiamento tumoral

O estadiamento tumoral baseia-se na avaliação da invasão local, regional e à distância de uma neoplasia. A sua determinação é imprescindível para a selecção do protocolo terapêutico mais adequado, o estabelecimento do prognóstico, a avaliação da resposta terapêutica, e ainda para facilitar a troca de informação entre técnicos e especialistas (Verstraete, 2005; De Aguiar *et al.*, 2007; Dervisis, 2008; Coyle e Garret, 2009). Encontrase estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) tanto para o Homem como para os animais, um sistema anatómico com critérios de estadiamento, designado por sistema TNM (*Tumor, Node, Metastasis*). Neste sistema o T de tumor inclui a dimensão, o grau de invasão e a ulceração da neoplasia, o N de linfonodo regional considera a invasão, o número e o tamanho dos linfonodos envolvidos, e o M de metástases caracteriza a sua presença ou ausência à distância. Em medicina veterinária estes critérios de avaliação são aplicados sobretudo a tumores sólidos. Contudo, nalguns tumores, como é o caso do linfoma e da neoplasia mamária, este sistema é aplicado em combinação com outros critérios, nomeadamente marcadores histopatológicos (Patnaik *et al.*, 1984; Kiupel *et al.*, 1999; Queiroga e Lopes 2002; Scase *et al.*, 2006).

A determinação do estadiamento envolve uma avaliação clínica detalhada, assim como uma avaliação imagiológica com recurso à radiologia, ultrassonografia, tomografia axial computadorizada (TAC) e/ou ressonância magnética (Verstraete, 2005; Dervisic, 2008; Coyle e Garret, 2009).

O exame histopatológico, para além da classificação da neoplasia, permite a determinação do seu grau. Este reflecte a extensão da invasão dos tecidos circundantes e a resposta ao crescimento tumoral. A atribuição do grau baseia-se na diferenciação celular, índice mitótico, pleomorfismo, tamanho e número de nucléolos das células neoplásicas, presença de necrose e de reacção inflamatória e ainda na presença de invasão vascular ou linfática (Dervisic, 2008). A determinação do grau tumoral reveste-se de grande relevância na selecção do protocolo terapêutico mais adequado, no estabelecimento do prognóstico e na avaliação da resposta ao tratamento.

Em medicina veterinária encontram-se actualmente estabelecidos para alguns tipos de tumor outros critérios para além do estadiamento, baseados sobretudo no exame histológico e imunohistoquímico, como acontece no mastocitoma, no carcinoma mamário, no linfoma e nos sarcomas (Kiupel *et al.*, 1999; De Matos *et al.*, 2006; Scase *et al.*, 2006). As tabelas 2 e 3 referem os critérios de classificação de neoplasias em animais domésticos aprovados pela OMS.

Tabela 2 – Classificação TNM para tumores sólidos em animais domésticos (Owen, 1980)

Tumor primário (T)	T0	Sem evidência de tumor
	Tis	Carcinoma pré-invasivo (carcinoma <i>in situ</i>)
	T1	Tumor < 2 cm diâmetro na sua dimensão máxima
	T1a	Sem evidência de invasão óssea
	T1b	Com evidência de invasão óssea
	T2	Tumor 2-4 cm diâmetro na sua dimensão máxima
	T2a	Sem evidência de invasão óssea
	T2b	Com evidência de invasão óssea
	T3	Tumor > 4 cm diâmetro na sua dimensão máxima
	T3a	Sem evidência de invasão óssea
T3b	Com evidência de invasão óssea	
Linfonodos regionais (N)	N0	Sem evidência de envolvimento ganglionar
	N1	Evidência de envolvimento ganglionar
	N1a	Sem evidência de metastização linfática
	N1b	Evidência de metastização linfática
	N2	Linfonodos contralaterais móveis
	N2a	Sem evidência de metastização linfática
	N2b	Evidência de metastização linfática
N3	Linfonodos fixos	
Metástases à distância (M)	M0	Sem evidência de metástases à distância
	M1	Evidência de metástases à distância

Tabela 3 – Estadiamento clínico dos tumores da cavidade oral (Adaptado de Bergman *et al.*, 2003)

Estádio	Tumor (T)	Linfonodos (N)	Metástases (M)
I	T1	N0, N1 ou N2a	M0
II	T2	N0, N1a ou N2a	M0
III	T3	N0, N1 ou N2a	M0
IV	Qualquer T	N1b	M0
	Qualquer T	N2b ou N3	M0
	Qualquer T	Qualquer N	M1

1.4 Ki-67 como factor de prognóstico

Actualmente, o cancro é reconhecido como uma doença de base genética, uma vez que resulta da alteração da expressão ou do funcionamento de genes e proteínas envolvidas no controlo do ciclo celular e da apoptose (Hunter, 1997; Modiano e Ritt, 1999; Sulaimon e Kitchel, 2003). Por sua vez a sobrevivência e o crescimento da célula neoplásica são influenciados pela interacção de várias moléculas, estruturas de suporte do estroma, células e mediadores inflamatórios, vasos sanguíneos e linfáticos, alterações da oxigenação tecidual, pressão de fluidos intersticiais, entre outros (Hunter, 1997).

O estudo da cascata de eventos da carcinogénese, desde os mecanismos de activação e/ou de silenciamento genético até aos que estão directa ou indirectamente envolvidos em fenómenos de proliferação, assim como de crescimento e de invasão tumoral, permitem estabelecer um diagrama de moléculas-chave, com importância e potencial utilidade no diagnóstico, prognóstico e tratamento das neoplasias (Hunter, 1997; Sulaimon e Kitchel, 2003).

A divisão celular é uma parte importante da função normal da célula (Modiano e Ritt, 1999). O seu ciclo envolve um conjunto de reacções genéticas e bioquímicas que ocorrem de forma ordeira e programada, resultando na formação de duas células (Hunter, 1997). Qualquer alteração neste processo conduz à paragem do ciclo celular (senescência) ou à indução da morte da célula (apoptose). Este equilíbrio entre a senescência e a apoptose resulta da interacção entre sinais proliferativos e anti-proliferativos (Hunter, 1997; Modiano e Ritt, 1999).

O estudo dos mecanismos da actividade proliferativa, instabilidade genética e quantidade de células em apoptose de uma neoplasia, permite fornecer informações adicionais sobre o prognóstico (Van Diest *et al.*, 1998). Com alguma frequência verifica-se que alguns tipos de tumores aos quais histologicamente é atribuído um elevado grau de malignidade, apresentam tempos de sobrevivência prolongados comparativamente a

outros, cujas características histológicas e/ou localização lhes conferem um comportamento menos agressivo. Tem sido constatado que mesmo dentro do mesmo tipo histológico, os tempos de sobrevivência variam (Klein, 2003). Para a avaliação acuidada de uma neoplasia muito contribui o conhecimento da sua cinética celular, uma vez que uma maior actividade mitótica traduz uma maior malignidade. No entanto, também é nesta fase do ciclo celular que a célula neoplásica apresenta maior fragilidade, constituindo este o período ideal para a intervenção terapêutica (Modiano e Ritt, 1999; Scholzen e Gerdes, 2000; Millanta *et al.*, 2002; Scase *et al.*, 2006).

As técnicas de imunohistoquímica (IHQ) consistem num conjunto de processos colorimétricos destinados a detectar antígenos teciduais. O mecanismo básico baseia-se no reconhecimento do antígeno por um anticorpo, originando uma reacção antígeno-anticorpo. Esta reacção é visualizada através de observação microscópica (Looper *et al.*, 2006).

São utilizados anticorpos que identificam moléculas intra- ou extra-celulares específicas, como proteínas celulares, filamentos, entre outros. Estas técnicas são utilizadas rotineiramente em medicina humana desde a década de 70, no diagnóstico de doenças inflamatórias, infecciosas e neoplasias, assim como para o estabelecimento do prognóstico e da terapêutica mais adequada (Ruiz *et al.*, 2005).

Em termos de diagnóstico a IHQ permite a determinação do tipo histológico em tumores indiferenciados ou em metástases de neoplasias primárias ocultas, bem como possibilita a identificação de subtipos histológicos, baseados em painéis de expressão de anticorpos (Ruiz *et al.*, 2005). No que se refere ao prognóstico, a sua relevância encontra-se relacionada com a determinação de índices de proliferação tais como o PCNA, o AgNOR ou o Ki-67. Relativamente à terapêutica, a IHQ permite a estratificação da resposta terapêutica baseada na expressão de determinados receptores, como os anticorpos correspondentes a receptores hormonais, o CD117 ou o c-erbB2 (Looper *et al.*, 2006).

A utilização rotineira da IHQ em medicina veterinária é ainda recente, sendo sobretudo aplicada no campo do diagnóstico. O maior entrave à sua utilização reside no facto de os anticorpos de cão e de gato não se encontrarem disponíveis, o que leva a que com frequência, tenha de se recorrer a anticorpos que apresentam reactividade cruzada antígeno humano-antígeno animal. Assim, utilizam-se anticorpos desenhados para antígenos humanos que reconhecem também antígenos animais por analogia da estrutura molecular (Ruiz *et al.*, 2005).

O anticorpo Ki-67 reconhece uma proteína nuclear – uma histona – que se encontra associada à proliferação celular. A sua expressão ocorre durante todas as fases activas do ciclo celular, isto é, G1, S, G2 e M e declina rapidamente após a mitose, não

tendo expressão na fase de repouso G0 (Scholzen e Gerdes, 2000). Devido a estas características é um excelente marcador da proliferação celular, sendo amplamente utilizado em colorações imunohistoquímicas de rotina (Scholzen e Gerdes, 2000). Possui uma semi-vida de cerca de uma hora (Van Diest *et al.*, 1998).

Os benefícios da utilização do Ki-67 em tumores orais de humanos são controversos (De Aguiar *et al.*, 2007). Enquanto alguns autores associam um elevado índice de proliferação a um pior prognóstico e a uma recorrência mais rápida (Sittel *et al.*, 1999; Xie *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2004), outros defendem que uma maior expressão desta proteína conduz à selecção de um tratamento mais adequado e por isso a um melhor prognóstico (Valente *et al.*, 1994; Grabenbauer *et al.*, 2000).

Em medicina veterinária a expressão do marcador Ki-67 (clone MIB-1) foi identificada em neoplasias da mama e em mastocitomas no cão, tendo-lhe sido atribuído valor prognóstico (Peña *et al.*, 1998; Scase *et al.*, 2006). No que respeita às neoplasias orais apenas para o MM do cão foi encontrada correlação deste marcador com o prognóstico (Millanta *et al.*, 2002).

1.5 Oncologia cirúrgica

A cirurgia tem um papel fulcral no maneio do paciente oncológico. Encontra-se indicada para fins diagnósticos através de técnicas de biópsia excisionais ou incisionais. Constitui um dos pilares terapêuticos da maioria dos cancros. É utilizada como tratamento curativo, definitivo, adjuvante (cito-redução) ou paliativo. Neste último caso tem como objectivo o controlo da dor e/ou o aumento da qualidade de vida (Salisbury, 2002).

As técnicas cirúrgicas usadas em oncologia oral variam de acordo com o tipo de tumor, a sua localização, dimensão e estadiamento. No doente oncológico é reconhecido que a abordagem cirúrgica inicial tem maior hipótese de ser bem sucedida do que abordagens posteriores (Withrow e Vail, 2007). Por esta razão, o maneio cirúrgico com intuito curativo deve ter margens de segurança bastante amplas. No que concerne às neoplasias orais malignas, os diferentes autores recomendam a exérese em bloco com margens de segurança óssea, entre 1 e 2 cm (Salisbury, 2002; Verstraete, 2005; Liptak e Withrow, 2007), uma vez que mais de metade das neoplasias orais possuem envolvimento ósseo (Todoroff e Brodey, 1979; White, 1992). Os tumores mandibulares permitem obter margens cirúrgicas mais amplas, quando comparados com os maxilares. Acresce ainda que, de entre as neoplasias localizadas na mandíbula, a localização rostral permite ainda obter margens cirúrgicas mais amplas comparativamente aos de localização caudal (Salisbury, 2002; Liptak e Withrow, 2007).

Os principais locais de drenagem linfática das neoplasias da cavidade oral são os linfonodos retrofaríngeos e submandibulares (Saar e Getty, 1986), pelo que a exérese

destes linfonodos pode ter objectivos curativos ou de estadiamento de acordo com o tipo histológico da neoplasia e comportamento biológico esperado (Herring *et al.*, 2002).

Os tumores de origem epitelial metastizam mais frequentemente nos linfonodos regionais contrariamente ao que acontece com as neoplasias de origem mesenquimatosa como o FS que normalmente não metastiza (Ciekot *et al.*, 1994; Herring *et al.*, 2002). Quando ocorrem modificações de textura ou de tamanho dos linfonodos, estes devem ser alvo de avaliação detalhada, com o fim de esclarecer se as alterações se devem a metastização, a hiperplasia ou a reactividade devido a outros factores (Dervisis, 2008).

A presença de metastização linfática regional, aquando do diagnóstico inicial, é tida como um sinal de mau prognóstico (Bateman *et al.*, 1994; Theon *et al.*, 1997; Dervisis, 2008; Coyle e Garret, 2009). Por esta razão, alguns autores defendem que a exérese em bloco das neoplasias orais deve incluir, para além da neoplasia primária, os ductos e os linfonodos (Herring *et al.*, 2002). Contudo, a remoção profilática de linfonodos ou de cadeias linfáticas que não apresentem alterações, é questionada por outros autores que defendem que os linfonodos regionais são os iniciadores da resposta imunológica local face à recidiva da neoplasia (Withrow e Vail, 2007).

No MM a excisão cirúrgica como único tratamento acompanha-se de benefícios limitados (Coyle e Garret, 2009), uma vez que a maior parte dos animais morre de doença metastática num período compreendido entre os 7,5 e os 9,9 meses (Kosovsky *et al.*, 1991; Wallace *et al.*, 1992; White, 1992). A recidiva ocorre sobretudo quando a localização da neoplasia não permite a obtenção de margens cirúrgicas limpas, mesmo quando a abordagem é muito agressiva. É o que acontece nos MM com localização maxilar, em que se regista uma taxa de recidiva local situada entre os 21 e os 48% (Wallace *et al.*, 1992; White, 1992).

