

Alterações hematológicas em cadelas acometidas por tumores mamários

Eduardo Garrido^{1*}, Thaís Larissa Lourenço Castanheira¹, Rosemeri de Oliveira Vasconcelos², Rosângela Zacarias Machado², Antonio Carlos Alessi²

¹Aluno do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FCAV – UNESP – Jaboticabal.

²Docente do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – UNESP – Jaboticabal.

*Autor para correspondência, E-mail: garridovet@gmail.com

RESUMO. Este trabalho teve como objetivo avaliar alterações no padrão do hemograma e dos metabólitos bioquímicos alanina aminotransferase (ALT) e creatinina no sangue de cães acometidos por carcinomas mamários simples, com e sem metástases. O estudo permite concluir que cães acometidos por carcinomas mamários simples apresentam alterações hematológicas mais discretas que as encontradas em humanos. Cães acometidos por carcinomas simples apresentam menor número de eritrócitos e maior número de neutrófilos que os cães do grupo controle. A presença de linfopenia sugere relação com a malignidade dos tumores, já que os linfócitos estão diminuídos nos tumores mais agressivos.

Palavras chaves: Oncologia veterinária; hemograma, cão

Hematological changes in dogs affected by breast tumors

ABSTRACT. This work aimed to evaluate changes in the pattern of the blood count and biochemical metabolites, alanine aminotransferase (ALT) and creatinine, in the blood of dogs affected with simple mammary carcinomas with and without metastasis. This study indicates that dogs affected with simple mammary carcinomas show haematological changes milder than those found in humans. Dogs affected with simple carcinomas have fewer red blood cells and increased number of neutrophils that dogs in the control group. The presence of lymphopenia suggests relation with the malignancy of tumors, as the lymphocytes are reduced in the more aggressive tumors.

Keys words: Veterinary oncology, complete blood count, dog

Introdução

A análise de parâmetros hematológicos e bioquímicos é amplamente utilizada na medicina veterinária para o estabelecimento do diagnóstico, prognóstico e monitoramento do tratamento (Nilsen et al., 2010; Omer, 2008; Mundim et al., 2007; Lilliehöök, 1997; Jensen, 1993). Embora estes parâmetros sejam bem estabelecidos para cães hípidos adultos, ainda não estão completamente estabelecidos para diferentes raças ou em animais com doenças específicas. Podem variar em função da idade ou tipo de enfermidade (Metzger e Rebar, 2012; Swanson et al., 2004; Vajdovich et al., 1997), raça (Nilsen et al., 2010; Mundim et al., 2007), presença de neoplasia (Watabe et al., 2011; Sottink et al., 2010) ou mesmo devido ao ciclo circadiano (Lilliehöök, 1997). Não foram encontradas diferenças relevantes nos parâmetros

hematológicos ou bioquímicos entre cães após exercícios (Rovira et al., 2007) ou entre os diferentes sexos (Omer, 2008).

Estudos recentes demonstram que parâmetros, como a contagem de leucócitos, podem ter um valor diagnóstico e prognóstico para diversos tumores malignos (Aliustaoglu et al., 2010). Por exemplo, o aumento no número de linfócitos totais está associado a um aumento no tempo de sobrevivência em humanos acometidos por neoplasias do pâncreas (Fogar et al., 2006), por outro lado, em cães acometidos por osteossarcoma apendicular, a linfopenia está associada com um maior intervalo livre da doença (Sottink et al., 2010). Já Watabe et al. (2011) demonstraram que em cães com neoplasias, todas as subpopulações de linfócitos diminuiriam notavelmente quando comparados com cães hípidos. Da mesma forma, os linfócitos

T CD8⁺ apresentaram uma significativa diminuição em cães com metástases quando comparado com cães sem metástases.

As neoplasias mamárias representam aproximadamente 50% de todas as neoplasias em cães (Kumaraguruparan et al., 2006a; Kennedy & Miller, 1993), sendo que as de caráter maligno representam cerca de 40 a 50% (Sarli et al., 2002). Segundo De Nardi et al. (2009) esse número pode chegar a 60%, com 25% dos pacientes apresentando metástases em linfonodos regionais e/ou parênquima pulmonar.