No CE a cirurgia surge como a modalidade terapêutica de eleição em medicina veterinária, uma vez que se encontra associada a maiores tempos de sobrevivência (Northrup *et al.*, 2006; Coyle e Garret, 2009). O principal desafio consiste no controlo da doença local (Coyle e Garret, 2009). O tempo médio de sobrevivência pós-cirúrgico varia entre os 3,5 e os 26 meses, com 84 a 91% dos animais vivos ao fim de um ano (Kosovsky *et al.*, 1991; White, 1992; Carpenter *et al.*, 1993; Fellizola *et al.*, 2002; Liptak e Withrow, 2007).

O CE com localização tonsilar apresenta um mau prognóstico independentemente da abordagem terapêutica realizada (Liptak e Withrow, 2007; Coyle e Garret, 2009). No gato, devido à escassa informação disponível e à natureza agressiva do CE oral, parece que, à semelhança do cão, a cirurgia é insuficiente como abordagem terapêutica única (Looper *et al.*, 2006; Northrup *et al.*, 2006). O tempo médio de sobrevivência varia entre as 5 semanas e os 12 meses, com taxas de recidiva superiores a 50% (Bradley e MacEwen,

1984; Penwick e Nunamaker, 1987). Num estudo realizado em gatos submetidos a mandibulectomia devido a neoplasia oral, foi relatado que 43% dos animais com CE, 67% com FS e 83% com OS, encontravam-se vivos ao fim de 1 ano (Northrup *et al.*, 2006)

No FS a cirurgia surge como a primeira abordagem terapêutica, apesar de estar associada a elevadas taxas de recorrência local, que variam entre os 31 e os 92% (Bradley e MacEwen, 1984; Penwick e Nunamaker, 1987; Wallace *et al.*, 1992; White, 1992; Ciekot *et al.*, 1994; Felizzola *et al.*, 2002). Também neste caso o sucesso cirúrgico está dependente, em grande parte, da obtenção de margens cirúrgicas limpas, o que é sempre condicionado pela localização da neoplasia. O tempo de sobrevivência pós-cirúrgico varia entre os 9 e os 16 meses, com cerca de 50% dos animais vivos ao fim de um ano (Kosovsky *et al.*, 1991; Wallace *et al.*, 1992; White, 1992; Felizzola *et al.*, 2002).

1.6 Objectivo

O objectivo do presente trabalho consistiu na determinação do tempo de sobrevivência de 47 carnívoros domésticos com neoforção maligna de localização oral submetidos a cirurgia. Simultaneamente pretendeu-se fazer a correlação entre as covariáveis clínicas, o tipo histológico da neoplasia e a intensidade da expressão do marcador imunohistoquímico Ki-67.

2. Material e métodos

2.1 Introdução

Este trabalho consistiu num estudo prospectivo desenvolvido entre Janeiro de 2008 e Janeiro de 2009. Incluiu 47 animais submetidos a cirurgia pelo Serviço de Cirurgia Veterinário Ambulatório em Centros de Atendimento Médico Veterinários na área metropolitana de Lisboa.

Os critérios de inclusão foram os seguintes: presença de neoplasia maligna oral não odontogénica com indicação cirúrgica, determinação do estadiamento tumoral através de avaliação radiográfica e/ou tomográfica da neoplasia, diagnóstico histopatológico e acompanhamento clínico do paciente durante um ano após cirurgia.

2.2 Registo de dados

Os dados registados incluíram: idade, sexo, raça, localização anatómica (mandibular, maxilar, tonsilar, sublingual e mucosa), classificação histológica e estadiamento TNM da neoplasia. Este último foi realizado com base nos exames clínicos e imagiológicos.

Todos os animais foram submetidos a cirurgia com margens amplas, utilizando a técnica cirúrgica mais apropriada à localização do tumor. Procedeu-se à exérese de pelo menos um linfonodo submandibular. Os animais foram submetidos a cirurgia sob anestesia geral. A pré-medicação consistiu na combinação de acepromazina (0,05mg/kg, via IM) com morfina (0,5mg/kg, via IM), seguida da indução anestésica por via endovenosa com midazolam (0,2mg/kg) combinado com propofol (2 mg/kg até ao efeito). A manutenção anestésica foi efectuada com isoflurano. De forma complementar foi aplicada lidocaína para bloqueio loco-regional da região submetida a cirurgia. Todos os animais foram medicados com carprofeno (4mg/kg, via SC) e com amoxicilina potenciada com ácido clavulânico (12,5mg/kg, via IM).

As neoplasias e o(s) linfonodo(s) excisados foram conservados em solução de formalina a 10% e sujeitos a exame histopatológico.

Todos os animais em estudo foram seguidos durante o período de um ano, sendo avaliados mensalmente sob o ponto de vista clínico para averiguação da presença de sinais clínicos de recidiva local da neoplasia, e trimestralmente, ou sempre que se justificasse, para exame radiográfico torácico para identificação da presença de metástases. Procedeu-se ao registo dos sinais clínicos e radiográficos, assim como a ocorrência de morte, natural ou por eutanásia.

A anotação do tempo da sobrevivência global foi efectuada em dias, compreendendo o tempo decorrido entre a excisão cirúrgica da neoplasia e o momento em que ocorreu a morte, ou até atingir um ano após cirurgia.

2.3 Estudo imunohistoquímico

O estudo IHQ foi realizado em 47 neoplasias retiradas cirurgicamente da cavidade oral de 29 cães e 18 gatos. A marcação IHQ das amostras foi realizada segundo o protocolo utilizado no serviço de Imunohistoquímica do Instituto Português de Oncologia de Lisboa. Foram utilizados como controlos positivos amostras de tonsila de cão e de gato.

a) Corte, desparafinização e hidratação

As 47 amostras em estudo foram fixadas em solução de formol a 10% e conservadas em blocos de parafina. Foram posteriormente cortadas em secções de 3µm. Os cortes obtidos foram colocados em lâminas de vidro apropriadas para o efeito (Superfrost Plus®, Menzel-Glaser) e submetidos a um processo de desparafinização seguindo os seguintes passos: primeiro procedeu-se à secagem em estufa a 62°C durante um período de 24h. Seguidamente as lâminas foram imersas em xilol (Xilene, JT Baker) à temperatura ambiente durante 20 minutos, efectuando-se depois a remoção do xilol através de banhos de 30 segundos em etanol a 100%.

b) Bloqueio de peroxidases endógenas

Procedeu-se ao bloqueio das peroxidases endógenas utilizando uma solução de peróxido de hidrogénio em metanol, na proporção 1,5 ml/100 ml durante 10 minutos. Em seguida realizou-se a lavagem das lâminas em água corrente.

c) Recuperação antigénica

As amostras foram submetidas a recuperação antigénica em panela de pressão. Foram imersas em tampão citrato na concentração de 10mM e pH 6, durante 6 minutos, contados após a ebulição e o encerramento da panela. Esta foi posteriormente arrefecida utilizando água corrente, sendo as lâminas posteriormente lavadas e imersas no tampão salino TBS (TBS; 0.1 mol/l Tris base, 0.9% NaCl; pH 7.4).

d) Incubação com anticorpo primário

As lâminas foram delimitadas com caneta hidrofóbica para posterior aplicação do anticorpo primário Ki-67 (clone MIB-1, Dako). Este foi aplicado na diluição de 1:100 em diluente verde (Dako), durante o período de incubação de 1 hora .

e) Aplicação de secundário

O método de amplificação ou secundário utilizado foi o método do polímero (Envision, Dako).

Primeiro as lâminas foram lavadas durante 5 minutos utilizando-se a solução tampão TBS. Foram aplicados 150 µl da solução de polímero por lâmina, sendo o período de incubação de 30 minutos. Posteriormente as lâminas foram novamente lavadas com tampão TBS durante 5 minutos. Aplicou-se a solução de diaminobenzidina (DAB) durante 8 minutos. A lavagem do DAB foi efectuada utilizando TBS em duas aplicações durante 5 minutos. Por fim as lâminas foram coradas com hematoxilina durante 3 minutos e lavadas com tampão Flex para contrastar.

2.4 Métodos de quantificação de imuno-reactividade e avaliação imunohistoquímica

Para avaliação do índice de expressão de Ki-67 foi efectuada a contagem total das células neoplásicas por campo. As imagens foram directamente adquiridas pelo software AnalySIS. As células positivas foram contadas por dois observadores em simultâneo, em 8 a 10 campos utilizando uma ampliação de 400x, num mínimo de 1000 células. Apenas os núcleos fortemente corados foram considerados positivos. Posteriormente foi determinada a proporção de células positivas em cada amostra. As contagens celulares foram executadas sem conhecimento do desfecho clínico do paciente. Os resultados IHQ foram divididos em dois grupos de acordo com o limite de expressão para 50% de marcação positiva de núcleos. Foram separados em grupo 1 (GR1) cuja expressão do marcador Ki-67 se situou entre 0 a 50% e grupo 2 (GR2) em que esta foi superior a 50%.

2.5 Análise estatística

Para a realização da análise estatística foram utilizados os dados descritos no ponto 2.2. Na análise dos dados de marcação IHQ para o marcador nuclear Ki-67, foi efectuada a separação por grupos, baseada na classificação em intervalos de 0 a 50% e superior a 50%.

Foi utilizado o programa estatístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, USA) versão 15.0 para Windows®, para avaliação das medidas de associação estatística entre os dados clínicos, os resultados IHQ e o prognóstico.

Para análise da sobrevivência foi utilizado o programa JMP Release (Statistical Discovery, trade mark from SAS, SAS Institute Inc.) versão 6.0 para Windows®, para as curvas de sobrevivência por espécie, localização, classificação e estadiamento tumoral,

bem como grupos de expressão de Ki-67. Foram utilizados testes de LogRank para avaliação da relação entre as curvas de sobrevivência.

Não foram realizadas curvas de sobrevivência quando o número foi inferior a dois animais.

Para estabelecimento de uma relação entre a idade e o prognóstico, os animais foram separados de acordo com a espécie em dois grupos etários: inferior e igual ou superior a 7 anos.

3. Resultados

3.1 Dados clínicos

A amostra estudada incluiu 47 animais, 29 cães e 18 gatos. Os cães tinham idades compreendidas entre os 3 e os 21 anos, com uma média de 11,3 anos, sendo constituída por 20 machos (69,0%) e 9 fêmeas (31,0%). Os gatos apresentaram idades compreendidas entre os 6 e os 18 anos, situando-se a idade média em 13,3 anos, sendo constituída por 13 machos (72,2%) e 5 fêmeas (27,8%). No cão, a amostra estudada compreendeu 10 animais de raça indeterminada (34%) e 19 animais de raça pura (66%). Nos cães de raça definida, 2 eram Caniches (7%), 2 Cocker (7%), 2 Labrador (7%), 2 Pastor Alemão (7%), 2 Serra D'Aires (7%), 1 Basset Hound (3%), 1 Dalmata (3%), 1 Husky (3%), 1 Pincher (3%), 1 Rottweiler (3%) e 1 Yorkshire Terrier (3%). No gato 17 dos casos ocorreram em animais de raça Europeu Comum (94%) e apenas 1 caso de raça Siamesa (6%).

Dos 29 cães em estudo 14 apresentavam neoplasia com localização mandibular (48,2%), 9 com localização maxilar (31,0%), 5 na mucosa (17,2%) e 1 tonsilar (3,4%). Relativamente ao diagnóstico histopatológico foram observados 13 CE (44,8%), 11 MM (37,9%), 3 FS (10,3%), 1 OS (3,4%), e 1 fibro-condro-osteossarcoma (3,4%) (Tabela 4 e Figura 1).

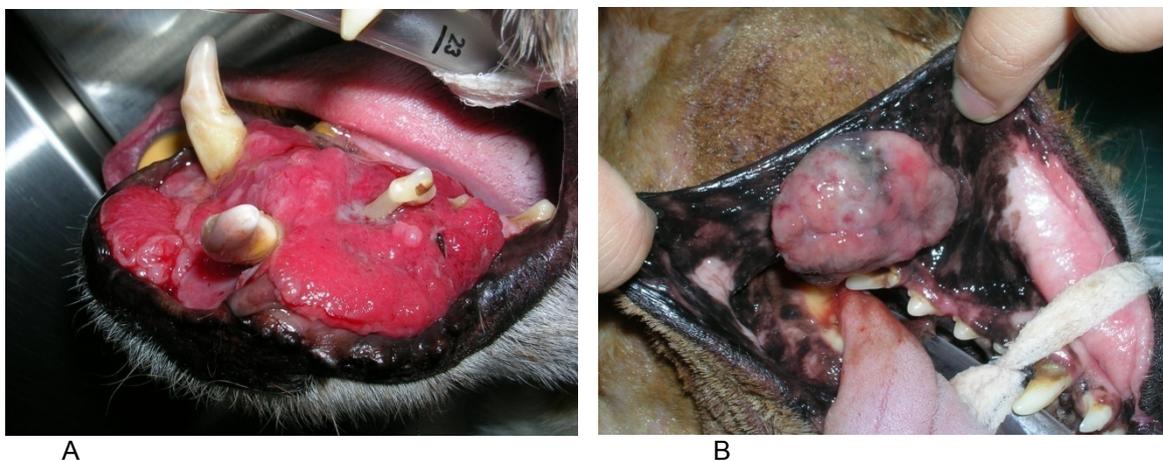


Figura 1 – Neoplasias orais em cães submetidos a cirurgia (A – CE com localização mandibular, B - MM com localização na mucosa)

Dos 18 gatos em estudo, 8 apresentaram neoplasia com localização mandibular (44,4%), 5 com localização maxilar (27,7%) e 3 com localização sublingual (16,6%). Relativamente ao diagnóstico histopatológico foram observados 16 CE (88,8%), 1 FS (5,5%) e 1 condrossarcoma (5,5%) (Tabela 4 e Figura 2).



Figura 2 – Neoplasias orais em gatos submetidos a cirurgia (A – FS com localização maxilar, B - CE com localização mandibular)

Tabela 4 – Caracterização da população em estudo

Covariável		Espécie				
		Cão		Gato		
		n=29	%	n=18	%	
Idade	Média	11,3	-	13,3	-	
Sexo	Machos	20	69,0	13	72,2	
	Fêmeas	9	31,0	5	27,8	
Diagnóstico	CE	13	44,8	16	88,8	
	MM	11	37,9	0	0,0	
	FS	3	10,3	1	5,5	
	Condrossarcoma	0	0,0	1	5,5	
	OS	1	3,4	0	0,0	
	Fibro-condro-osteossarcoma	1	3,4	0	0,0	
Localização	Mandibular	14	48,2	8	44,4	
	Maxilar	9	31,0	5	27,7	
	Mucosa	5	17,2	2	0,0	
	Sublingual	0	0,0	3	16,6	
	Tonsilar	1	3,4	0	0,0	
Estadiamento	T	T1a	2	6,9	0	0,0
		T1b	2	6,9	1	5,5
		T2a	5	17,2	5	27,8
		T2b	8	27,5	5	27,8
		T3a	6	20,7	2	11,1
		T3b	6	20,7	5	27,8
		N	N	24	82,7	14
	N+		5	17,3	4	22,2

Foi efectuada marcação nas 47 amostras em estudo para o marcador nuclear Ki-67. Apenas 25 amostras (53%) coraram positivamente. Destas, 19 correspondiam a neoplasias de cão e 6 de gato. Das amostras de cão marcadas positivamente, 8 foram classificadas como CE (42,3%), 7 MM (36,8%), 3 FS (15,7%) e 1 OS (5,2%). Das 6

neoplasias de gato com expressão positiva para o marcador Ki-67, 5 apresentaram diagnóstico de CE (83,3%) e 1 de FS (16,7%) (Tabela 5).

Tabela 5 – Diagnóstico dos tumores com marcação positiva para o marcador nuclear Ki-67

Diagnóstico	Espécie			
	Cão	%	Gato	%
CE	8	42,3	5	83,3
MM	7	36,8	0	0,0
FS	3	15,7	1	16,7
OS	1	5,2	0	0,0
Total	19	100	6	100

Das 19 neoplasias de cão coradas positivamente, 10 foram incluídas no GR1 (menos de 50% de expressão) e 9 no GR2 (mais de 50% de expressão). Das 6 neoplasias de gato que coraram positivamente, 3 apresentaram uma marcação inferior a 50% enquanto que nas outras 3 foi superior a 50% das células neoplásicas (Tabela 6, Figuras 3 e 4). Dos 25 tumores marcados pelo Ki-67, 13 (52%) eram CE. Destes, 8 pertenciam a cão e 5 a gato (Tabelas 6 e 7, Figuras 3 e 4).

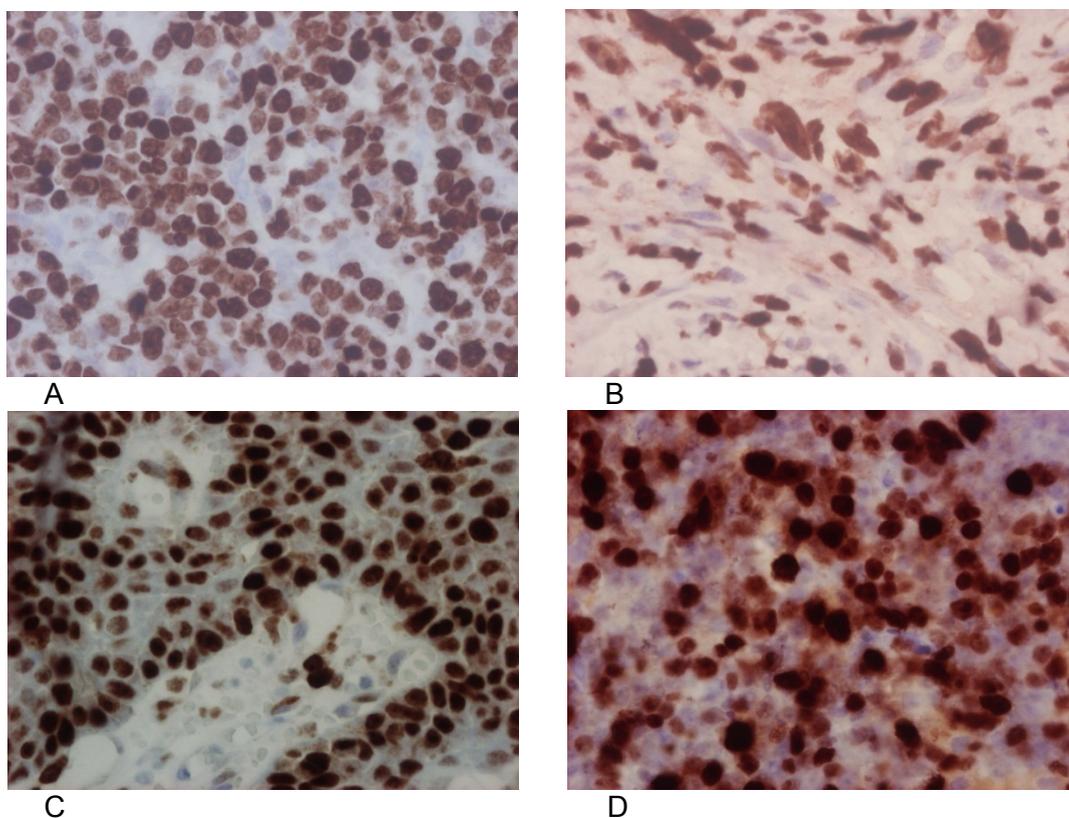


Figura 3 – Fotomicrografias (ampliação 400X) de amostras com marcação positiva para Ki-67 em mais de 50% das células (A – MM, cão, B – FS, gato, C – CE, cão, D – OS, cão)

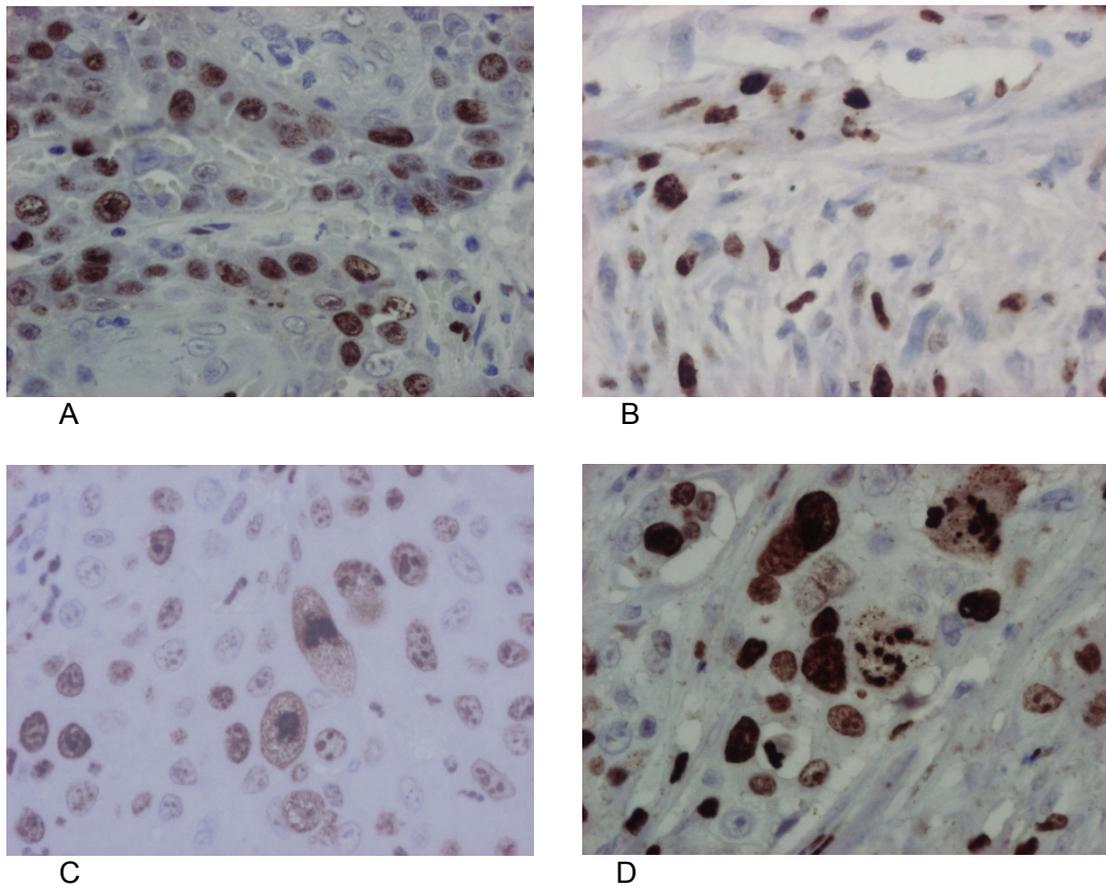


Figura 4 – Fotomicrografias (ampliação 400X) de amostras com marcação positiva para Ki-67 em menos de 50% das células (A – CE, gato, B – MM, cão, C – CE, cão, D – CE, gato)

Tabela 6 – Distribuição da expressão do marcador nuclear Ki-67 para a totalidade das amostras estudadas

Expressão Ki-67	Espécie			
	Cão		Gato	
	n=19	%	n=6	%
GR2 (>50)	9	47,0	3	50,0
GR1 (≤50)	10	53,0	3	50,0
Total	19	100	6	100

Tabela 7 - Distribuição da expressão do marcador nuclear Ki-67 pelas 25 neoplasias coradas positivamente

Ki-67	Diagnóstico	Espécie			
		Cão		Gato	
		n=19	%	n=6	%
GR2 (>50)	FS	2	10,5	1	16,7
	MM	3	15,7	0	0,0
	CE	4	21,0	2	33,3
	Total (1)	9	47	3	50
GR1 (≤50)	FS	1	5,2	0	0,0
	MM	4	21,0	0	0,0
	OS	1	5,2	0	0,0
	CE	4	21,0	3	50,0
	Total (2)	10	53	3	50
Total (1+2)		19	100	6	100

3.2 Tempo de Sobrevivência global

Na amostra em estudo o acompanhamento dos pacientes durante o período de um ano, permitiu fazer o registo do tempo de sobrevivência de forma a este ser traduzido em curvas de sobrevivência. Procedeu-se à separação das curvas por espécie, estadiamento T e N, localização, tipo histológico, e expressão para Ki-67. Averiguou-se se existia alguma relação entre os dados clínicos e imunohistoquímicos, e o prognóstico.

3.2.1. Espécie

O tempo médio de sobrevivência global no cão foi de 224,7 dias ($\bar{d} \pm 24,4$ dias), tendo-se observado uma sobrevivência de 42% ao fim de um ano para todo o tipo de neoplasias orais. No gato, o tempo médio de sobrevivência global foi de 73,8 dias ($\bar{d} \pm 12,0$ dias), tendo-se verificado uma sobrevivência de 16% aos 90 dias e 0% aos 150 dias. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as duas espécies relativamente ao tempo de sobrevivência global ($X^2 = 21,5$; $p < 0,0001$) (Gráfico 1).

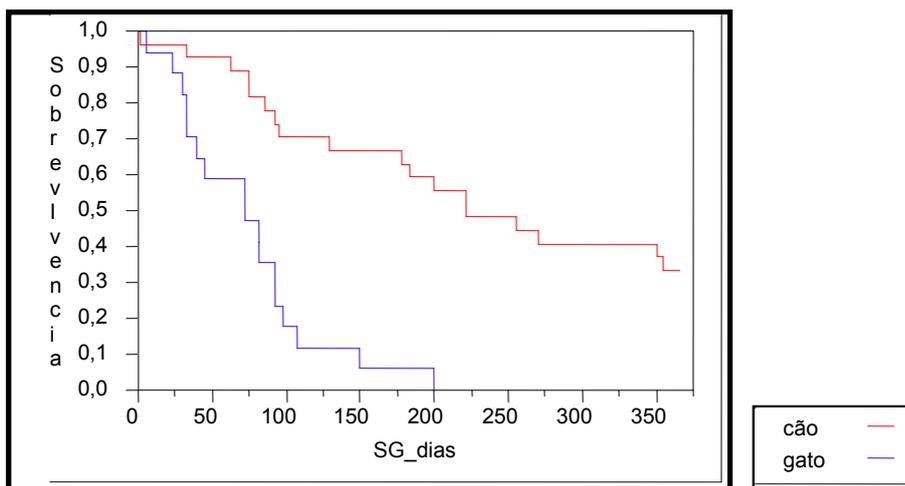


Gráfico 1 – Curva de Kaplan-Meier mostrando a sobrevivência global estratificada por espécie em 29 cães e 18 gatos

3.2.2 Idade

O teste exacto de Fisher não mostrou associação estatisticamente significativa entre o prognóstico e a idade ($p=0,57$ para cães e $p=0,40$ para gatos).

3.2.3 Género

O teste de Mann-Whitney aceitou a hipótese nula, sugerindo não haver diferenças estatisticamente significativas entre o género para a sobrevivência global ($p=0,856$ para cães e $p=0,624$ para gatos).

3.2.4 Localização

Em cães os tumores com localização mandibular apresentaram um tempo médio de sobrevivência de 211 dias ($\bar{\delta}\pm 28$ dias), tendo-se verificado 50% de animais vivos aos 365 dias. Quando as neoplasias tinham localização maxilar, o tempo médio de sobrevivência foi de 131 dias ($\bar{\delta}\pm 24$ dias), tendo-se observado 33% de animais vivos aos 365 dias. Os cães com neoplasias com localização na mucosa apresentaram um tempo médio de sobrevivência de 248 dias ($\bar{\delta}\pm 49$ dias), verificando-se 18% de animais vivos aos 365 dias. Foi excluído da análise estatística um cão cuja neoplasia tinha localização tonsilar. As curvas de sobrevivência por localização da neoplasia não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($X^2= 1,86$; $p= 0,39$).

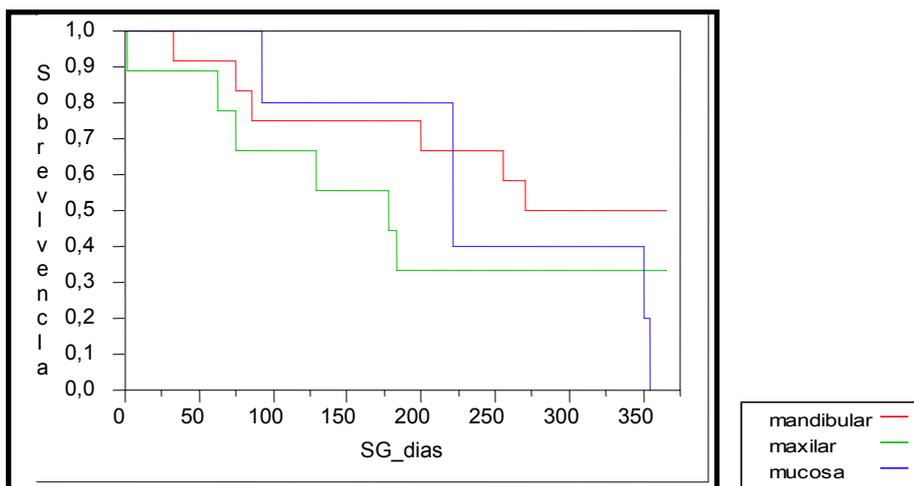


Gráfico 2 - Curva de Kaplan-Meier relacionando a sobrevivência global de 28 cães submetidos a cirurgia, com a localização da neoplasia ($X^2= 1,86$; $p= 0,39$)

Nos gatos com tumores com localização mandibular observou-se um tempo médio de sobrevivência de 99 dias ($\bar{\delta} \pm 19$ dias), com 14% de animais vivos aos 108 dias. Quando a localização era maxilar, constatou-se um tempo médio de sobrevivência de 60 dias ($\bar{\delta} \pm 19$ dias), com 0% de animais vivos aos 108 dias. Nos gatos em que a localização da neoplasia era sublingual, verificou-se um tempo médio de sobrevivência de 64 dias ($\bar{\delta} \pm 17$ dias), com 0% de animais vivos aos 108 dias. Foi excluída da análise estatística um caso de neoplasia com localização na mucosa. As curvas de sobrevivência para as diferentes localizações apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($X^2=18,8$; $p=0,0003$).