Os tumores mamários de origem epitelial são os mais comuns e sua etiologia é multifatorial (Kumaraguruparan et al., 2006b). O prognóstico das neoplasias mamárias malignas está associado ao tamanho do tumor primário, com a classificação histológica, com alta contagem de regiões organizadoras de nucléolos argirofílicas, aneuploidia do DNA e com a expressão de oncogenes (Heller et al., 2005). Da mesma forma, a invasão do estroma por células neoplásicas e a presença de êmbolos neoplásicos em vasos (Sarli et al., 2002) também são aspectos relevantes. O tipo e intensidade do infiltrado inflamatório no carcinoma tumoral também apresentam valor prognóstico (Estrela-Lima et al., 2010).

O hemograma completo é um pré-requisito para todos os pacientes de câncer antes de cirurgias, quimio ou radioterapias e pode identificar a severidade e o risco de morte em pacientes humanos (Akinbami et al., 2013). Este trabalho teve como objetivo avaliar alterações no padrão do hemograma e dos metabólitos bioquímicos alanina aminotransferase (ALT) e creatinina no sangue de cães acometidos por carcinomas mamários simples, com e sem metástases.

Material e Métodos

Grupos experimentais

Neste experimento foram utilizadas amostras de tecido mamário de 30 fêmeas caninas, sem predileção de raças ou idade, atendidas pelo Serviço de Oncologia Veterinária e pelo Serviço de Reprodução Animal do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da FCAV - UNESP, Jaboticabal, SP, colhidos entre março de 2009 e setembro de 2010.

Destes animais, 20 eram portadores de tumor mamário, com diagnóstico histopatológico de carcinoma simples, com ou sem presença de

micrometástase e 10 eram cães hígidos, sem tumores na cadeia mamária, que formaram o grupo controle. Em um primeiro momento, os animais foram distribuídos em dois grupos, o controle (GC / n=10) e o de portadores de tumor na mama (GT / n=20). Posteriormente, os animais portadores de tumor foram redistribuídos nos grupos T1 (GT1), com 10 animais portadores de carcinoma mamário, sem metástase detectada e o grupo T2 (GT2), com 10 animais portadores de carcinoma mamário, com presença de macro ou micrometástase detectada.

Colheita e processamento das amostras

Histopatologia

Os fragmentos de tumor mamário dos animais dos grupos GT foram colhidos por meio de biopsia excisional, após mastectomia. Logo após os fragmentos foram imersos em solução de formol a 10%, tamponado com fosfatos (pH 7,4) por até 48 horas. Posteriormente, as amostras foram processadas rotineiramente no Departamento de Patologia Veterinária (FCAV – UNESP, Jaboticabal) até a inclusão em parafina. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina para análise em microscopia de luz (microscópio Nikon Eclipse E200). A classificação histológica dos tumores foi feita segundo Cassali et al. (2011).

Colheita de sangue

A colheita de sangue foi realizada antes da ressecção tumoral. Foram colhidos, de cada animal, 4mL de sangue, por venopunção da jugular, acondicionados em tubos contendo o anticoagulante Ácido Etilenodiaminotetracético dissódico (Na₂ EDTA) para a realização do hemograma e dos exames bioquímicos (ALT e creatinina).

Hemograma, ALT e creatinina

Os exames hematológicos foram realizados no laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” (FCAV – UNESP, Jaboticabal, SP). O hemograma foi realizado pelo analisador hematológico Micros ABX 60 (Horiba), avaliando os seguintes parâmetros número de hemácias (HE), hematócrito (HT), hemoglobina (HB), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), plaquetas, leucócitos, basófilos,

eosinófilos, neutrófilos bastonetes, neutrófilo segmentados (NEU), linfócitos (LINF) e monócitos. Para as análises bioquímicas foi utilizado o analisador bioquímico Labquest (Bio Plus) e kits para ALT (108-4/30) e creatinina (35) da Labtest.