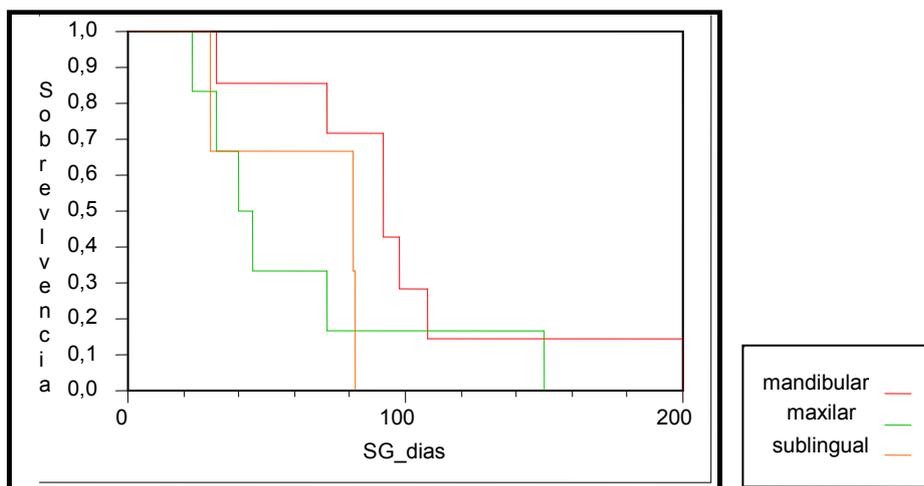


Gráfico 3 – Curva de Kaplan-Meier relacionando a sobrevivência global de 17 gatos submetidos a cirurgia com a localização da neoplasia ($X^2= 18,8$, $p= 0,0003$)

3.2.5 Estadiamento

Os resultados obtidos relacionando a sobrevivência com o estadiamento foram separados de acordo com o estadiamento T (dimensão tumoral) e estadiamento N (invasão linfática). Não foram efectuadas curvas para o estadiamento M (metastização) nas duas espécies estudadas.

3.2.5.1 Estadiamento T

No cão o tempo médio de sobrevivência para o estágio T1 foi de 86 dias ($\bar{\delta} \pm 8$ dias), verificando-se 25% de animais vivos aos 365 dias. Para o estágio T2 o tempo médio de sobrevivência foi de 240 dias ($\bar{\delta} \pm 37$ dias), com 38% de animais vivos aos 365 dias. Para o estágio T3 o tempo médio de sobrevivência observado foi de 232 dias ($\bar{\delta} \pm 38$ dias), com 30% de animais vivos aos 365 dias.

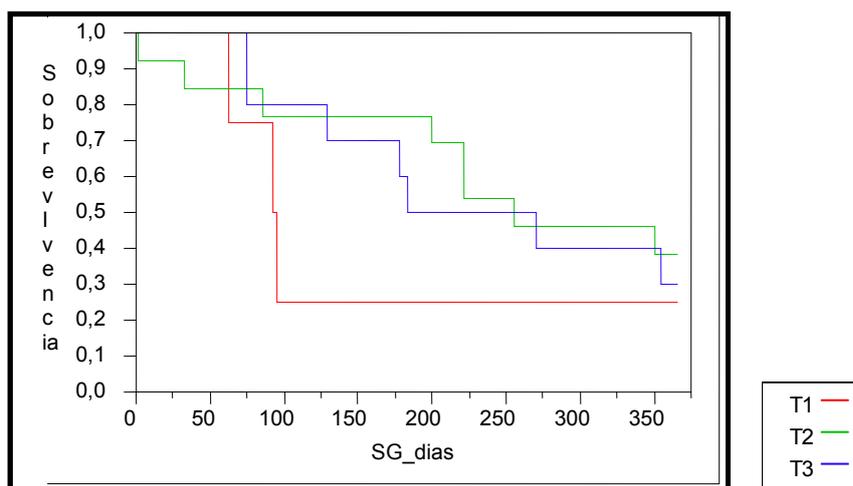


Gráfico 4 - Curva de Kaplan-Meier descrevendo a sobrevivência global de 29 cães submetidos a cirurgia por estadiamento T ($X^2 = 1,02$, $p=0,6$).

Na população de gatos estudada, foi excluído o estágio T1 da análise de sobrevivência. O tempo médio de sobrevivência para o estágio T2 foi de 84 dias ($\bar{\delta} \pm 10$ dias), verificando-se 10% de animais vivos aos 108 dias. Para o estágio T3, o tempo médio de sobrevivência foi de 36 dias ($\bar{\delta} \pm 10$ dias), verificando-se 0% de animais vivos aos 108 dias. Tendo em consideração que o tempo máximo de sobrevivência observado nesta amostra foi de 222 dias, foi utilizado como *endpoint* de comparação para os dois estádios os 108 dias. As curvas de sobrevivência apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($X^2 = 11$; $p = 0,004$).

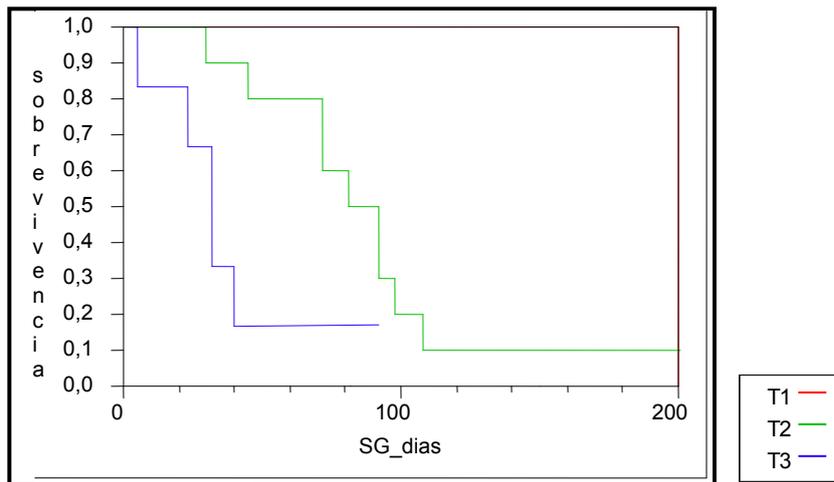


Gráfico 5 - Curva de Kaplan-Meier descrevendo a sobrevivência global de 17 gatos submetidos a cirurgia por estadiamento T ($X^2= 11$, $p= 0,004$).

3.2.5.2 Estadiamento N

Em cães o tempo médio de sobrevivência para o estágio N0 foi de 224 dias ($\bar{x} \pm 29$ dias), verificando-se 41% de animais vivos aos 365 dias. Para o estágio N1 o tempo médio de sobrevivência foi de 220 dias ($\bar{x} \pm 44$ dias), com 0% de animais vivos aos 365 dias.

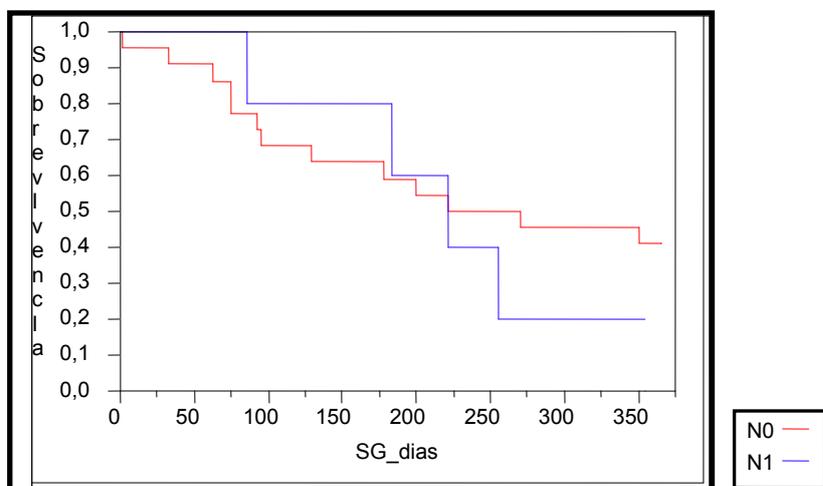


Gráfico 6 - Curva de Kaplan-Meier descrevendo a sobrevivência global de 29 cães submetidos a cirurgia por estadiamento N ($X^2= 1,1$; $p= 0,29$).

Em gatos não foi verificado qualquer caso com infiltração ganglionar no momento do diagnóstico e/ou do procedimento cirúrgico.

3.2.6 Tipo histológico

O tempo médio de sobrevivência global foi de 235 dias ($\bar{x} \pm 29$ dias) em cães com MM, verificando-se 9% de animais vivos ao fim de 1 ano. O tempo médio de sobrevivência

para o cão com CE não foi atingido, verificando-se 53% de animais vivos ao final de um ano. Nos cães com FS o tempo médio de sobrevivência global foi de 167 dias ($\bar{d} \pm 19$ dias), verificando-se 33% de animais vivos aos 365 dias. Foi excluído da análise estatística um caso com diagnóstico de osteossarcoma.

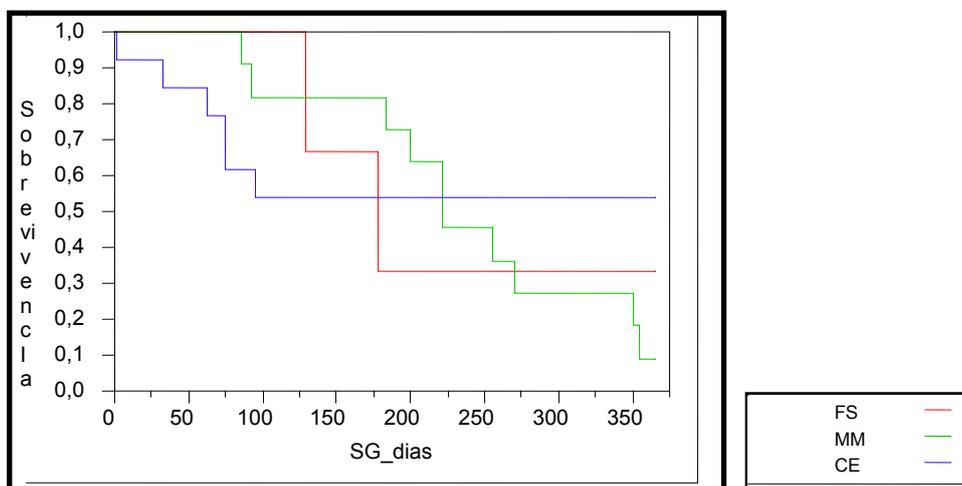


Gráfico 7 – Curva de Kaplan-Meier descrevendo a sobrevivência global dos 28 cães submetidos a cirurgia para neoplasia oral por tipo histológico ($X^2 = 1,39$; $p=0,49$)

No gato o tempo médio de sobrevivência global foi de 65 dias, verificando-se 6% de animais vivos aos 108 dias. Foram excluídos da análise um caso de fibrossarcoma e o caso de condrossarcoma.

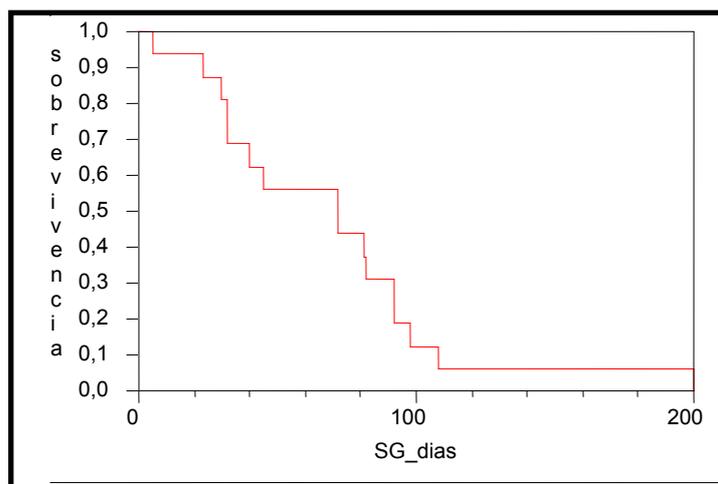


Gráfico 8 - Curva de Kaplan-Meier descrevendo o tempo de sobrevivência global dos 16 gatos com CE submetidos a cirurgia.

3.2.7. Comparação de resultados por tipo histológico mais frequente

Com o objectivo de permitir uma melhor comparação dos resultados, estes foram compilados em tabela (Tabela 8). O CE foi para ambas as espécies a neoplasia mais frequentemente diagnosticada. No cão foi a neoplasia em que os animais apresentaram maior tempo de sobrevivência, não tendo sido atingido o tempo médio de sobrevivência durante o período de estudo de um ano.

Tabela 8 – Caracterização da amostra em estudo por classificação histológica mais frequente (CE, FS e MM)

		Tipo histológico											
		CE				MM			FS				
		Cão		Gato		Cão		Gato	Cão		Gato		
		n=13	%	n=16	%	n=10	%	n=0	n=3	%	n=1	%	
Idade		11,7	-	13	-	11	-	-	6,3	-	17	-	
Sexo	Macho	9	69,2	11	68,8	7	70,0	-	2	66,7	1	100,0	
	Fêmea	4	30,7	5	31,2	3	30,0	-	1	33,3	0	0,0	
Localização	Mandibular	7	53,8	8	50,0	3	30,0	-	1	33,3	0	0,0	
	Maxilar	5	38,5	5	31,2	2	20,0	-	2	66,7	1	100,0	
	Mucosa	0	0,0	0	0,0	5	50,0	-	0	0,0	0	0,0	
	Tonsilar	1	7,7	0	0,0	0	0,0	-	0	0,0	0	0,0	
	Sublingual	0	0,0	3	18,8	0	0,0	-	0	0,0	0	0,0	
Estadiamento	T	T1a	1	7,7	0	0,0	1	10,0	-	0	0,0	0	0,0
		T1b	2	15,3	1	6,2	0	0,0	-	0	0,0	0	0,0
		T2a	1	7,7	5	31,2	4	40,0	-	0	0,0	0	0,0
		T2b	4	30,8	4	25,0	3	30,0	-	1	33,3	1	100,0
		T3a	4	30,8	2	12,5	1	10,0	-	0	0,0	0	0,0
		T3b	1	7,7	4	25,0	1	10,0	-	2	66,7	0	0,0
	N	N	13	100,0	12	75,0	5	50,0	-	3	100,0	1	100,0
		N+	0	0,0	4	25,0	5	50,0	-	0	0,0	0	0,0
Tempo médio de sobrevivência (dias)		Não atingido		167 ($\bar{\delta}\pm 19$)		235 ($\bar{\delta}\pm 29$)		-	69 ($\bar{\delta}\pm 12$)		-		
Animais vivos ao fim de 1 ano (%)		53		33		9		-	0		-		

3.2.8. Mortalidade

No total da amostra, 12 cães (41%) encontravam-se vivos no final do estudo, isto é, aos 365 dias, o que não se verificou em nenhum gato. As causas de morte registadas incluíram eutanásia, morte secundária à neoplasia ou morte não relacionada com o tumor. No cão a mortalidade por eutanásia ocorreu em 9 (52,9%) dos 17 animais, seguida de 6 casos secundários à neoplasia (35,2%) e 2 não relacionados com o tumor (11,7%). No gato a mortalidade por eutanásia teve lugar em 6 (33,3%) dos 18 casos, secundária à neoplasia em 9 (50,0%) animais e não esteve relacionada com o processo oncológico em 3 (16,7%) situações.

Tabela 9 – Causas de morte no cão e no gato submetidos a cirurgia de neoplasia oral

Causa de morte	Cão		Gato	
	n=17	%	n=18	%
Eutanásia	9	52,9	6	33,3
Morte secundária a neoplasia	6	35,2	9	50
Morte não relacionada	2	11,7	3	16,7
Total	17	100,0	18	100

3.2.9 Expressão para o marcador nuclear Ki-67

Das 47 amostras submetidas a estudo IHQ para o marcador nuclear Ki-67, apenas 25 coraram positivamente. Destas, 19 corresponderam a neoplasias de cães e 6 pertenciam a gatos.

3.2.9.1 Relação entre a expressão de Ki-67 com a sobrevivência global

Foram verificadas diferenças no prognóstico relativamente à expressão de Ki-67. No gráfico 9 a curva correspondente a uma expressão de Ki-67 inferior a 50%, é pronunciadamente mais baixa. A sobrevivência aos 365 dias para o GR1 (Ki-67≤50%) foi de 21%, comparativamente com o GR2 (Ki-67>50%), cuja sobrevivência ao fim do mesmo período foi de 45%.

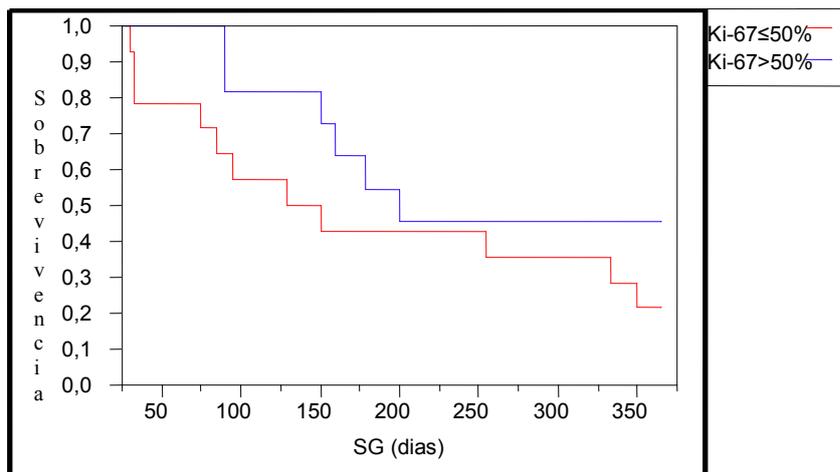


Gráfico 9 – Curva de Kaplan-Meier descrevendo a sobrevivência global de 25 cães e gatos submetidos a cirurgia, estratificados por expressão para o marcador nuclear Ki-67 ($X^2 = 1,83$, $p = 0,17$).

4. Discussão

A cavidade oral é o quarto local mais comum de ocorrência de neoplasias no cão e no gato (Oakes *et al.*, 1993). O estabelecimento do prognóstico depende da determinação de diversos parâmetros. A classificação e o grau histológico do tumor, o seu estadiamento no que diz respeito à dimensão, presença de metastização ganglionar ou à distância e localização da neoplasia na cavidade oral revestem-se de particular importância. Para além destes, também os parâmetros laboratoriais tais como marcadores moleculares e histopatológicos relacionados com mecanismos moleculares específicos do cancro, marcadores de proliferação, factores de crescimento, entre outros, têm influência no prognóstico (Kosovsky *et al.*, 1991; Hammer *et al.*, 1995; Théon *et al.*, 1997; Modiano e Ritt, 1999; Millanta *et al.*, 2002; Liptak e Withrow, 2007).

Este estudo pretendeu determinar qual a influência de parâmetros clínicos e histopatológicos, assim como a expressão do factor nuclear Ki-67 no prognóstico de neoplasias orais no cão e no gato. A amostra incluiu 47 animais com neoplasias orais malignas não odontogénicas com indicação cirúrgica. Procedeu-se à localização da neoplasia, realizou-se o estadiamento tumoral, o diagnóstico histopatológico e o acompanhamento clínico do paciente durante um ano.

As principais dificuldades encontradas na realização deste trabalho prenderam-se com os critérios de inclusão. Uma vez que a determinação do estadiamento tumoral passa pelo recurso a meios auxiliares ao diagnóstico, nomeadamente a radiologia e/ou a TAC, nem sempre os proprietários se encontraram disponíveis para a sua realização, sobretudo devido a restrições económicas. Por este motivo foram excluídos do estudo vários animais. Outro obstáculo importante foi o acompanhamento dos pacientes durante o período de um ano. Em medicina veterinária o *lost to follow up* é frequente, o que também contribuiu para reduzir o número de animais.

A idade média de ocorrência de tumores orais foi de 11,3 anos para o cão e 13,3 anos para o gato, valores concordantes com 7 a 12 anos para todas as neoplasias no cão e 10 a 13 anos para todas as neoplasias no gato (Stebbins *et al.*, 1989; Kosovsky *et al.*, 1991; Heyman *et al.*, 1992; Hammer *et al.*, 1995; Horsting *et al.*, 1998; Northrup *et al.*, 2006; Liptak e Withrow, 2007).

Neste estudo o número de machos da espécie canina surgiu sobrerrepresentado. Apesar de não existir predisposição de género para a maioria das neoplasias orais (Coyle e Garret, 2009), na revisão bibliográfica verificou-se uma maior predisposição em cães machos relativamente ao MM e ao FS (Liptak e Withrow, 2007) e uma maior predisposição em fêmeas para o OS axial (Heyman *et al.*, 1992). No gato não foi demonstrada qualquer predisposição de género no presente trabalho o que está de acordo com o referido em estudos anteriores (Northrup *et al.*, 2006; Hayes *et al.*, 2007).

No cão a maioria dos indivíduos eram de raça indefinida. No que respeita a raças, a Caniche, a Cocker, a Labrador e a Pastor Alemão foram as mais representadas, conforme descrito anteriormente (Head *et al.*, 2002; Kessler, 2006; Liptak e Withrow, 2007). No gato a maioria dos animais estudados eram de raça europeu comum, o que também está de acordo com a literatura (Northrup *et al.*, 2006; Hayes *et al.*, 2007).

Neste estudo, o CE foi o tumor mais frequentemente diagnosticado nos cães (44,8%), seguido do MM (37,9%) e do FS (10,3%). Na maioria dos estudos anteriores, o MM foi a neoplasia maligna não odontogénica mais frequente na cavidade oral desta espécie, com uma prevalência entre 30 a 40% no MM, 17 a 25% no CE e 8 a 25% no FS (Kosovsky *et al.*, 1991; Dhaliwall *et al.*, 1998; Horsting, 1998; Ramos-Vara *et al.*, 2000; Herring *et al.* 2002; Liptak e Withrow, 2007). Estas diferenças poderão ter sido devidas ao acaso. No entanto, resultados similares foram obtidos em 3 estudos que envolveram um total de 893 tumores, constituindo o CE a neoplasia de maior prevalência (41%), seguido do MM (37%) e do FS (22%) (Cohen *et al.*, 1964; Dorn e Priester, 1976; Todoroff e Brodey, 1979), tendo sido recentemente corroborados por outros autores (Kessler, 2003; Broden *et al.* 2009).

No gato o CE foi a neoplasia mais frequentemente diagnosticada (88,8%), seguida do FS (5,5%). Valores semelhantes foram obtidos noutros estudos, com prevalências que variam entre 60 a 75% no caso do CE e 13 a 17% no FS (Stebbins *et al.*, 1989; Northrup *et al.*, 2006; Liptak e Withrow, 2007).

As localizações mais frequentes dos tumores orais em ambas as espécies foram a maxila e a mandíbula, o que também está de acordo com o descrito na literatura (Stebbins *et al.*, 1989; Kosovsky *et al.*, 1991; Dhaliwall *et al.*, 1998; Horsting *et al.*, 1998; Ramos-Vara *et al.*, 2000; Northrup *et al.*, 2006; Liptak e Withrow, 2007).

Para ambas as espécies a maioria dos tumores orais foram diagnosticados em estádios avançados. Dos 29 cães, em 25 o diagnóstico foi realizado no estágio T2 ou superior, tendo-se observado envolvimento ósseo em 16 casos, o que está de acordo com o descrito (Todoroff *et al.*, 1979; White, 1992; Théon *et al.*, 1997; Kessler, 2003). A metastização linfática ou à distância foi apenas observada no caso do MM. Nos 11 cães com este tipo de neoplasia, em 5 existia infiltração ganglionar aquando do diagnóstico. A causa de morte em todos estes animais foi secundária a metastização pulmonar, tendo sido a morte devida a eutanásia em 6 casos.

Dos 18 gatos em estudo, 17 encontravam-se num estágio avançado na altura do diagnóstico. Em 11 foi observado envolvimento ósseo, tanto nas neoplasias com situação mandibular como maxilar. Apenas nas neoplasias com localização sublingual se registou infiltração linfática aquando do diagnóstico. Nenhum caso se acompanhou de metastização à distância, o que é concordante com o comportamento biológico deste tipo

de neoplasias nesta espécie (Patnaik e Mooney, 1988; Ogilvie *et al.*, 1995; Northrup *et al.*, 2006; Liptak e Withrow 2007; Esplin, 2008).

O diagnóstico tardio das neoplasias localizadas na cavidade oral é comum em medicina veterinária (Kessler, 2006; Liptak e Withrow, 2007). Devido à sua evolução silenciosa, muitos tumores não conduzem a deformações faciais evidentes, nem se fazem acompanhar por alterações clínicas facilmente identificáveis. Por outro lado, os tumores com esta localização não são facilmente visíveis, só o sendo quando atingem dimensões acentuadas. A sensibilidade e a atenção que um proprietário dispensa ao seu animal são factores importantes para o reconhecimento precoce da doença. Acresce ainda que a observação da cavidade oral depende do temperamento do animal, só sendo possível em animais colaborantes. Esta situação é particularmente difícil no gato, espécie onde a sintomatologia clínica é muito discreta. Assim, o exame clínico adequado da cavidade oral só consegue ser realizado sob sedação ou mesmo anestesia, o que também contribui para o diagnóstico tardio destas neoplasias. Por fim, o papel do médico veterinário é fundamental na elaboração rápida do diagnóstico e implementação de medidas terapêuticas adequadas, uma vez que a evolução clínica destas neoplasias é muito rápida (MacEwen 1990; Klein 2003).

O diagnóstico numa fase avançada da evolução tumoral influencia negativamente o prognóstico pelo que, no presente estudo, terá sido certamente um dos factores que mais contribuiu para os resultados obtidos em relação ao tempo médio de sobrevivência global e ao número de animais vivos ao fim de um ano.

Em medicina veterinária o tempo de sobrevivência global não é correctamente avaliado, uma vez que a morte por eutanásia suspende o tempo natural de vida. Muitos proprietários precipitam a morte do seu animal de estimação por anteciparem, por vezes numa fase precoce, uma degradação da sua qualidade de vida, por razões do foro económico ou por indisponibilidade pessoal. Assim, a eutanásia constitui um factor limitante para a correcta avaliação da sobrevivência global. Por esta razão o *endpoint* é um parâmetro que se reveste de grande importância em medicina veterinária, uma vez que permite uma correcta avaliação do prognóstico, num grupo de pacientes com diferentes causas de morte, relacionadas ou não com a doença em estudo, o que se torna fundamental tanto para a interpretação dos resultados como para a comparação dos diversos estudos (Theon *et al.*, 1997).

No presente trabalho a morte por eutanásia deveu-se sobretudo a razões relacionadas com a diminuição da qualidade de vida dos animais. Constituiu a principal causa de morte na espécie canina, tendo sido realizada em 53% dos animais, durante o período em que o estudo se realizou. Foi realizada em 5 casos de MM devido a

metastização pulmonar, 3 casos de FS e 1 de fibro-condro-osteossarcoma devido a a recorrência local e ausência de controlo loco-regional

Dos 18 gatos em estudo, 6 pereceram devido a eutanásia, o que representou 33% das causas de morte. Nesta espécie as causas de eutanásia deveram-se sobretudo a ausência de controlo local da neoplasia e a anorexia prolongada em 5 casos de CE e 1 caso de FS.

A recorrência local da neoplasia teria constituído um *endpoint* mais fidedigno em vez da medição absoluta de tempo de controlo local (Théon *et al.*, 1997). A medição da recorrência local é uma extensão da medição de controlo local do tumor. No entanto, este conceito implica a erradicação completa da doença, a qual não pode ser determinada com exatidão em animais, devido à ausência de testes auxiliares ao diagnóstico capazes de garantir a inexistência de doença residual mínima.