Análise estatística

Para a análise estatística, confrontaram-se os parâmetros do hemograma, ALT e creatinina. As comparações das médias entre os grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA de um só fator) e teste de Student Neumans Kell com nível de significância de 5%. Para as provas de normalidade e homocedasticidade foram realizados os testes de Cramer von Mises e Brown-Forsyth, respectivamente. Quando as pressuposições da análise de variância não foram satisfeitas, os dados sofreram transformações de acordo com o proposto por Bartlett (1947). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SAS 9.1 (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA).

Resultados

A idade média dos cães do grupo GT foi de $8,63 \pm 2,61$ anos, com idade mínima de quatro anos e máxima de 14,9 anos. A distribuição, por idade, encontra-se na figura 1. Os grupos GC e GT apresentaram as médias dos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos dentro da faixa de valores de normalidade estabelecida e utilizada pelo laboratório de Patologia Clínica Veterinária. Porém os animais do Grupo GT apresentaram médias significativamente menores que o GC para o número de hemácias ($P < 0,0081$), hematócrito ($p < 0,0359$) e número de linfócitos ($P < 0,0120$) e, média significativamente maior para neutrófilos segmentados ($P < 0,0446$). O número de linfócitos em animais apresentando metástases (GT2) diferiu significativamente apenas entre o GC ($P < 0,0324$). Os cães com carcinomas não metastáticos (GT1) não apresentaram diferença significativa com GC e GT2. As médias e erro padrão das análises e valores de referência encontram-se na tabela 1. Não houve diferenças para os parâmetros bioquímicos ALT e creatinina entre os grupos.

Discussão

Os resultados deste ensaio mostram que a média da idade dos animais acometidos por algum tipo de neoplasia mamária, assim como a sua maior incidência ocorrendo entre os 7 e 10

anos e estão de acordo com De Nardi et al. (2009). Para Sorenmo et al. (2011), o perfil de cadelas acometidas por tumores mamários é formado por cadelas mais velhas, independentemente de raça e não castradas ou castradas tardiamente. Os tumores mamários são infreqüentes em cadelas com menos de cinco anos, salvo se apresentarem histórico de tratamento com hormônios, como a progesterona (Schneider, 1970; Taylor, 1976).

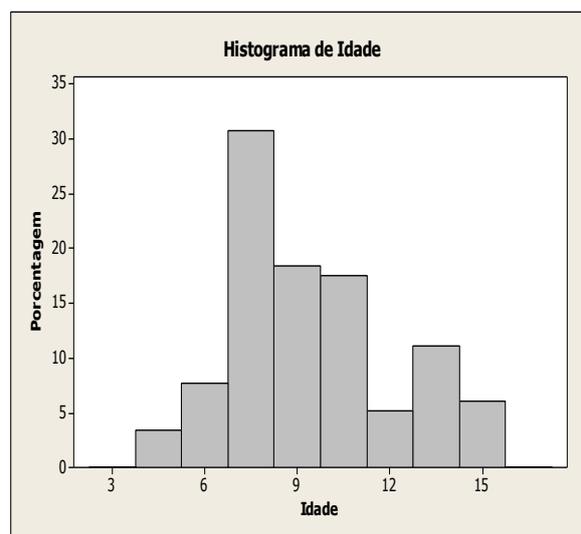


Figura 1. Histograma da porcentagem de cães portadores de tumor mamário, independente do tipo histológico, segundo a idade. As barras representam um limite de classe de 1,5 anos.

Em estudo realizado por Akinbami et al. (2013), pacientes humanos acometidos por câncer de mama, apresentam contagem de células sanguíneas bastante disformes em relação ao grupo controle. O mesmo não ocorreu em cães, onde as alterações foram mais sutis. Neste estudo não houve alterações além do intervalo de referência, embora haja diferenças significativas, em alguns parâmetros, entre os grupos controle e acometidos por neoplasia. Isso sugere que a determinação de intervalos de referências mais estreitos, de acordo com a doença, possa ter um maior valor prognóstico, mas para isso são necessários mais trabalhos, com maior número de amostras.