Neste estudo de série de casos foi possível identificar factores relacionados com o prognóstico para estas neoplasias. No entanto, o período de estudo prospectivo de 1 ano foi por vezes limitativo na determinação do tempo médio e da percentagem de sobrevivência para alguns dos factores estudados com interesse no prognóstico. O aparecimento de pacientes com neoplasia oral acontece de forma casual, pelo que, para alguns tipos de tumor, os itens localização e estadiamento, contaram com um número de animais reduzido. Como na maioria dos estudos clínicos, o acaso influenciou de alguma forma determinados resultados, sendo este assunto discutido posteriormente.

O tempo médio de sobrevivência global no cão foi de 224,7 dias ($\bar{d} \pm 24,4$ dias), encontrando-se 42% dos animais vivos no final do período de estudo para todas as neoplasias orais, independentemente do tipo histológico ou da localização. Foi possível estabelecer uma comparação, em termos gerais e no que é comparável, com os resultados obtidos por Kessler (2006) que relata uma sobrevivência pós-cirúrgica de cerca de 40% de animais vivos no final do período de estudo e cerca de 2 anos de tempo médio de sobrevivência, em 31 neoplasias com diferentes tipos histológicos e diferentes localizações. Noutros trabalhos, o tempo médio de sobrevivência global e a percentagem de sobrevivência ao fim de um ano, incluem apenas animais submetidos a uma única técnica cirúrgica, a mandibulectomia ou a maxilectomia (Kosovsky *et al.*, 1991; Wallace *et al.*, 1992; Felizzola *et al.*, 2002; Northrup *et al.*, 2006; Kessler, 2006) ou a outras abordagens terapêuticas como a radioterapia ou a quimioterapia (Théon *et al.*, 1997; Bregazzi *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2005). Na literatura existem ainda outros estudos mas de natureza epidemiológica ou descritivos, que incidem sobre um único tipo histológico de neoplasia oral ou que incluem tumores com diferentes localizações, não sendo assim exclusivos da cavidade oral (Patnaik e Mooney, 1988; Straw *et al.*, 1996; Ramos-Vara *et*

al., 2000; Head *et al.*, 2002; Hayes *et al.*, 2007; Liptak e Withrow, 2007), o que torna difícil a comparação.

No gato, o tempo médio de sobrevivência global foi de 73,8 dias ($\bar{d}\pm 12,0$ dias), tendo-se verificado uma sobrevivência de 16% aos 90 dias e 0% aos 150 dias. Comparando as duas espécies, verificaram-se diferenças com significado estatístico em termos de prognóstico pós-cirúrgico ($X^2= 21,5$ e $p < 0,0001$). A amostra de gatos estudada apresentou um pior prognóstico. Para o gato, os resultados de tempo médio de sobrevivência global e a percentagem de animais vivos ao fim de 1 ano obtidos, podem ser apenas parcialmente comparados com estudos anteriores. Hayes *et al.* (2009) referem 44 dias como tempo médio de sobrevivência em 54 casos com e sem tratamento de CE oral. Em contrapartida, Northrup *et al.* (2007) referem períodos de tempo superiores a 3 anos em gatos submetidos a mandibulectomia. Este estudo incluiu animais com diversos tipos de neoplasias mas apenas de localização mandibular. Esta localização conduz a um maior sucesso cirúrgico devido a permitir obter boas margens de segurança, o que se reflecte numa maior percentagem de animais vivos ao fim de um ano. Saliencia-se ainda o facto de naquele trabalho, cerca de 50% das neoplasias possuírem localização rostral e menos de 50% dos gatos apresentarem CE. O limitado tempo médio de sobrevivência verificado no presente trabalho resulta por isso do reflexo de vários factores. Dos 18 gatos estudados, 88% apresentavam o diagnóstico de CE. Este tipo de tumor é o que apresenta pior prognóstico com um menor tempo de sobrevivência (Northrup, *et al.*, 2006; DiBernardi *et al.*, 2007; Hayes *et al.*, 2007), quando comparado com outras neoplasias orais como o FS ou o OS. Na distribuição das neoplasias por localização, algumas possuem naturalmente pior prognóstico como é o caso da sublingual. Os gatos com CE de localização sublingual, que neste trabalho foram 2 casos, atingiram tempos de sobrevivência muito reduzidos, 31 e 50 dias. Em simultâneo, 94% dos felinos em estudo encontravam-se em estádios avançados da doença, com 55% dos casos no estágio T2 e 39% em T3. Assim, o estágio avançado associado a uma localização desfavorável em relação à obtenção de amplas margens cirúrgicas, justifica o reduzido tempo de sobrevivência obtido. Neste contexto convém também referir o contributo da eutanásia nos resultados obtidos. A eutanásia teve lugar em 33% dos casos estudados, assumindo assim no gato um peso importante nas causas de morte. O número de animais estudados pode igualmente ter contribuído para os resultados obtidos e para a dificuldade de comparação com outros estudos. O número reduzido de gatos em alguns ítems analisados resultou na exclusão de alguns deles na análise estatística, por exemplo, é necessário um número mínimo de casos para a realização de um gráfico de sobrevivência. No tipo histológico foram excluídos da curva um caso de FS e um caso de osteo-condrossarcoma. Na análise comparativa de sobrevivência por localização, foi excluído um gato com tumor

localizado na mucosa. Em relação ao estadiamento foi excluído um gato com estágio T1. Igualmente não foi efectuado no gato o gráfico comparativo para o estadiamento N, por ausência de casos com infiltração ganglionar na altura do diagnóstico.

Nenhum animal neste estudo se apresentou no estágio M1, aquando do diagnóstico. Este facto resulta, muito provavelmente, de um viés de selecção. Em medicina veterinária, por norma, os animais com metastização à distância não são considerados elegíveis para cirurgia. Esta teria apenas uma intenção paliativa e poucos proprietários estão dispostos a suportar os custos inerentes a esta abordagem, em animais cujo prognóstico é muito reservado.

A idade e o sexo não constituíram factores de prognóstico uma vez que não foi verificada associação com significado estatístico entre o sexo, a idade e a variável “bom prognóstico” constituída pelos animais com tempos médios de sobrevivência global superior a 1 ano (Sexo: $p=0.57$ para o cão e $p=0,40$ para o gato, Idade: $p=0,856$ para o cão e $p=0,624$, para o gato).

A determinação do tempo médio de sobrevivência global por tipo de tumor para a amostra de cães e de gatos concorda, no que é comparável, com alguns estudos publicados. No cão o tempo médio de sobrevivência global foi de 235 dias ($\bar{\delta}\pm 29$ dias) no caso do MM. Este resultado é concordante com os obtidos por Kosovsky *et al.* (1991) e Wallace *et al.* (1992) que referem um tempo médio de sobrevivência global pós-cirúrgico de cerca de 270 dias. Já Murphy *et al.* (2005) mencionam 307 dias mas, neste estudo, os animais foram submetidos a radioterapia e a quimioterapia. O tempo de sobrevivência global para o CE não foi atingido, uma vez que a maioria dos animais, 53% do total de casos, se encontrava vivo no final do período de estudo de 1 ano. Estes resultados concordam em termos médios com os referidos na literatura uma vez que, estudos anteriores, referem uma taxa de sobrevivência ao fim de 1 ano de 57% para hemimaxilectomia e 71% para mandibulectomia (Kosovsky *et al.*, 1991; Wallace *et al.*, 1992). O tempo de sobrevivência global nos cães com FS foi de 167 dias ($\bar{\delta}\pm 19$ dias), com 33% de animais vivos ao fim de 1 ano. Este período de tempo é inferior ao mencionado na literatura, que refere tempos de sobrevivência de 270 e de 365 dias (Kosovsky *et al.*, 1991; Wallace *et al.*, 1992). Apesar destas diferenças, a percentagem de animais vivos obtidos no final do período de estudo, que foi de 33%, concordando com o intervalo de sobrevivência verificado nos diferentes estudos, 25 a 50% (Kosovsky *et al.*, 1991; Wallace *et al.*, 1992; Ciekot *et al.*, 1994). Esta incongruência entre o tempo médio de sobrevivência global e a percentagem de animais vivos no final do período de estudo pode ser atribuída sobretudo ao número reduzido de animais incluídos, potenciado pelo facto de alguns animais se encontrarem em estádios avançados e com localização maxilar na altura do procedimento cirúrgico. Foram incluídos no estudo 3 animais com FS, dos quais 1

encontrava-se em estágio T2b, 2 casos em T3b, e 2 casos apresentavam localização maxilar.

Foram verificadas diferenças, embora sem significado estatístico ($\chi^2 = 1,39$ e $p = 0,49$), no prognóstico para os diferentes tipos histológicos de neoplasias estudados. Da comparação das curvas de sobrevivência resultantes para o cão, foi possível verificar que o CE foi o que apresentou melhor prognóstico em termos de sobrevivência global e de tempo médio de sobrevivência após cirurgia, o que está de acordo com os diferentes autores (Kosovsky *et al.*, 1991; Wallace *et al.*, 1992; Salisbury, 2002; Kessler, 2006; Liptak e Withrow, 2007; Coyle e Garret, 2009).

No gato foi apenas possível determinar a curva de sobrevivência para o CE, devido ao facto de os outros tipos histológicos de neoplasias terem tido um número insuficiente de indivíduos. Verificou-se que o CE oral no gato teve um tempo médio de sobrevivência global de 69 dias, o que concorda com outros estudos. Hayes *et al.* (2007) relata um tempo médio de sobrevivência global de 44 dias e Bregazzi *et al.* (2001) de 60 dias após radioterapia. Resultados diferentes são referidos por Northrup *et al.* (2006) que obtiveram tempos médios de sobrevivência pós-cirúrgicos de 217 dias. Esta diferença pode dever-se ao facto de neste estudo apenas se incluir gatos com neoplasias de localização mandibular e portanto com melhor prognóstico em termos cirúrgicos, por facilidade de obtenção de margens amplas. No presente trabalho, a amostra de gatos com CE foi constituída por 8 animais com localização mandibular, 5 maxilar e 3 sublingual. Como referido anteriormente, esta última localização é considerada na literatura como a localização com pior prognóstico (Liptak e Withrow, 2007). Neste estudo assumiu um peso importante no tempo de sobrevivência obtido uma vez que esta localização foi verificada em 16,6% dos casos.

No que diz respeito à variável “localização”, no cão, foram verificadas diferenças na comparação das curvas de sobrevivência por localização, embora sem significado estatístico ($\chi^2 = 1,86$, $p = 0,39$). Nas neoplasias de localização na mucosa, o prognóstico parece ser menos favorável, verificando-se 18% de sobrevivência ao fim de 1 ano, para todos os tipos histológicos. Este facto justifica-se sobretudo no tipo histológico mais frequentemente diagnosticado nesta localização, isto é, o MM. Este tipo histológico apresentou 9% de animais vivos ao fim de um ano deste estudo. Para a localização maxilar, a percentagem de animais vivos no final do período de estudo foi de 33%, concordando, no que é comparável, com Wallace *et al.* (1992) que referem valores percentuais de sobrevivência de animais submetidos a maxilectomia por tipo histológico entre os 57% para CE e o 1,7% para OS a neoplasia que apresentou pior prognóstico.

A localização mandibular foi onde se verificou um melhor prognóstico, com 50% de sobrevivência ao fim de 1 ano. Estes resultados concordam com Kosovsky *et al.* (1991)

que obtiveram uma variação na percentagem de sobrevivência, por tipo histológico, em animais submetidos a mandibulectomia, entre os 35% para o OS e os 91% para o CE. Como referido anteriormente, a localização mandibular também nesta espécie se faz acompanhar por um melhor prognóstico. Este estudo incluiu apenas um caso de localização tonsilar pelo que não foi possível efectuar o desenho da curva de sobrevivência ou fazer comparações em termos de prognóstico, entre esta localização e as restantes. Esta localização surge descrita na literatura como a que apresenta pior prognóstico (Théon *et al.*, 1997). Apesar de no cão o CE ter esta localização com alguma frequência, os animais afectados raramente constituem pacientes com indicação cirúrgica, uma vez que em 50% dos casos ocorre metastização linfática e pulmonar.

Ainda relativamente à variável localização foram apenas verificadas diferenças estatisticamente significativas nas curvas de sobrevivência para o gato ($X^2 = 18,8$; $p = 0,0003$). Nesta espécie, a localização sublingual foi a que apresentou pior prognóstico, o que está de acordo com a literatura, contudo esta é omissa em relação aos valores de sobrevivência média global pós-cirúrgica (Liptak e Withrow, 2007).

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram estabelecer uma comparação de tempos de sobrevivência e percentagem de sobrevivência, em termos gerais e no que é comparável, com os referidos na literatura. A bibliografia disponível diz respeito a estudos de sobrevivência em animais submetidos a uma única técnica cirúrgica, mandibulectomia ou maxilectomia (Kosovsky *et al.*, 1991; Wallace *et al.*, 1992; Felizzola *et al.*, 2002; Kessler, 2006; Northrup *et al.*, 2006) ou a tratamentos não cirúrgicos como a radioterapia e/ou a quimioterapia (Théon *et al.*, 1997; Bregazzi *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2005). Na literatura existem ainda outros estudos mas de cariz epidemiológico ou apenas descritivos. Estes estudos envolvem um maior número de animais mas avaliam apenas a ocorrência da afecção, ou incidem num único tipo histológico nas suas diferentes localizações, isto é, não incluem apenas a cavidade oral, ou incidem num único tipo histológico de tumor oral (Patnaik *et al.*, 1988; Straw *et al.*, 1996; Ramos-Vara *et al.*, 2000; Head *et al.*, 2002; Hayes *et al.*, 2007; Liptak e Withrow, 2007).

A determinação da cinética celular é importante na avaliação da actividade proliferativa de qualquer neoplasia. O anticorpo Ki-67 é um dos marcadores mais utilizados na avaliação e/ou determinação da fracção de crescimento de uma determinada população celular, possuindo um papel de relevo na determinação da fracção de crescimento das neoplasias (Scholzen e Gerdes, 2000).

O presente estudo pretendeu avaliar o valor prognóstico do factor nuclear Ki-67 assim como a sua potencial utilidade clínica, para além das variáveis clínicas anteriormente referidas. Os resultados demonstraram, em ambas as espécies, diferenças

nas curvas de sobrevivência para as diferentes intensidades de expressão. Apesar das diferenças observadas, elas não apresentaram significado estatístico ($X^2 = 1,83$, $p = 0,17$). Estes resultados são o reflexo do número reduzido de amostras estudadas. Observou-se uma marcação positiva para este marcador em 53% dos casos, o que correspondeu a 25 amostras. No presente estudo 47% das amostras não apresentaram coloração positiva, o que pode ser justificado pelo recurso a anticorpos desenhados para antígenos humanos que apresentam reactividade cruzada antígeno humano-antígeno animal, eles podem não corar determinadas amostras por não existir analogia de anticorpos suficiente. O comprometimento da expressão deste marcador nas restantes 22 amostras pode também ser devido a uma conservação prolongada em formalina a 10%, ao processo de descalcificação utilizado na rotina laboratorial para o diagnóstico de neoplasias com invasão óssea ou por degradação da amostra durante o seu armazenamento.

O número de amostras com resultados válidos permitiu estabelecer uma comparação geral em termos de sobrevivência para todas as neoplasias. No entanto, seria necessário um aumento do número de amostras de forma a poder obter resultados mais conclusivos. O número reduzido de casos com expressão válida de Ki-67 impossibilitou a estratificação da amostra por tipo histológico. Também não foi possível efectuar a análise comparativa de sobrevivência por espécie, por tipo histológico, por localização e por estadiamento em função da expressão de Ki-67.

De uma forma geral, existe uma relação entre um elevado índice de proliferação e uma melhor resposta a terapêuticas dirigidas às fases activas do ciclo celular, como a radioterapia e a quimioterapia (Valente *et al.*, 1994; Grabenbauer *et al.*, 2000). Simultaneamente é reconhecida uma correlação entre o aumento de expressão deste marcador e uma maior recorrência local da neoplasia (Sittel *et al.*, 1999; Xie *et al.*, 1999; Couture *et al.*, 2002, Silva *et al.*, 2004; De Aguiar *et al.*, 2007). Em medicina veterinária os estudos de Ki-67 em diversos tipos de neoplasia permitiram estabelecer de alguma forma uma relação entre este e o prognóstico. Millanta *et al.* (2002) estabeleceram uma relação com significado estatístico entre a positividade da expressão de Ki-67 (clone MIB-1) e um menor tempo de sobrevivência global, para uma amostra de tumores melanocíticos, nos quais o MM estava incluído. Num estudo realizado em 121 cães com mastocitomas foi demonstrada a positividade da expressão deste marcador, como preditivo de prognóstico no mastocitoma, associando uma maior expressão de Ki-67 a um menor tempo de sobrevivência (Scase *et al.*, 2006). Foi ainda possível realizar a estratificação das amostras de mastocitomas de grau 2 em dois subgrupos, com diferentes prognósticos a partir do índice de expressão deste marcador. Peña *et al.* (2006) estabelecem uma relação entre os elevados índices de proliferação para o Ki-67 e a presença de

metástases, morte por neoplasia e reduzido tempo médio de sobrevivência global e sobrevivência livre de doença.

As diferenças verificadas neste trabalho permitem apontar na direcção da potencial utilização deste marcador na estratificação de subgrupos de animais a partir de diferentes níveis da sua expressão. A determinação de diferenças na expressão deste marcador dentro dos diferentes tipos histológicos resultará na selecção de subgrupos de animais com diferentes prognósticos, que poderão responder de forma diferente a determinados protocolos terapêuticos. À semelhança de outros estudos efectuados em animais e humanos este marcador poderá ter um papel importante em termos preditivos de prognóstico para as neoplasias orais no cão e no gato.

5. Conclusão e perspectivas futuras

Os tumores malignos não odontogénicos da cavidade oral no cão e no gato possuem um comportamento biológico muito variável. São neoplasias que, de uma forma geral, apresentam um prognóstico reservado em medicina veterinária, estando fortemente associados a uma elevada recidiva local ou a metastização à distância, especialmente para o MM.

Ainda que o desfecho clínico em neoplasias orais seja frequentemente determinado por factores clínico-patológicos, dentro do mesmo estágio e tipo histológico o desfecho clínico pode ser diferente entre animais.

Apesar de a cirurgia ser o tratamento de eleição para estas neoplasias, torna-se cada vez mais importante determinar outros parâmetros clínico-patológicos e laboratoriais, capazes de prever o prognóstico face ao tratamento instituído. Alguns desses factores poderão auxiliar na determinação de estratégias terapêuticas complementares capazes de melhorar o prognóstico destes animais. À semelhança dos resultados verificados em medicina humana, o factor nuclear Ki-67 parece ter um papel relevante no prognóstico. São necessários mais estudos com o objectivo de estabelecer qual o valor preditivo deste factor nuclear, bem como permitir a estratificação de subtipos histológicos capazes de exibirem uma melhor resposta face a determinadas estratégias terapêuticas, nomeadamente a radioterapia.

5. Bibliografia

- Bateman, K. E., Catton, P. A. Pennock, P. W., Kruth, S. A. (1994). "Therapy for the palliation of advanced cancer in dogs." J Vet Int Med **8**:394-399.
- Bergman, P.J., McKnight, J., Novosad, A., Charney, S., Farrelly, J., Craft, D., Wulderk, M., Jeffers, Y., Sadelain, M., Hohenhaus, A. E., Segal, N., Gregor, P., Engelhorn, M., Riviere, I., Houghton, A. N., Wolchok, J. D. (2003). "Long-Term Survival of Dogs with Advanced Malignant Melanoma after DNA Vaccination with Xenogeneic Human Tyrosinase: A Phase I Trial." Clin Cancer Res **9**(4):1284-1290.
- Beck, E.R., Withrow, S.J. (1986). "Canine tongue tumours: a retrospective review of 57 cases." J Am Anim Hosp Assoc **22**(4):525-532.
- Bertone, E.R., Snyder, L. A., Moore, A. S. (2003). "Environmental and lifestyle risk factors for oral squamous cell carcinoma in domestic cats." J Vet Int Med **17**(4), 557-562.
- Blot, W. J., McLaughlin, J. K., Devesa, S.S. , Fraumeni, J.F. (1996). "Cancers of the oral cavity and pharynx." In: D. Schottenfeld and J. F. Fraumeni (Eds.) *Cancer epidemiology and prevention*. New York, Oxford University Press: 666-680.
- Boria, P. A., Murry, D. J., Bennett, P. F., Glickman, N. W., Snyder, P. W., Merkel, B. L., Schlittler, D. L., Mutsaers, A. J., Thomas, R. M., Knapp, D. W. (2004). "Evaluation of cisplatin combined with piroxicam for the treatment of oral malignant melanoma and oral squamous cell carcinoma in dogs." J Am Vet Med Assoc **224**(3): 388-94.
- Borthwick, R., Else, R.W., Head, K.W. (1982) "Neoplasia and allied conditions of the canine oropharynx." Vet Ann **22**:248-269.
- Bradley, R.L., MacEwen, E.G. (1984). "Mandibular resection for removal of oral tumors in 30 dogs and six cats." J Am Vet Med Assoc **184**:460-463.
- Bregazzi, V. S., LaRue, S. M., Powers, B. E., Fettman, M. J., Ogilvie, G. K., Withrow, S. J. (2001). "Response of feline oral squamous cell carcinoma to palliative radiation therapy." Vet Radiol Ultrasound **42**(1): 77-9.
- Brennan, J. A., Boyle, J. O., Koch, W. M., Goodman, S. N., Hruban, R. H., Eby, Y. J., Couch, M. J., Forastiere, A. A., Sidransky, D. (1995). "Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck." N Engl J Med **332**(11): 712-7.
- Broden, L.B., Eriksen, T., Kristensen, A.T. (2009)."Oral malignant melanomas and other head and neck neoplasms in Danish dogs – data from the Danish Veterinary Cancer Registry." Act Vet Scand 51:54.
- Carpenter, L.G., Withrow, S.J., Powers, B.E., Ogilvie, G.K.(1993). "Squamous cell carcinoma of the tongue in 10 dogs." J Am Anim Hosp Assoc **29** (1):17-24.
- Ciekot, P. A., Powers, B. E., Withrow, S. J., Straw, R. C., Ogilvie, G. K., LaRue, S. M. (1994). "Histologically low-grade, yet biologically high-grade, fibrosarcomas of the mandible and maxilla in dogs: 25 cases (1982-1991)". J Am Vet Med Assoc **204**(4): 610-615.
- Cohen D., Brodey, R.S., Chen, S. M. (1964). "Epidemiologic aspects of oral and pharyngeal neoplasms of the dog." Am J Vet Res **25**: 1776-1779.

- Couture, C., Raybaud-Diogene, H., Tetu, B., Bairati, I., Murry, D., Allard, J., Fortin, A. (2002). "p53 and Ki-67 as markers of radioresistance in head and neck carcinoma" Cancer **94**(3):713-22
- Coyle, V.J., Garret L.D. (2009). "Finding and treating oral melanoma, squamous cell carcinoma, and fibrosarcoma in dogs." Vet Med **11**(66):74-81.
- De Aguiar, A. F., Kowalski, Jr., L. P., de Almeida, O. P. (2007). "Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral squamous cell carcinoma in patients with early local recurrence." Oral Oncol **43**(6): 593-601.
- De Matos, A.J., Lopes, C.C., Faustino, A. M., Carvalheira, J. G., Dos Santos, M. S., Rutteman, G. R., Gartner Mde, F. (2006). "MIB-1 labelling indices according to clinico-pathological variables in canine mammary tumours: a multivariate study." Antic Res **26**(3A): 1821-1826.
- Dennis, M.M., Ehrhart, N., Duncan, C. G., Barnes, A. B., Ehrhart, E. J. (2006). "Frequency of risk factors associated with lingual lesions in dogs: 1196 cases (1995-2004)" J Am Vet Med Assoc **228**(10): 1533-1537.
- Dervis, N.G. (2008). "Introduction of veterinary oncology and diagnostic approach to the cancer patient." Proceedings, The 15th Congress of FAVA, 27-30 October, Bangkok, Thailand S:71-74.
- Dhaliwall, R.S, Kitchell, B.E., Marreta, S.M. (1998) "Oral tumors in dogs and cats. Part I. Diagnosis and clinical signs" The Comp. Cont. Educ. Pract. Vet. **20**(9): 1001-1024.
- DiBernardi, L., Dore, M., Davis, J. A., Owens, J. G., Mohammed, S. I., Guptill, C. F., Knapp, D. W. (2007). "Study of feline oral squamous cell carcinoma: potential target for cyclooxygenase inhibitor treatment." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **76**(4): 245-50.
- Dorn, C.R., Priester, W.A. (1976). "Epidemiologic analysis of oral and pharyngeal cancer in dogs, cats, horses, and cattle." J Am Vet Med Assoc **169**(11): 1202-1206.
- Esplin, D. G. (2008). "Survival of dogs following surgical excision of histologically well-differentiated melanocytic neoplasms of the mucous membranes of the lips and oral cavity." Vet Pathol **45**(6): 889-96.
- Farrar, M., Sandison, A., Peston, D., Gailani, M. (2004). "Immunocytochemical analysis of AE1/AE3, CK 14, Ki-67 and p53 expression in benign, premalignant and malignant oral tissue to establish putative markers for progression of oral carcinoma." Br J Biomed Sci **61**(3): 117-24.
- Felizzola C.R., Stopiglia, A.J., de Araujo, V. C., de Araujo, N. S. (2002). "Evaluation of a modified hemimandibulectomy for treatment of oral neoplasms in dogs." J Vet Dent **19**(3): 127-135.
- Franceschi, S., Levi, F., Conti, E., Talamini, R., Negri, E., Dal Maso, L., Boyle, P., Decarli, A., La Vecchia, C. et al. (1999). "Energy intake and dietary pattern in cancer of the oral cavity and pharynx." Cancer Causes Control **10**(5): 439-44.
- Gillette, S. M., Gillette E. L. (1995). "Radiation therapy for head and neck cancers". Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal) **10**(3): 168-72.

- Grabenbauer, G. G., Muhlfriedel, C., Rodel, F., Niedobitek, G., Hornung, J., Rodel, C., Martus, P., Iro, H., Kirchner, T., Steininger, H., Sauer, R., Weidenbecher, M., Distel, L. (2000). "Squamous cell carcinoma of the oropharynx: Ki-67 and p53 can identify patients at high risk for local recurrence after surgery and postoperative radiotherapy." Int J Radiat Oncol Biol Phys **48**(4): 1041-50.
- Grier, C. K., Mayer, M. N. (2007). "Radiation therapy of canine nontonsillar squamous cell carcinoma." Can Vet J **48**(11): 1189-91.
- Hafian, H., Venteo, L., Sukhanova, A., Nabiev, I., Lefevre, B., Pluot, M. (2004). "Immunohistochemical study of DNA topoisomerase I, DNA topoisomerase II alpha, p53, and Ki-67 in oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinomas." Hum Pathol **35**(6): 745-751.
- Hammer, A. S., Weeren, F. R., Weisbrode, S. E., Padgett, S. L. (1995). "Prognostic factors in dogs with osteosarcomas of the flat or irregular bones." J Am Anim Hosp Assoc **31**(4): 321-326.
- Hansen K., Khanna C. (2004). "Spontaneous and genetically engineered animal models; use in preclinical cancer drug development." Eur J Cancer **40**(6):858-880.
- Hart, A. K. E., D. W. Karakla, Pitman, K.T., Adams, J.F. (1999). "Oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: A report on 13 cases and review of the literature." Otolaryngol Head Neck Surg **120**(6): 828-833.
- Hayes, A. M., Adams, V. J., Scase, T. J., Murphy, S. (2007). "Survival of 54 cats with oral squamous cell carcinoma in United Kingdom general practice." J Small Anim Pract **48**(7): 394-399.
- Head, K. W., Else, R. W., Dubielzig, R.R. (2002). "Tumors of the alimentary tract." In: D. J. Meuten (Ed.). *Tumors in Domestic Animals*. Ames, Iowa, Iowa State Press: 401-425.
- Herring, E. S., Smith, M. M., Robertson, J. L. (2002) "Lymph node staging of oral and maxillofacial neoplasms in 31 dogs and cats" J Vet Dent **19**(3): 122-126.
- Heyman, S. J., Diefenderfer, D. L., Goldschmidt, M. H., Newton, C. D.(1992). "Canine axial skeletal osteosarcoma. A retrospective study of 116 cases (1986 to 1989)". Vet Surg **21**(4): 304-310.
- Horsting, N., A. von Rechwitz, Wohlsein, P., Bullerdiek, J., Reimann, N., Nolte, I. (1998). "[Oropharyngeal tumors of dogs-a clinical study of 79 cases]." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **111**(7-8): 242-247.
- Hunter, T. (1997). "Oncoprotein networks." Cell **88**:333-346.
- Kessler, M. (2006). "Mandibulectomy and maxillectomy as a treatment for bone invasive oral neoplasia in the dog – a retrospective analysis of 31 patients." Europ J Comp Anim Pract **16**(1): 74-82.
- Kinzel, S., Hein, S., Stopinski, T., Koch, J., Buecker, A., Treusacher, H. P., Schmachtenberg, A., Jansen, T., Eble, M., Kupper, W. (2003). "[Hypofractionated radiation therapy for the treatment of malignant melanoma and squamous cell carcinoma in dogs and cats]." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **116**(3-4): 134-8.