Neste trabalho verificou-se uma menor quantidade de eritrócitos nas amostras de cães acometidos por carcinomas mamários em relação aos controles, dados que corroboram com os de Estrela-Lima et al. (2012). Segundo Schwartz (2007) a diminuição no número de hemácias nos cães acometidos por tumores possui várias etiologias possíveis, entre as quais, uma menor responsividade à hipóxia, diminuindo o efeito da

eritropoietina, a diminuição da eritropoiese pela infiltração tumoral na medula óssea, hemorragias, hemólise autoimune, mielossupressão, desordens endócrinas e inflamações. Por outro lado, Miller et al. (1990) mostraram que a anemia no câncer é semelhante as anemias decorrentes da doença renal crônica e sugerem que alterações na

produção da eritropoietina sejam um fator contribuinte para a anemia do paciente oncológico. Não foi possível afirmar que há diminuição na produção ou responsividade à eritropoietina pelos cães acometidos por carcinomas mamários, mas esta é uma possibilidade a ser futuramente estudada.

Tabela 1. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de animais hígidos, portadores de carcinoma mamários simples, com ou sem metástases.

Parâmetro	GC	GT	GT1	GT2	Valores de referência
Eritrócitos*	7,75±0,21A	6,76±0,22B	6,88±0,30B	6,65±0,32B	5,5-8,5
Hemoglobina	16,61±0,65	15,36±0,51	16,13±0,79	14,60±0,58	12-18
Hematócrito	53,94±1,95	46,24±2,26	46,69±4,13	45,79±2,09	37-55
VCM	69,60±1,37	68,33±2,40	67,66±4,80	69,00±1,08	60-77
HCM	21,40±0,38	22,76±0,33	23,45±0,41	22,07±0,44	19-23
CHCM	31,62±0,58	35,24±2,76	38,09±5,51	32,39±0,26	31-34
Plaquetas	272,30±26,55	311,14±28,81	327,68±44,82	294,60±37,87	180-400
Leucócitos	9,03±0,55	10,09±0,79	8,41±0,77	11,77±1,17	6-18
Basófilos	0	0,20±0,15	0	0,40±0,30	0-1
Eosinófilos	3,00±1,04	3,95±0,94	3,7±1,12	4,20±1,58	2-10
Bastonetes	2,80±0,51	2,15±0,49	1,80±0,36	2,50±0,93	0-3
Segmentados*	70,50±1,78B	75,15±1,29A	76,20±1,80A	74,10±1,87A	60-77
Linfócitos*	21,70±2,47A	13,90±0,85B	14,70±1,07 AB	13,10±1,34B	13-30
Monócitos	2,20±0,39	3,60±0,48	3,60±0,43	3,60±0,90	3-10
Creatinina	0,78±0,11	0,88±0,06	0,88±0,11	0,87±0,08	0,5-1,5
ALT	79,35±15,88	62,16±5,60	68,35±9,66	55,98±5,51	10-88

* Identifica parâmetros que apresentaram diferença significativa no teste de Student Newman Kells, com nível de significância de 5%. Valores de (média±erro padrão). Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa entre os grupos. GC: grupo controle, formado por cães hígidos. GT: grupo tumor, formado por cães acometidos por carcinoma mamário simples. GT1 e GT2: grupos formados pelo desmembramento do GT, separando animais sem metástases (GT1) e cães com metástases (GT2). Valores de referência segundo o laboratório de Patologia Clínica Veterinária "Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto" do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel", da FCAV – UNESP, Jaboticabal, SP.

No leucograma encontramos maior número de neutrófilos segmentados em cães do grupo GT. Em estudo realizado por Estrela-Lima et al. (2012), a leucocitose neutrofílica, acompanhada de níveis normais de células mononucleares, foi considerado o mais importante achado hematológico em cães acometidos por carcinomas mamários. Em nossos dados não houve evidência de que a neutrofilia tenha relação com a agressividade do tumor, uma vez que não houve diferença estatística entre os animais com e sem metástase. No trabalho de Estrela-Lima et al. (2012) também não houve diferença entre carcinomas em tumores misto e carcinomas simples. Entretanto, em trabalho de Fridlender et al. (2009), foram identificados dois

subtipos de neutrófilos, N1 com ação antitumoral e N2 com ação pró tumoral, em diferentes neoplasias. O não conhecimento da subpopulação presente em nosso estudo impossibilita determinar o papel representado pela neutrofilia no prognóstico de neoplasias.

No presente estudo não houve diferenças significativas entre o número de basófilos ou monócitos entre os grupos GC e o GT, porém houve diferença no número de linfócitos.

Os linfócitos apresentaram número significativamente menor nos animais acometidos por carcinomas mamários, sobretudo naqueles apresentando metástases. Para Bone e Lauder (1974) vários fatores colaboram para a redução

do número de linfócitos em pacientes de câncer, seja pela diminuição da produção, seja pela destruição e utilização dos linfócitos. Estrela-Lima et al. (2010) encontraram, em análise dos linfócitos infiltrados no tumor, por citometria de fluxo, diferença significativa entre tumores metastáticos e não metastáticos de carcinomas mamários em tumor misto. O número de linfócitos T foi significativamente maior nos cães sem metástases, enquanto nos cães com metástases, houve maior número de linfócitos B. Isso sugere que os tumores mais agressivos apresentam uma depleção no número de células T, o que vai de encontro aos nossos dados. Isso pode ser decorrente da ação das células T regulatórias, que possuem ação inibitória sobre os linfócitos T (Rissetto et al., 2010). No câncer há evidência de que as Tregs podem ser induzidas pelo tumor e suprimir a resposta do sistema imune aos antígenos tumorais (Standish et al., 2008). Nos tumores mamários o número de Tregs, tanto circulantes, quanto infiltradas, está aumentado (Ménétrier-Caux et al., 2009). Reome et al. (2004) demonstraram que os linfócitos B parecem exercer mínimos efeitos durante a progressão tumoral dos carcinomas mamários, enquanto a presença dos linfócitos T, durante todo o desenvolvimento tumoral, é marcante.

Conesa et al. (2012) sugerem que a contagem de linfócitos no sangue periférico de pacientes humanos acometidos por carcinoma mamário tem valor prognóstico para a recorrência do tumor, sendo pior em pacientes com linfopenia, seja basal ou induzida pela quimioterapia. O mesmo parece ocorrer em cães, onde uma menor contagem de linfócitos coincide com a maior agressividade da neoplasia.

Conclusão

O estudo permite concluir que cães acometidos por carcinomas mamários apresentam uma idade mais avançada, com maior incidência em torno dos 8,5 anos. As alterações hematológicas em cães aparentam ser mais discretas que as encontradas em humanos. Cães acometidos por carcinomas simples apresentam menor número de eritrócitos e maior número de neutrófilos que os cães do grupo controle, porém não foi possível relacionar estes achados com o prognóstico dos tumores simples mamários. A linfopenia apresenta relação com a malignidade em carcinomas mamários caninos, já que os linfócitos estão diminuídos nos tumores mais agressivos. Novos trabalhos visando adequar os

valores de referência do hemograma podem aprimorar a uso desta ferramenta no diagnóstico e na determinação de um prognóstico mais incisivo para o carcinoma mamário e outras doenças.

Agradecimentos

Agradeço à FAPESP pela bolsa de mestrado e auxílio financeiro (Proc. Fapesp 2008/07087-6 e 2009/10341-4). Artigo referente à dissertação de mestrado do primeiro autor.

Referências Bibliográficas

- Akinbami, A., Popoola, A., Adediran, A., Dosunmu, A., Oshinaike, O., Adebola, P. & Ajibola, S. 2013. Full blood count pattern of pre-chemotherapy breast cancer patients in Lagos, Nigeria. *Caspian Journal Internal Medicine*, 1, 574-79.
- Aliustaoglu, M., Bilici, A., Ustaalioglu, B.B.O., Konia, V., Gucun, M., Seker, M., Gumus, M. 2010. The effect of peripheral blood values on prognosis of patients with locally advanced gastric cancer before treatment. *Medical Oncology*, 27, 1060-1065.
- Bartlett, M.S. 1947. The Use of *Transformations*. *Biometrics*, 1, 39-52.
- Bone, G. & Lauder, I. 1974. Cellular immunity, peripheral blood lymphocyte count and pathological staging of tumours in the gastrointestinal tract. *British Journal of Cancer*, 30, 215-221.
- Cassali, G.D., Lavallo, G.E., De Nardi, A.B. 2011. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 4, 153-80.
- Conesa, M.A.V., Garcia-Martinez, E., Billalabeitia, E.G., Benito, A.C., Garcia, T.G., Garcia, V.V. & De La Penã, F.A. 2012. Predictive value of peripheral blood lymphocyte count in breast cancer patients treated with primary chemotherapy. *The Breast*, 21, 468-74.
- De Nardi, A.B., Rodaski, S., Rocha, N.S. & Fernandes, S. C. 2009. Neoplasias Mamárias. In: Daleck, C. R., De Nardi, R. B. & Rodaski, S. Oncologia em cães e gatos. Ed. Roca, São Paulo. 1ª ed. p. 372-83.
- Estrela-Lima, A., Araújo, M.S.S., Costa-Neto, J. M., Teixeira-Carvalho, A., Borrouin-Melo, S.M., Cardoso, S.V., Martins-Filho, O.A.,

- Serakides, R. & Cassali, G.D. 2010. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic and survival rates. *BMC Cancer*, 10, 256.
- Estrela-Lima, A., Araújo, M.S.S., Costa-Neto, J.M., Ribeiro, L.G.R., Damasceno, K.A., D'assis, M.J.M.H., Martins-Filho, O.A., Teixeira-Carvalho, A., Serakides & R. Cassali, G.D. 2012. Understanding the immunological heterogeneity of canine mammary carcinomas to provide immunophenotypic features of circulating leukocytes as clinically relevant prognostic biomarkers. *Breast Cancer Research Treatment*, 131, 751-63.
- Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S. & Albelda, S.M. 2009. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- β : "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*, 16, 186-194.
- Fogar, P., Sperti, C., Basso, D., Sanzari, M.C., Greco, E., Davoli, C., Navaglia, F., Zambon, C.F., Pasquali, C., Venza, E., Pedrazzoli, S. & Plebani, M. 2006. Decreased total lymphocyte counts in pancreatic cancer: an index of adverse outcome. *Pancreas*, 32, 22-28.
- Heller, D.A., Clifford, C.A., Goldschmidt, M.H., Holt, D.E., Shofer, F.S., Smith, A. & Sorenmo, K.U. 2005. Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. *Veterinary Pathology*, 42, 776-80.
- Jensen, A.L. 1993. Critical differences of clinical chemical parameters in blood from dogs. *Research in Veterinary Science*, 54, 10-14.
- Kennedy, P.C. & Miller, R.B. 1993. The Female Genital system, In: Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C. & Palmer, N. *Pathology of Domestic Animals*. 4th ed., cap.4, 349-469
- Kumaraguruparan, R., Karunagaran, R., Balachandran, C., Murali Manoar, B. & Nagini, S. 2006a. Of humans and canines: A comparative evaluation of Heat shock and apoptosis-associated proteins in mammary tumors. *Clinica Chimica Acta*, 365, 168-76.
- Kumaraguruparan, R., Subapriya, R., Balachandran, C., Murali Manoar, B., Thangadurai, A. & Nagini, S. 2006b. Xenobiotic-metabolizing enzymes in canine mammary tumours. *The Veterinary Journal*, 172, 364-68.
- Lilliehöök, I. 1997. Diurnal variation of canine blood leukocyte counts. *Veterinary Clinical Pathology*, 26, 113-117.
- Ménétrier-Caux, C; Gobert, M & Caux, C. 2009. Differences in tumor regulatory T-cell localization and activation status impact patient outcome. *American Association for Cancer Research*, 69, 7895-8.
- Metzger, F.L. & Rebar, A.H. 2012. Clinical Pathology interpretation in geriatric veterinary patients. *Veterinary Clinics of Small Animal*, 42, 615-29.
- Miller, C.B., Jones, R.J., Pintadosi, S., Abeloff, M.D. & Spivak, J.R. 1990. Decreased erythropoietin response in patients with the anemia of cancer. *The New England Journal of Medicine*, 24, 1689-92.
- Mundim, A. V., Coelho, A. O., Hortêncio, S. M., Guimarães, E. C. & Espindola, F. S. 2007. Influence of age and sex on the serum biochemical profile of Doberman dogs in the growth phase. *Comparative Clinical Pathology*, 16, 41-6.
- Nilsen, L., Kjelgaard-Hansen, M., Jensen, A.L. & Kristensen, A.T. 2010. Breed-specific variation of hematologic and biochemical analyses in healthy adult Bernese Mountain dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, 39, 20-28.
- Omer, S.A. 2009. Normal values of some serochemical parameters in male and female german shepherd dogs in Sudan. *Assiut Veterinary Medicine Journal*, 120, 110-15.
- Reome, J.B., Hyland, J.C., Dutton, R.W. & Dobrzanski, M.J. 2004. Type 1 and type 2 tumor infiltrating effector cell subpopulations in progressive breast cancer. *Clinical Immunology*, 111, 69-81.
- Riseto, K.C., Rindt, H., Selting, K.A., Villamil J.A., Henry C.J. & Reiner C.R. 2010. Cloning and expression of canine CD25 for validation of an anti-human CD25 antibody to compare T regulatory lymphocytes in healthy dogs and dogs with osteosarcoma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 135, 137-145.

- Rovira, S., Muñoz, A. & Benito, M. 2007. Hematologic and biochemical changes during canine agility competitions. *Veterinary Clinical Pathology*, 1, 30-35.
- Sarli, G., Preziosi, R., Benazzi, C., Castellani, G. & Marcato, P.S. 2002. Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumours. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14, 25-34.
- Schneider, R. 1970. Comparison of age, sex and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer*, 26, 419-426.
- Schwartz, R.N. 2007. Anemia in patients with cancer: Incidence, causes, impact, management, and use of treatment guidelines and protocols. *American Journal of Health-System Pharmacists*, 64, 5-13.
- Swanson, K.S., Kuzmuk, K.N., Schook, L.B. & Fahey-Jr, G.C. 2004. Diet affects nutrient digestibility, hematology, and serum chemistry of senior and weanling dogs. *Journal of Animal Science*, 82, 1713-1724.
- Sorenmo, K.U., Rasotto, R., Zappulli, V. & Goldschmidt, M.H. 2011. Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. *Veterinary Pathology*, 48, 85-97.
- Sottnik, J.L., Rao, S., Lafferty, M.H., Thamm, D.H., Morley, P.S., Withrow, S.J. & Dow, S.W. 2010. Association of blood monocyte and lymphocyte count and disease-free interval in dogs with osteosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24, 1439-44.
- Taylor, G. N., Shabestari, L., Williams, J., Mays, C. W., Angus, W. & Mcfarland, S. 1976. Mammary neoplasia in a closed Beagle colony. *Cancer Research*, 36, 2740-2743.
- Vajdovich, P., Gaál, T., Szilágyi, A. & Harnos, A. 1997. Changes in some red blood cell and clinical laboratory parameters in young and old Beagle dogs. *Veterinary Research Communications*, 21, 463-70.
- Watabe, A., Fukumoto, S., Komatsu, T., Endo, Y. & Kadosawa, T. 2011. Alterations of lymphocyte subpopulations in healthy dogs with aging and in dogs with cancer. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 142, 189-200.

Recebido em Julho 25, 2014

Aceito em Setembro 23, 2014

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