- Kiupel, M., Teske, E., Bostock, D. (1999). "Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma." Vet Pathol **36**(4): 292-300.
- Klein, M. K. (2003). "Multimodality therapy for head and neck cancer." Vet Clin North Am Small Anim Pract **33**(3): 615-28.
- Kosovsky, J. K., Matthiesen, D. T., Marretta, S.M., Patnaik, A.K. (1991). "Results of partial mandibulectomy for the treatment of oral tumors in 142 dogs." Vet Surg **20**(6): 397-401.
- Liptak, J. M., Withrow S. J. (2007). "Cancer of the gastrointestinal tract. Section A: Oral Tumours." In: S. J. Withrow and D. M. Vail (Eds.). *Small Animal Clinical Oncology*. Canada, Saunders Elsevier: 455-475.
- Looper, J.S., Malarkey, D.E., Malarkey, D. E. , Ruslander, D., Proulx, D. , Thrall, D. E. (2006). "Epidermal growth factor receptor expression in feline oral squamous cell carcinomas." Vet Comp Oncol **4**(1): 33-40.
- MacEwen, E. G. (1990). "Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment." Cancer Metastasis Rev **9**(2): 125-136.
- McCaw, D. L., Pope, E. R., Payne, J. T., West, M. K., Tompson, R. V., Tate, D. (2000). "Treatment of canine oral squamous cell carcinomas with photodynamic therapy." Br J Cancer **82**(7): 1297-1299.
- Millanta F, Fratini, F., Corazza, M., Castagnaro, M., Zappulli, V., Poli, A. (2002). "Proliferation activity in oral and cutaneous canine melanocytic tumours: correlation with histological parameters, location, and clinical behavior." Res Vet Sci. **73**(1):45-51.
- Modiano, J. F., Ritt M.G., Wojcieszyn, J. (1999). "The molecular basis of canine melanoma: pathogenesis and trends in diagnosis and therapy." J Vet Intern Med **13**(3): 163-74.
- Moreno-Lopez, L. A., Esparza-Gomez, G. C., Gonzalez-Navarro, A., Cerero-Lapiedra, R., Gonzalez-Hernandez, M. J., Dominguez-Rojas, V. (2000). "Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain." Oral Oncol **36**(2): 170-4.
- Murakami, Y., Tateyama, S., Rungsipipat, A., Uchida, K., Yamaguchi, R. (2000). "Immunohistochemical analysis of cyclin A, cyclin D1 and P53 in mammary tumors, squamous cell carcinomas and basal cell tumors of dogs and cats." J Vet Med Sci **62**(7): 743-750.
- Murphy, S., Hayes, A. M., Blackwood, L., Maglennon, G., Pattinson, H., Sparkes, A. H. (2005). "Oral malignant melanoma - the effect of coarse fractionation radiotherapy alone or with adjuvant carboplatin therapy." Vet Comp Oncol **3**(4): 222-229.
- Nakaichi, M., Yunuki, T., Okuda, M., Une, S., Taura, Y. (2007). "Activity of matrix metalloproteinase-2 in canine oronasal tumors" Res Vet Sci **82**(2): 271-279.
- Northrup, N. C., Selting, K. A., Rassnick, K. M., Kristal, O., O'Brien, M. G., Dank, G., Dhaliwal, R. S., Jagannatha, S., Cornell, K. K., Gieger, T. L. (2006). "Outcomes of cats with oral tumors treated with mandibulectomy: 42 cases" J Am Anim Hosp Assoc **42**(5): 350-360.

- Oakes, M. G., Lewis, D. D., Hedlund, C.S., Hosgood, G. (1993). "Canine oral neoplasia." Comp Cont Ed Pract Vet **15**(1): 15-29.
- Ogilvie, G.K., Obradovich, J.E., Elmslie, R.E., Vail, D.M., Moore, A.S., Staw, R.C. (1995) "Tumors of the Oral Cavity." In: G.K. Ogilvie and A.S. Moore (Eds.). *Managing the Veterinary Cancer Patient*, Veterinary Learning Systems: 327-348.
- Patnaik, A.K., Ehler, W. J., MacEwen, E. G. (1984). "Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs." Vet Pathol **21**(5):469–474.
- Patnaik, A. K., Mooney, S. (1988). "Feline melanoma: a comparative study of ocular, oral, and dermal neoplasms." Vet Pathol **25**(2): 105-112.
- Peña, L. L., Nieto, A. I., Perez-Alenza, D., Cuesta, P., Castano, M. (1998). "Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables." J Vet Diagn Invest **10**(3): 237-246.
- Penwick, R.C., Nunamaker D.M. (1987). "Rostral mandibulectomy: a treatment for oral neoplasia in the dog and cat." J Am Anim Hosp Assoc **23**:19-25.
- Piffko, J., Bankfalvi, A., Ofner, D., Joos, U., Bocker, W., Schmid, K. W. (1995). "Immunohistochemical detection of p53 protein in archival tissues from squamous cell carcinomas of the oral cavity using wet autoclave antigen retrieval." J Pathol **176**(1): 69-75.
- Proulx, D.R., Ruslander, D.M., Dodge, R. K., Hauck, M. L., Williams, L. E., Horn, B., Price, G. S., Thrall, D. E. (2003). "A retrospective analysis of 140 dogs with oral melanoma treated with external beam radiation." Vet Radiol Ultrasound **44**(3):352-359.
- Queiroga F, Lopes C. (2002). "Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico." Rev Port C Vet **97**(543): 119-127.
- Ramos-Vara, J. A., Beissenherz, M. E., Miller, M. A., Johnson, G. C., Pace, L. W., Fard, A., Kottler, S. J. (2000). "Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases." Vet Pathol **37**(6): 597-608.
- Reif, J. S., Cohen D. (1971). "The environmental distribution of canine respiratory tract neoplasms." Arch Environ Health **22**(1): 136-40.
- Ruiz, F.S., Alessi , A.C., Chagas, C.A., Pinto, G.A., Vassallo, J. (2005). "Immunohistochemistry in veterinary pathology: a critical review". J Bras Patol Med Lab **41**(4): 263-270.
- Saar, L. I., R. Getty (1986). "Lymphatic system of the carnivore." In: G. R. Getty (Ed.). *Sisson and Grossman's The anatomy of the domestic animals*. WB Saunders, Philadelphia **2**: 1551-1566.
- Salisbury, S.K. (2002). "Aggressive cancer surgery and aftercare." In: W.B. Morrison (Ed.). *Cancer in dogs and cats: medical and surgical management*. Teton New Media, Jackson, Wyoming: 249-301.

- Sanchez, J., Ramirez, G. A., Buendia, A. J., Vilafranca, M., Martinez, C. M., Altimira, J., Navarro, J. A. (2007). "Immunohistochemical characterization and evaluation of prognostic factors in canine oral melanomas with osteocartilaginous differentiation." Vet Pathol **44**(5): 676-682.
- Scase, T. J., Edwards, D., Miller, J., Henley, W., Smith, K., Blunden, A., Murphy, S. (2006). "Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis." J Vet Intern Med **20**(1): 151-158.
- Schildt, E. B., Eriksson, M., Hardell, L., Magnuson, A. (1999). "Occupational exposures as risk factors for oral cancer evaluated in a Swedish case-control study." Oncol Rep **6**(2): 317-320.
- Scholzen, T., Gerdes J. (2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." J Cell Physiol **182**(3): 311-322.
- Silva, S. D., Agostini, M., Nishimoto, I. N., Coletta, R. D., Alves, F. A., Lopes, M. A., Kowalski, L. P., Graner, E. (2004). "Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study." Oral Oncol **40**(7): 688-696.
- Sittel, C., Ruiz, S., Volling, P., Kvasnicka, H. M., Jungehulsing, M., Eckel, H. E. (1999). "Prognostic Significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and P53 in cancer of the oropharynx and oral cavity." Oral Oncol **35**(6): 583-589
- Snyder, L. A., Bertone, E. R., Jakowski, R. M., Dooner, M. S., Jennings-Ritchie, J., Moore, A. S. (2004). "p53 expression and environmental tobacco smoke exposure in feline oral squamous cell carcinoma." Vet Pathol **41**(3): 209-214.
- Soergel, S., MacEwen, E. G., Vail, D. M., Potter, D. M., Sondel, P. M., Helfand, S. C. (1999). "The immunotherapeutic potential of activated canine alveolar macrophages and antitumor monoclonal antibodies in metastatic canine melanoma." J Immunother **22**(5):443-453.
- Stebbins, K. E., Morse, C. C., Goldschmidt, M. H. (1989). "Feline oral neoplasia: a ten-year survey." Vet Pathol **26**(2): 121-128.
- Straw, R. C., Powers, B. E., Klausner, J., Henderson, R. A., Morrison, W. B., McCaw, D. L., Harvey, H. J., Jacobs, R. M., Berg, R. J. (1996). "Canine mandibular osteosarcoma: 51 cases (1980-1992)". J Am Anim Hosp Assoc **32**(3): 257-262.
- Sulaimon, S. S., Kitchel B. E. (2003). "The Basic Biology of Malignant Melanoma: Molecular Mechanisms of Disease Progression and Comparative Aspects." J Vet Int Med **17**(6):760 – 772.
- Syrigos, K. N., Karachalios D., Karapanagiotou, E. M., Nutting, C. M., Manolopoulos, L., Harrington, K. J. (2009). "Head and neck cancer in the elderly: an overview on the treatment modalities". Cancer Treat Rev **35**(3): 237-245.
- Teifke, J. P., Lohr, C. V., Shirasawa, H. (1998). "Detection of canine oral papillomavirus-DNA in canine oral squamous cell carcinomas and p53 overexpressing skin papillomas of the dog using the polymerase chain reaction and non-radioactive in situ hybridization." Vet Microbiol **60**(2-4): 119-130.

- Theon, A. P., Rodriguez, C., Madewell, B. R. (1997). "Analysis of prognostic factors and patterns of failure in dogs with malignant oral tumors treated with megavoltage irradiation." J Am Vet Med Assoc **210**(6): 778-84.
- Todoroff, R.J., Brodey R.S. (1979). "Oral and pharyngeal neoplasia in the dog: a retrospective survey of 361 cases." J Am Vet Med Assoc **175**(6): 567-571.
- Vail, D. M., E. G. MacEwen (2000). "Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer." Cancer Invest **18**(8): 781-792.
- Valente, G., Orecchia, R., Gandolfo, S., Arnaudo, M., Ragona, R., Kerim, S., Palestro, G. (1994). "Can Ki-67 immunostaining predict response to radiotherapy in oral squamous cell carcinoma?" J Clin Pathol **47**(2): 109-112.
- Van Diest, P.J.V., Brugal G., Baak, J. P. (1998). "Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value." J Clin Pathol **51**(10): 716-724.
- Verstraete, F.J.M. (2005). "Mandibulectomy and maxilectomy." Vet Clin North Am Sm Anim Prat **35**(4): 1009-1039.
- Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A.J. (2000). "Surfing the p53 network." Nature **408**(6810): 307-310.
- Wallace, J., Matthiesen D. T., Patnaik, A. K. (1992). "Hemimaxillectomy for the treatment of oral tumors in 69 dogs" Vet Surg **21**(5): 337-341.
- White, R.A. (1992). "Mandibulectomy and maxilectomy in the dog: long term survival in 100 cases." Europ J Comp Anim Pract **III** (1): 53-57.
- WHO (World Health Organization), "TNM classification of tumors in domestic animals". Geneva, Switzerland, 1980:46-47.
- Withrow, S. J. and D. M. Vail (2007). "Specific malignancies in the small animal patient." In: S. J. Withrow and D. M. Vail (Eds.) *Small Animal Clinical Oncology*. Canada, Saunders Elsevier: 382-384.
- Xie, X., Angelis P., Clausen, O. P., Boysen, M. (1999). "Prognostic significance of proliferative and apoptotic markers in oral tongue squamous cell carcinomas." Oral Oncol **35**(5): 502-509.

6. Anexo

FICHA DE SEGUIMENTO

Data: ___/___/___

Dados do animal					
Nome		Espécie		Raça	Cor:
Idade		Peso		Sexo	

Dados do proprietário	
Nome	
Morada	
Localidade	Telf:

Características da neoplasia:

Localização: _____

Diagnóstico: Punção aspirativa ___ Biopsia incisional ___ Biopsia excisional ___

Diagnóstico Histológico (HE) _____

Estadiamento (TNM): T ___ N ___ M ___

Doenças concomitantes:

Doença: _____ Data do diagnóstico _____

Avaliação pré-cirúrgica:

Condição corporal: _____

Apetite normal/diminuído/aumentado

Hemograma: _____

Bioquímica sérica: _____

Procedimento cirúrgico

Data ___/___/___

Técnica utilizada _____

Avaliação de Margens _____

Linfonodos (infiltração) _____

Acompanhamento pós cirúrgico imediato

Condição do animal				
Apetite	Aumentado	Normal	Diminuído	Obs:
Urina	Normal	Anormal	Obs:	
Fezes	Normal	Anormal	Obs:	
Cicatrização 10 dias			Sim	Não
Ferida cirúrgica considerada curada			Data:	___/___/___

Acompanhamento pós cirúrgico – Mensal

Mês	Data	Recorrência		Localização (regional/á distância)
1		Sim	Não	
2		Sim	Não	
3		Sim	Não	
5		Sim	Não	
6		Sim	Não	
7		Sim	Não	
8		Sim	Não	
9		Sim	Não	
10		Sim	Não	
11		Sim	Não	
12		Sim	Não	

Seguimento após 1 ano e outros aspectos dignos de registo

Recidiva local	Data ___/___/___	Obs:
Recidiva regional	Data ___/___/___	Obs:
Outro tumor primário	Data ___/___/___	Obs:
Metastização	Sim/não	Linfonodos/pulmão/outro
Morte	Natural/eutanásia	Causa: