

UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**VALOR CLÍNICO DO ANTÍGENO CARCINOEMBRIÓNÁRIO (CEA) EM
CÃES COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS E DOENÇAS NÃO
NEOPLÁSICAS**

LEONARDO WILLIAM AMITE ALABRÍN

VILA VELHA-ES
JULHO / 2022

UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**VALOR CLÍNICO DO ANTÍGENO CARCINOEMBRIÓNARIO (CEA) EM
CÃES COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS E DOENÇAS NÃO
NEOPLÁSICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

LEONARDO WILLIAM AMITE ALABRÍN

VILA VELHA-ES
JULHO / 2022

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

A317v Alabrín, Leonardo William Amite.
Valor clínico do antígeno carcinoembrionário (CEA) em cães com neoplasias mamárias e doenças não neoplásicas / Leonardo William Amite Alabrín. – 2022.

37 f. : il.

Orientador: Igor Luiz Salardani Senhorello.
Dissertação (mestrado em Ciência Animal) - Universidade Vila Velha, 2022.
Inclui bibliografias.

1. Medicina veterinária. 2. Tumores. 3. Mamas - Câncer
I. Senhorello, Igor Luiz Salardani. II. Universidade Vila Velha.
III. Título.

CDD 636.89

LEONARDO WILLIAM AMITE ALABRÍN

**VALOR CLÍNICO DO ANTÍGENO CARCINOEMBRIONÁRIO
(CEA) EM CÃES COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS E DOENÇAS
NÃO NEOPLÁSICAS.**

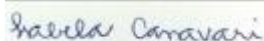
Dissertação apresentada a
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ciência Animal, para a
obtenção grau de Mestre (a) em
Ciência Animal.

Aprovada em 27 de julho de 2022,

Banca Examinadora:



Letícia Abrahão Anai (ALLIANCECARE)



Isabela Cristina Canavari (FCAV-UNESP Jaboticabal)



Igor Luiz Salardani Senhorello

Orientador

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me sustentado em todo o tempo, colocando pessoas especiais na minha vida, por sua misericórdia e graça, por ter enviado o seu único filho Jesus, pois sem Ele e o seu sacrifício, não teria chegado até aqui.

À minha esposa Amanda que sempre me apoiou e me deu todo o suporte para que conseguisse concluir essa fase, por toda a paciência, companheirismo, carinho e amor além do que eu imaginava para mim, e por ter me dado filhos lindos e especiais durante essa etapa, Israel e Ester, vocês são a minha inspiração e motivação ao me levantar todos os dias!

Aos meus pais, Alejandro e Eliane, que sempre se dedicaram para que eu concluísse todos os meus projetos e estão comigo desde o início, nunca mediram esforços pela minha educação e que principalmente, acreditaram em mim! Amo vocês! E aos meus irmãos Alejandro, Bruno e Caroline por estarem sempre torcendo por mim. Vocês são o meu orgulho e meus maiores exemplos!

Ao meu excelentíssimo orientador Prof. Dr. Igor Luiz Salardani Senhorello, que abraçou a minha ida ao mestrado e me auxiliou e ajudou de todas as maneiras possíveis nesta caminhada, sendo mais do que um orientador, mas sim um grande amigo e é um exemplo de profissional para mim.

Aos colegas do Hospital Veterinário da UVV, que sempre desejaram e torceram para o sucesso da minha vida profissional e acadêmica.

À toda equipe do Hospital Veterinário VetSaúde pelo auxílio e sempre me dando suporte nos momentos em que tive que me ausentar.

À toda equipe da Seres Vitória, em especial às colegas Paula, Alanna, Letícia, Lorena e Perla por toda a torcida, ajuda e paciência nas coletas.

À Universidade Vila Velha que abriu as portas para o meu ingresso na pós-graduação.

A toda a equipe do Laboratório de Patologia do Hospital Veterinário da UVV pela imensa disponibilidade em ajudar a coletar as amostras e os dados necessários para a realização do presente estudo.

Às alunas Lara, Gabriela e Ana Carolina pelo empenho em coletar as amostras, organizar os exames e sempre serem solícitas quando necessário, serão grandes profissionais futuramente!

Ao VetPat Laboratório e Laboratório CIAPAV pela disponibilização dos kits e processamento das amostras.

Aos cães que participaram desta pesquisa, pois sem eles nenhuma dessas páginas estaria completa.

SUMÁRIO

RSUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
1. Introdução	8
2. Revisão de literatura	10
2.1 Antígeno Carcinoembrionário (CEA)	10
2.2 Neoplasia mamária	14
2.3 Gastroenterites.....	15
2.4 Hemoparasitose	17
2.5 Parvovirose	13
3. Material e Métodos.....	19
3.1 Comitê de Ética.....	19
3.2 Amostragem do material	19
3.3 Marcador sorológico.....	21
3.4 Análise estatística	21
4. Resultados	23
5. Discussão.....	27
6. Conclusão	32
Referência Bibliográficas.....	33

RESUMO

ALABRÍN, Leonardo William Amite, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, julho de 2022. **Valor clínico do antígeno carcinoembrionário (CEA) em cães com neoplasias mamárias e doenças não neoplásicas.** Orientador: Igor Luiz Salardani Senhorello.

O antígeno carcinoembrionário (CEA) é uma glicoproteína produzida por células normais da mucosa gastrointestinal, e tem sido usado como um biomarcador tumoral em humanos. Na medicina veterinária, pacientes caninos com neoplasias mamárias apresentam níveis elevados de CEA. No entanto, sabe-se que o CEA pode aumentar em outras condições patológicas. Este estudo teve como objetivo avaliar o comportamento e compreender o valor clínico do CEA em patologias neoplásicas e não neoplásicas em cães. Para tanto foram utilizados soros sanguíneos de 118 cães, sendo 100 fêmeas e 18 machos, divididos em sete grupos experimentais; controle (G1), neoplasia mamária (G2), parvovirose (G3), erliquiose (G4), gastroenterites (G5), doenças causadoras de gastroenterites (G6) e doenças não neoplásicas (G7). O CEA foi dosado utilizando um *Kit* ELISA humano e os resultados foram avaliados e associados às dosagens do marcador, comparando os grupos experimentais. As análises estatísticas utilizadas foram os testes Tukey, a curva ROC e a correlação de Pearson com nível de significância de 5%. Os resultados mostraram que os níveis médios do CEA foram diferentes entre os grupos G1 e G2 ($P < 0,0001$), G1 e G6 ($P = 0,0278$), G1 e G7 ($P = 0,0335$), G2 e G7 ($P = 0,0314$), com valores aumentados em carcinomas mamários e doenças não neoplásicas. Maiores sensibilidades e especificidades foram observadas no grupo G2 em relação aos demais grupos. Entretanto, houve diminuição importante de especificidade quando doenças não neoplásicas foram comparadas com carcinomas mamários. Não houveram correlações importantes com valores hematológicos e bioquímicos. Os resultados evidenciaram que o CEA apresentou bom valor prognóstico para animais com carcinomas mamários e o mesmo não foi observado para doenças não neoplásicas. Contudo, doenças não neoplásicas podem afetar drasticamente a especificidade do CEA e com isso, estudos futuros avaliando outras doenças e um maior número de animais serão necessários para um melhor entendimento e aplicação clínica desse marcador na rotina da medicina veterinária.

Palavras-chave: tumor de mama, erliquiose, parvovirose, CEA, biomarcador

ABSTRACT

ALABRÍN, Leonardo William Amite, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, July, 2022. **Clinical value of carcinoembryonic antigen (CEA) in dogs with mammary neoplasms and non-neoplastic diseases.** Advisor: Igor Luiz Salardani Senhorello.

Carcinoembryonic antigen (CEA) is a glycoprotein produced by normal cells of the gastrointestinal mucosa, and has been used as a tumor biomarker in humans. In veterinary medicine, canine patients with mammary neoplasms have high levels of CEA. However, it is known that CEA can increase in other pathological conditions. This study aimed to evaluate the behavior and understand the clinical value of CEA in neoplastic and non-neoplastic pathologies in dogs. Blood sera from 118 dogs were used, 100 females and 18 males, divided into seven experimental groups; control (G1), breast cancer (G2), parvovirus (G3), ehrlichiosis (G4), gastroenteritis (G5), all diseases causing gastroenteritis (G6) and non-neoplastic diseases (G7). CEA was measured using a human ELISA Kit and the results were evaluated and associated with the marker dosages, comparing between the experimental groups. The statistical analyzes used were Tukey's tests, the ROC curve and Pearson's correlation with a significance level of 5%. The results showed that the mean CEA levels were different between groups G1 and G2 ($P < 0.0001$), G1 and G6 ($P = 0.0278$), G1 and G7 ($P = 0.0335$), G2 and G7 ($P = 0.0314$), with increased values in breast carcinomas and non-neoplastic diseases. Higher sensitivities and specificities were observed in the G2 group in relation to the other groups. However, there was a significant decrease in specificity when non-neoplastic diseases were compared with breast carcinomas. There were no important correlations with hematological and biochemical values. The results showed that CEA presented good diagnostic value for animals with mammary carcinomas and the same was not observed for non-neoplastic diseases. However, non-neoplastic diseases can drastically affect the specificity of CEA and, therefore, future studies evaluating other diseases and a greater number of animals will be necessary for a better understanding and clinical application of this marker in routine veterinary medicine.

Keywords: breast neoplasm, ehrlichiosis, parvovirus, CEA, biomarker

1. Introdução

Em humanos, o uso de marcadores sorológicos foi introduzido a fim de auxiliar o acompanhamento de pacientes desde o diagnóstico até o término do tratamento, sendo útil na detecção precoce de recidivas de neoplasias, acompanhamento do tratamento de doenças inflamatórias e estabelecimento do prognóstico dos pacientes (LEOWEINSTEIN *et al.*, 1973; HARRIS *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2014; HALL *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2020).

A busca por iniciativas e métodos que auxiliem no diagnóstico, monitoramento e que estabeleçam o prognóstico dos pacientes na medicina veterinária é constante. Os fatores prognósticos podem ser estabelecidos pela característica clínica, patológica, biológica ou um conjunto destas. Estes fatores permitem a previsão da evolução clínica e sobrevida de pacientes (CALVANTTI e CASSALI, 2006; CHEN *et al.*, 2020).

Estudos dos fatores prognósticos, assim como, de métodos de diagnóstico e monitoramento são de extrema importância, pois por meio deles é possível selecionar pacientes para tratamentos específicos e individualizados, com intensidade e eficácia adequadas, fornecendo suporte para prever o comportamento e a evolução clínica da doença (ABREU e KOIFMAM, 2002; MARINHO *et al.*, 2008).

O antígeno carcinoembrionário (CEA) é um dos marcadores sorológicos mais utilizados na medicina humana. É uma glicoproteína que está envolvida em processos inflamatórios e neoplásicos (EGAWA *et al.*, 1996; KELLEHER *et al.*, 2019) produzido principalmente pela mucosa gastrointestinal, em condições fisiológicas (BEAUCHEMIN, 2011).

Em humanos a produção em excesso dessas glicoproteínas ocorrem nos casos de carcinomas do cólon e também é expresso em outros tumores malignos e benignos no epitélio da mucosa normal (EGAWA *et al.*, 1996), devido a isso, o seu uso clínico mais comum é a monitoração e utilização como marcador tumoral de vários órgãos, principalmente de colo retal e tumores de mama na medicina humana (HALL *et al.*, 2019).

Ainda em humanos os níveis do CEA também podem aumentar em pacientes com doenças hepáticas, pancreáticas e doenças gastrointestinais, frequentemente associadas à inflamação (LOEWENST *et al.*, 1978), não sendo especificamente elevados apenas em condições neoplásicas (PEÑA *et al.*, 2021).

Na medicina veterinária alguns estudos mostraram que o CEA pode ser detectado em cadelas saudáveis e está aumentado naquelas que apresentam neoplasia mamária (SENHORELLO *et al.* 2019; FAN *et al.*, 2021). Além disso, pode ser detectado no soro das pacientes por teste ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) e no tecido mamário por *Western Blot* e PCR (*Polymerase Chain Reaction*), tanto com anticorpos caninos como com anticorpos humanos (CAMPOS *et al.*, 2012; SENHORELLO *et al.*, 2019; FAN *et al.*, 2021; JAIN *et al.*, 2021).

Objetivou-se com esse estudo avaliar os níveis séricos de CEA em cães saudáveis, com neoplasias mamárias, parvovirose, gastroenterites de origem desconhecida e erliquiose. Além da comparação das médias, almejou-se avaliar o valor diagnóstico do CEA em todas as doenças, o impacto do valor diagnóstico quando comparada doenças não neoplásicas e neoplásicas e a correlação dos valores de CEA com variáveis hematológicas e bioquímicas em cães com doenças não neoplásicas. Espera-se com esse estudo encontrar aumento nos valores de CEA tanto em doenças neoplásicas quanto não neoplásicas em cães, assim como, observado em humanos. Caso isso seja verdade, doenças não neoplásicas podem interferir no valor diagnóstico do CEA em cães com neoplasia mamária.

2. Revisão de literatura

2.1 Antígeno Carcinoembrionário CEA

O antígeno carcinoembrionário (CEA) é um membro da família das glicoproteínas, com peso molecular variando de 70 a 200 kD, que são fortemente ligadas à membrana plasmática das células, onde estão envolvidas em uma série de processos, incluindo adesão celular, proliferação, diferenciação e supressão tumoral de origem celular (EGAWA *et al.*, 1996 e KELLEHER *et al.*, 2019) sendo produzido principalmente pela mucosa gastrointestinal, em condições fisiológicas (BEAUCHEMIN, 2011).

O CEA foi descrito pela primeira vez por Gold e Freedman (1965), evidenciando a presença desse antígeno em neoplasias intestinais. É considerada uma glicoproteína produzida pela mucosa gastrointestinal, localizada nas membranas das células epiteliais em pequenas quantidades (KASZAK *et al.*, 2018). No estudo de Loewenst *et al.* (1978), foi demonstrado o aumento dos níveis séricos do CEA em neoplasias do trato gastrointestinal, como estômago e pâncreas. Ademais, os níveis em neoplasias intestinais são mais elevados em comparação com outras neoplasias (DENK *et al.*, 1972).

Outro estudo como o de Lo Gerfo *et al.* (1971) observou que os níveis de CEA estavam elevados nos casos de doença intestinal inflamatória idiopática, entretanto, seu papel na fisiopatogênese nessas enfermidades é pouco conhecido. Contudo, sabe-se que o CEA está altamente presente no trato gastrointestinal, principalmente quando associados a processos inflamatórios (KELLERHER *et al.*, 2019) e também em certas condições pulmonares (YAMAGUCHI, 2012). Ainda em humanos, os níveis do CEA podem estar aumentados também em pacientes com doenças hepáticas e pancreáticas frequentemente associados à inflamação (LOEWENSt *et al.*, 1978), não sendo considerado especificamente elevados apenas em condições neoplásicas (PEÑA *et al.*, 2021).

Desde a descoberta do CEA há cerca de 50 anos (TCHOUPA *et al.*, 2014), cuja a função fisiológica ainda é desconhecida, sabe-se que pode estar relacionada a mecanismos de reconhecimento de células de adesão (KASZAK *et al.*, 2018;

PEÑA *et al.*, 2021), conhecidas como moléculas de adesão celular relacionadas ao CEA (CEACAM), um subgrupo da família do CEA. Estes subgrupos são utilizados por patógenos, como as bactérias, servindo como receptores para adesão em células epiteliais, podendo induzir reposta celulares, incluindo a ativação de quinases e estimulação de proteínas G, induzindo novas expressões gênicas, demonstrando que os patógenos bacterianos utilizam a capacidade de sinalização destes receptores para colonizar a superfície da mucosa, tornando os CEACAMs como um potencial biomarcador clínico (TCHOUPA *et al.*, 2014).

Em humanos, o CEA, inicialmente foi descrita em pacientes com metástases de carcinoma colorretal e atualmente é o marcador tumoral mais utilizada na prática clínica (KASZAK *et al.*, 2018). É mensurado usando vários métodos imunológicos, como métodos radioimunológicos (RIA) ou luminescência eletroquímica imunoensaio (ECL) em amostras de soro (KASZAK *et al.*, 2018).

Recentemente, um estudo avaliou os níveis séricos de CEA em 70.993 pacientes humanos com 49 doenças neoplásicas e não neoplásicas. Como resultado, o estudo demonstrou que o CEA estava aumentado em 42 dessas doenças avaliadas em relação aos pacientes saudáveis. Dentre as doenças com maiores níveis de CEA encontram-se: fibrose pulmonar, câncer de pâncreas, uremia, doença pulmonar obstrutiva crônica, câncer de cólon, doença de Alzheimer, câncer de reto e câncer de pulmão (HAO *et al.*, 2019).

Sabe-se que em humanos o CEA não está relacionado apenas as doenças neoplásicas, mas também as doenças inflamatórias como gonorreia e doenças pulmonares crônicas (ISLAM *et al.*, 2018; HAO *et al.*, 2019). Um estudo avaliou o valor prognóstico do CEA em pacientes com COVID-19 e os autores observaram que os níveis de CEA estão significativamente aumentados em pacientes com COVID-19. Além disso, os valores de CEA se correlacionaram com o prognóstico dos pacientes, de forma que níveis mais altos foram observados em pacientes que apresentaram maior comprometimento pulmonar e/ou vieram a óbito (CHEN *et al.*, 2020).

O cão tem sido utilizado como um modelo experimental para várias doenças humanas, tornando-o uma espécie atraente para a investigação de doenças espontâneas neoplásicas e não neoplásicas, devido à grande semelhança entre

o genoma das duas espécies (LINDBLAD-TOH *et al.*, 2005; RANIERI *et al.*, 2013).

O CEA foi estudado anteriormente em cadelas com neoplasias mamárias e apresentou boa homologia com a proteína humana pela detecção através do *Western Blot* (CAMPOS *et al.*, 2012). Além disso, ele pode ser detectado em animais saudáveis e com neoplasias mamárias utilizando um Kit ELISA humano (SENHORELLO, *et al.*, 2019). Outros trabalhos também observaram aumentos de CEA em cadelas com neoplasias mamárias malignas por meio de PCR e ELISA (FAN *et al.*, 2021; JAIN *et al.*, 2021)

Cadelas com neoplasias mamárias apresentam níveis elevados de CEA se comparadas as cadelas saudáveis e os níveis se correlacionam com variáveis clínico-patológicas como tamanho do tumor e presença de metástase em linfonodos. Além disso, os níveis diminuem após a mastectomia e apresentam boa sensibilidade e especificidade para detecção de neoplasias mamárias em cadelas (SENHORELLO *et al.*, 2019; FAN *et al.*, 2021).

Apesar de alguns trabalhos avaliarem o CEA em cadelas saudáveis e com neoplasias mamárias, até o momento não há estudos que avaliem o CEA em outras doenças neoplásicas e não neoplásicas em cães. Visto que, em cães, doenças infecciosas e neoplásicas representam grande parte da casuística de atendimentos clínicos, a busca por marcadores que auxiliem no prognóstico e acompanhamento terapêuticos dos pacientes é de suma importância (SOUSA *et al.*, 2013; SOUTO *et al.*, 2018).

Além disso, sabendo que o CEA é um biomarcador sensível e específico para o monitoramento de cadelas com neoplasias mamárias, identificar possíveis doenças concomitantes que também afetem os níveis do marcador é importante para uma correta interpretação dos resultados (SENHORELLO *et al.*, 2019). Em humanos é bem estabelecido quais doenças podem afetar os valores do CEA e com isso, é possível analisar os níveis do marcador de forma mais assertiva nos pacientes (PEÑA *et al.*, 2021).

2.2 Neoplasia mamária

As neoplasias mamárias são uma das patologias mais frequentemente diagnosticadas em cadelas, especialmente em adultas e não castradas (JAIN *et al*, 2021), além de serem malignas em 50% dos casos (SHAFIEE, *et al.*, 2013). Fatores hormonais, ambientais e genéticos estão envolvidos na sua origem e desenvolvimento. O sinal clínico observado é basicamente a identificação de aumento de volume nas mamas, sendo as glândulas caudais mais susceptíveis a formação de neoplasia mamária (DE NARDI *et al*, 2008).

O exame histopatológico é o método de eleição para o diagnóstico definitivo, pois identifica as características e o grau da neoplasia e auxilia na conduta terapêutica. Dentre as neoplasias mamárias diagnosticadas, o carcinoma é o mais comumente observado (DE NARDI *et al*, 2008). O plano de estadiamento tumoral deve incluir exame radiográfico da região torácica com a finalidade de investigar presença de metástase pulmonar (COUTO, 2010) e exame ultrassonográfico para pesquisa de metástases em órgãos abdominais (REFERÊNCIA).

Existem três categorias de tratamento para as neoplasias mamárias, a cirurgia, radioterapia e quimioterapia (RANGEL, 2008). A remoção cirúrgica completa é considerada o tratamento de eleição para as neoplasias mamárias, pois permite o diagnóstico histológico, podendo ser curativo. Ademais, observou-se que pacientes submetidos a este procedimento apresenta melhora qualidade de vida podendo até modificar a progressão da doença. Entretanto, só é possível quando não há indícios de desenvolvimento metastático (HEDLUND, 2005; DE NARDI *et al*, 2008).

As células tumorais e tecidos, em respostas à tumorigênese, expressam moléculas que podem estar presentes no sangue ou em outros líquidos biológicos, refletindo a atividade tumoral (SCHROL *et al*, 2003), podendo ser detectados por métodos não invasivos (JAIN, *et al.*, 2021). O tumor mamário tem morfologia e biologia heterogênea, tornando difícil a escolha de um marcador tumoral mais adequada para o seu diagnóstico (KASZAK, *et al.*, 2018).

O CEA é marcador tumoral mais utilizado na prática clínica no câncer de mama em humanos (PENÃ, *et al.*, 2021 e JAIN, *et al.*, 2021). Semelhante à medicina humana, em cadelas, o CEA não é indicado para o diagnóstico de tumor de mama, entretanto, pode ser útil para o acompanhamento e detecção de recidivas e metástases, nessa espécie (SENHORELLO *et al.*, 2019; JAIN, *et al.*, 2021). Alguns estudos demonstraram aumento do nível sérico do CEA em cadelas com neoplasia mamária (CAMPOS, *et al.*, 2012 e SENHORELLO, *et al.*, 2019) e redução do seu nível após o procedimento de mastectomia, permitindo o acompanhamento destes pacientes de forma eficiente (SENHORELLO, *et al.*, 2019).

Os estudos de Senhorello *et al.* (2019) e Jain *et al.* (2021) que demonstraram que os níveis do biomarcador CEA aumentam em cadelas com carcinoma mamário e apresentam alta sensibilidade e especificidade, justificando um potencial diagnóstico e de utilizá-lo para acompanhamento das pacientes. Entretanto, até o momento não existem estudos com CEA em cães com outras doenças e os fatores que podem influenciar a sensibilidade e especificidade do CEA, como é sabido na medicina (PEÑA *et al.*, 2021). Por isso, estudos acerca desse tema devem ser estimulados e podem ajudar na melhor utilização desse marcador na rotina da medicina veterinária.

2.3 Gastroenterites

A gastroenterite aguda é um distúrbio caracterizado pela inflamação da mucosa do trato gastrointestinal (TROTMAN, 2015). Dentre as patologias intestinais na rotina da clínica de animais de companhia, as gastroenterites são frequentemente diagnosticadas, podendo ser causadas por agentes infecciosos ou fatores nutricionais, incluindo deficiência de nutrientes, mudanças abruptas na dieta e alimentação inapropriada (WILLARD, 2010; BRAGA *et al.*, 2014). Dentre os agentes infecciosos, encontram-se os vírus, as bactérias e os parasitas. Ademais, podem também ser inespecíficas ou autolimitantes (TROTMAN, 2015).

Nas alças intestinais ocorrem o processo inflamatório, podendo causar perda da integridade da mucosa intestinal, gerando a alteração da permeabilidade, permitindo que microrganismos presentes na microbiota intestinal e

microrganismos patogênicos, possam adentrar na lâmina própria do intestino, podendo induzir e potencializar a resposta imune no local acometido (JÚNIOR, 2003).

A apresentação clínica das gastroenterites se dá, principalmente, por meio de sinais clínicos como diarreia e vômitos, porém outros sinais clínicos também podem ser observados como a perda do apetite, anorexia, hematêmese, melena, hematoquezia tenesmo, febre, desidratação e dor abdominal (WILLARD, 2010; TROTMAN, 2015).

Para o diagnóstico deve-se avaliar o histórico do paciente, sinais clínicos observados e achados no exame físico. Ademais, exames complementares como exame de fezes na investigação de parasitos, hemograma completo e bioquímicos, glicose sanguínea para identificar hipoglicemia, especialmente em cães jovens, eletrólitos séricos para determinar hipocalemia, radiografia abdominal e/ou ultrassonografia abdominal na suspeita de corpos estranhos, massas e obstrução, podem ser considerados (WILLARD, 2010).

LoGerfo e Herter (1972) documentaram a presença do CEA no cólon saudável de humanos, sendo o CEA um marcador importante em neoplasias de cólon (YAMAGUCHI, 2012). Kelleher *et al.* (2019) relatou o aumento do CEA em doença inflamatória intestinal, doença de Crohn e colite ulcerativa, portanto, cães com processo inflamatório intestinal de causa desconhecida ou não podem demonstrar o valor sérico de CEA alterados, devido a presença desta glicoproteína no epitélio da mucosa intestinal (RULE *et al.*, 1973.)

2.4 Erliquiose

As hemoparasitoses caninas são enfermidades diagnosticadas frequentemente na rotina da medicina veterinária, causadas por parasitas intracelulares obrigatórios de células sanguíneas e transmitidos por vetores hematófagos (LABARTHE *et al.*, 2003; LEAL *et al.*, 2015). A erliquiose, anaplasmosse e babesiose são as principais hemoparasitoses diagnosticadas a nível mundial, inclusive no Brasil (SOUSA *et al.*, 2013; COSTA, 2011).

A erliquiose canina é uma importante doença infecciosa causada por microrganismos intracelulares obrigatórios do sistema fagocítico mononuclear

(LAPPIN, 2010), sendo considerada umas das mais importantes doenças diagnosticadas em cães (BORIN *et al.*, 2009). É transmitida durante o repasto sanguíneo do carrapato da espécie *Rhipicephalus sanguineus*. Na espécie canina, os microrganismos de maior importância são a *Ehrlichia canis* e *E. Ewingi*, sendo no Brasil, *E. Canis* a espécie mais prevalente (GONÇALVES e BOTTEON, 2015; LAPPIN, 2010). Estes mesmos microrganismos parasitam e residem no interior nos monócitos e macrófagos teciduais e circulantes e são revestidos por membranas, denominado mórulas (DUMLER *et al.*, 2001).

A severidade da doença e as manifestações clínicas dependem da cepa que infecta o animal e da fase que se encontra a infecção (HARRUS *et al.*, 2015; LAPPIN, 2010). Podendo as fases da infecção, serem diferenciadas através das alterações clínicas e hematológicas (ASGARALI *et al.*, 2012). As principais manifestações clínicas descritas são apatia, anorexia/hiporexia, mucosas pálidas, secreção ocular, esplenomegalia, presença de hemorragias como petéquias e epistaxe (LAPPIN, 2010; HARRUS *et al.*, 2015).

Sabe-se que o diagnóstico se baseia em achados clínicos e hematológicos (SILVA *et al.*, 2012). As alterações hematológicas mais comumente observadas são trombocitopenia, anemia regenerativa, leucopenia, leucocitose, eosinopenia (LAPIN, 2010). Além destas alterações, o diagnóstico baseia-se nos resultados do exame parasitológico direto, sorologias e exames de biologia molecular (SILVA *et al.*, 2012).

A visualização da mórula em esfregaços sanguíneos é uma técnica a ser utilizada, porém tem baixa especificidade e sensibilidade. Os exames sorológicos que visam a detecção de anticorpos são úteis para o diagnóstico, como o ELISA, em forma de teste rápido (GONÇALVES e BOTTEON, 2015). O teste de reação em cadeia polimerase (PCR), permite a identificação do patógeno específico, sendo o método mais útil para a detecção do patógeno (SILVA *et al.*, 2012; GANTA, 2016).

A erliquiose, além de ser extremamente comum no Brasil, pode coexistir em muitos casos com outras doenças em cães, causam alterações sistêmicas com comprometimento hepático, renal e inflamação crônica (SOUSA *et al.*, 2013; COSTA, 2011). Diante disso, estudar o comportamento do CEA nessas doenças

é justificado. Uma vez que, as alterações sistêmicas podem causar aumento dos valores do marcador e possivelmente correlacionar-se com a severidade da doença, assim como observado em doenças inflamatórias e infecciosas em humanos (HAO *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2020).

2.5 Parvovirose

A parvovirose canina é uma doença infectocontagiosa causada pelo parvovírus canino (CPV). Existem dois tipos de cepas infectantes, a CPV – 1, considerado a menos patogênico, e CPV – 2, este sendo o responsável por causar enterite viral em cães, principalmente em filhotes e não vacinados (WILLARD, 2010; BIRD e TAPPIN, 2013; SOUTO *et al.*, 2018). É frequentemente diagnosticada na clínica médica de pequenos animais, sendo considerada uma das principais infecciosas em cães, causando alta taxa de morbidade e mortalidade (MCCAW e HOSKINSNS, 2006).

O vírus da parvovirose canina (CPV-2) ao longo dos anos sofreu mutações genéticas, originando novos subgrupos virais, tornando-o mais patogênico e podendo infectar a espécie felina (MORAES e COSTA, 2007; WILLARD, 2010). A infecção do CPV-2 ocorre pela via oro-nasal a partir do contato com fezes contaminadas. Após o vírus infectar o hospedeiro, ocorre um período de incubação, que varia entre 2-14 dias, neste período, ocorre à replicação viral nos tecidos linfoides. Durante a disseminação, o vírus infecta os tecidos de rápido desenvolvimento e crescimento celular, como as criptas do jejuno e íleo e o miocárdio (SMITH-CARR *et al.*, 1997; MCCAW e HOSKINSNS, 2006).

Nas alças intestinais, o vírus se replica levando a destruição do epitélio intestinal e morte celular, conseqüentemente levando ao achatamento das vilosidades intestinais (SMITH-CARR *et al.*, 1997; MCCAW E HOSKINSNS, 2006). Estas alterações permitem a proliferação e penetração das bactérias alcançando a circulação sanguínea e conseqüentemente causando a septicemia (POLLOCK e COYNE, 1993).

As manifestações clínicas iniciais são inespecíficas, incluem a anorexia, prostração, letargia e febre. O vômito e diarreia podem estar presentes após 24-48 horas dos primeiros sinais clínicos (MCWAN e HOSKINS, 2006). Quadro de

gastrenterite hemorragia, desidratação, hipovolemia e choque são outros sinais clínicos documentados (COSTA e MORAES, 2007).

O diagnóstico é estabelecido com base na anamnese, achados no exame físico e nos exames laboratoriais. Testes rápidos de ELISA com finalidade de detectar a presença do vírus nas fezes estão disponíveis, sendo o melhor teste diagnóstico (COSTA e MORAES, 2007; WILLARD, 2010). Outros métodos podem ser utilizados visando a detecção do vírus, como o teste de reação de hemaglutinação (HA), isolamento viral, ensaio imunoenzimático (EIE) e PCR (MORAES e COSTA, 2007; REDDY *et al.*, 2015).

Dentre as alterações hematológicas observadas, a leucopenia é a mais característica da parvovirose, na análise bioquímica, a hipoproteinemia é o achado mais consistente, a azotemia pré renal, hipocalemia e hipoglicemia são outros achados relacionados (SAVIGNY e MACINTIRE, 2007; COSTA e MOREIRA, 2007).

Em humanos o CEA está aumentado em pacientes com doenças neoplásicas e inflamatórias intestinais, principalmente por ser produzido por células da mucosa intestinal. É um marcador de severidade das doenças gastrointestinais, além de ter indicação para o monitoramento da resposta a terapia nos pacientes (KASZAK *et al.*, 2018; KELLERHER *et al.*, 2019).

3. Material e Métodos

3.1 Comitê de Ética

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (protocolo nº 589-2021) da UVV, Espírito Santo, Brasil e ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP-Jaboticabal (protocolo nº 10801/15). Os proprietários que aderiram ao projeto assinaram orientação e um termo de consentimento livre esclarecido. Além disso, uma declaração da procedência das amostras foi obtida para fins de comprovação quando o soro foi advinha do laboratório clínico das instituições.

3.2 Amostragem do material

As amostras foram obtidas dos animais atendidos na rotina clínica do Hospital Veterinário da UVV, Vila Velha-ES, Hospital Veterinário Seres, Vila Velha-ES e Hospital Veterinário VetSaúde, Vitória-ES, onde realizaram exames solicitados pelo Médico Veterinário responsável pelo atendimento. Após confirmação dos diagnósticos e avaliação das fichas clínicas, os soros sanguíneos foram selecionados e armazenados no banco de amostras do laboratório de patologia clínica do Hospital Veterinário da UVV. Todas as amostras de sangue foram centrifugadas conforme rotina para separar os soros. As amostras de soro foram individualmente aliquotadas e armazenadas a - 20°C para dosagem do marcador sorológico CEA.

Ademais, uma parte das amostras do grupo controle e o grupo de animais com neoplasias mamárias foram provenientes de outro projeto de pesquisa e os resultados da dosagem do CEA foram utilizados em conjunto com esse trabalho, visto que, foi realizada a mesma metodologia.

Um total de 118 cães foram selecionados, de forma que o grupo controle e o grupo de animais com neoplasias mamárias foram compostos exclusivamente por fêmeas. O material coletado e analisado foi dividido em sete grupos experimentais:

- Grupo 1 (G1): 22 cães saudáveis.

Grupo 2 (G2): 56 cadelas com carcinomas mamários sem presença de metástase;

- Grupo 3 (G3): 11 cães com parvovirose;
- Grupo 4 (G4): 13 cães com erliquiose;
- Grupo 5 (G5): 16 cães com gastroenterite de origem desconhecida;
- Grupo 6 (G6): 28 cães com sinais clínicos de gastroenterites (G3 e G5);
- Grupo 7 (G7): 40 cães sem doença neoplásica (G3, G4 e G5).

Os animais passaram, obrigatoriamente, por exame clínico completo, incluindo exame físico detalhado, hemograma e bioquímica sérica, os cães com neoplasias mamárias, além dos exames de hemograma e bioquímica sérica realizaram exames de imagem (raio-x de tórax e ultrassonografia abdominal) para estadiamento clínico TNM das Diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS) (SENHORELLO *et al.*, 2019). Após realizarem mastectomia total, uni ou bilateral de acordo com a indicação de cada caso as amostras foram submetidas a histopatologia para confirmação do diagnóstico (CASSALI *et al.*, 2014).

Pacientes com parvovirose foram diagnosticados por teste rápido positivo Alere Parvovirose Ag Test Kit® (Registro MAPA: 9.262/2007), além de apresentarem sinais clínicos relacionados ao sistema gastrointestinal. Aqueles com erliquiose foram diagnosticados através do SNAP teste (4Dx IDEXX®) e/ou identificação do antígeno através da RT-PCR e deveriam obrigatoriamente apresentar sinais clínicos e exames laboratoriais compatíveis com a doença. Pacientes com gastroenterite de origem desconhecida foram diagnosticados através da sintomatologia, exames que excluíam outras causas e dos achados do exame de ultrassonografia abdominal.

Cães saudáveis foram aqueles provenientes da rotina de atendimentos do Hospital Veterinário "Professor Ricardo Alexandre Rippler" da UVV, ES, Brasil e do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da UNESP, campus de Jaboticabal, SP, Brasil, que foram atendidos para castração eletiva. Da mesma

forma, esses animais passaram por exame físico detalhado, hematológicos e de bioquímica sérica.

Os critérios de exclusão utilizados foram: a presença de doenças concomitantes ou não relacionadas a aquelas listadas nesse estudo, pacientes com fichas clínicas incompletas ou com falta de exames que confirmavam o diagnóstico da doença e aqueles animais cujos soros sanguíneos apresentavam-se hemolisados, lipêmicos ou ictericos após centrifugação.

3.3 Marcador sorológico

Para a dosagem do CEA, foi utilizado o kit ELISA humano (AccuBind ELISA Kits, MONOBIND INC, catálogo 1825-300), enquanto a leitura foi realizada em aparelho ELISYS UNO *human*, seguindo a técnica recomendada pelo fabricante e conforme realizado por SENHORELLO *et al.*, 2019.

3.4 Análise estatística

O estudo considerou cada cão como unidade experimental para análise do CEA e das variáveis laboratoriais. Os dados foram submetidos à análise de variância e por não apresentarem distribuição normal foi realizada a transformação elevando os valores de CEA a 0,25. Quando detectadas diferenças no teste F, as médias foram comparadas pelo teste Tukey. Variáveis laboratoriais foram correlacionadas com os valores de CEA nos grupos de doenças não neoplásicas, aplicando o teste Coeficiente de Correlação de Pearson.

A área sob a curva (AUC) da curva de característica de operação do receptor (ROC) foi usada para avaliar o valor diagnóstico do marcador sérico para todas as enfermidades e o ponto de corte estabelecido foi aquele obtido a partir do grupo de controle em comparação ao grupo de animais com carcinoma mamário. Com isso, obteve-se a sensibilidade e especificidade para todos os grupos. Consequente, afim de avaliar a interferência de doenças não neoplásicas no valor diagnóstico do CEA para animais com carcinomas mamários uma análise de sensibilidade e especificidade foi realizada comparando os grupos de doenças não neoplásicas com o grupo de carcinomas mamários.

Para todas as análises foram utilizados os programas computacional SAS (SAS9.1, SAS Institute, Cary. NC, USA) e GraphPad Prisma 8.01 com nível de significância de 5%.

4. Resultados

Do total de animais utilizados no estudo, 18 (15%) eram machos e 100 (85%) eram fêmeas, a idade variou de 1 mês a 15 anos. Em comparação aos valores de CEA entre machos saudáveis (1,12 ng/mL) e fêmeas saudáveis (1,56 ng/mL), não houve diferença significativa entre os sexos ($P = 0,0813$).

Os níveis médios de CEA foram maiores no grupo carcinoma mamário (G2) (1.94 ng/mL) e menores no grupo controle (0.61 ng/mL). Os níveis médios de CEA foram significativamente diferentes entre G1 e G2 ($P < 0,0001$), G1 e G6 ($P = 0,0278$), G1 e G7 ($P = 0,0335$) e G2 e G7 ($P = 0,0314$). Entretanto não houve diferença entre os demais grupos ($P > 0,05$) (Tabela 1). Na Figura 1 encontra-se o gráfico de dispersão dos valores de CEA nos diferentes grupos experimentais, mostrando a variação entre eles.

Tabela 01- Média e desvio padrão dos valores das dosagens de CEA nos diferentes grupos experimentais.

Grupos (n)	CEA (ng/mL)	Valor P
G1 (22)	0.61 ($\pm 0,33$) a	<0,0001
G2 (56)	1.94 ($\pm 0,89$) b	
G3 (11)	1.42 ($\pm 1,15$) abc	
G4 (13)	1.47 ($\pm 1,15$) abc	
G5 (16)	1.50 ($\pm 0,98$) abc	
G6 (28)	1.48 ($\pm 1,02$) bc	
G7 (40)	1.46 ($\pm 1,06$) c	

CEA: antígeno carcinoembrionário; Letras diferentes indicam que há diferença estatística entre as médias ($P < 0,05$); Letras diferentes indicam que não há diferença entre as médias ($p > 0,05$).

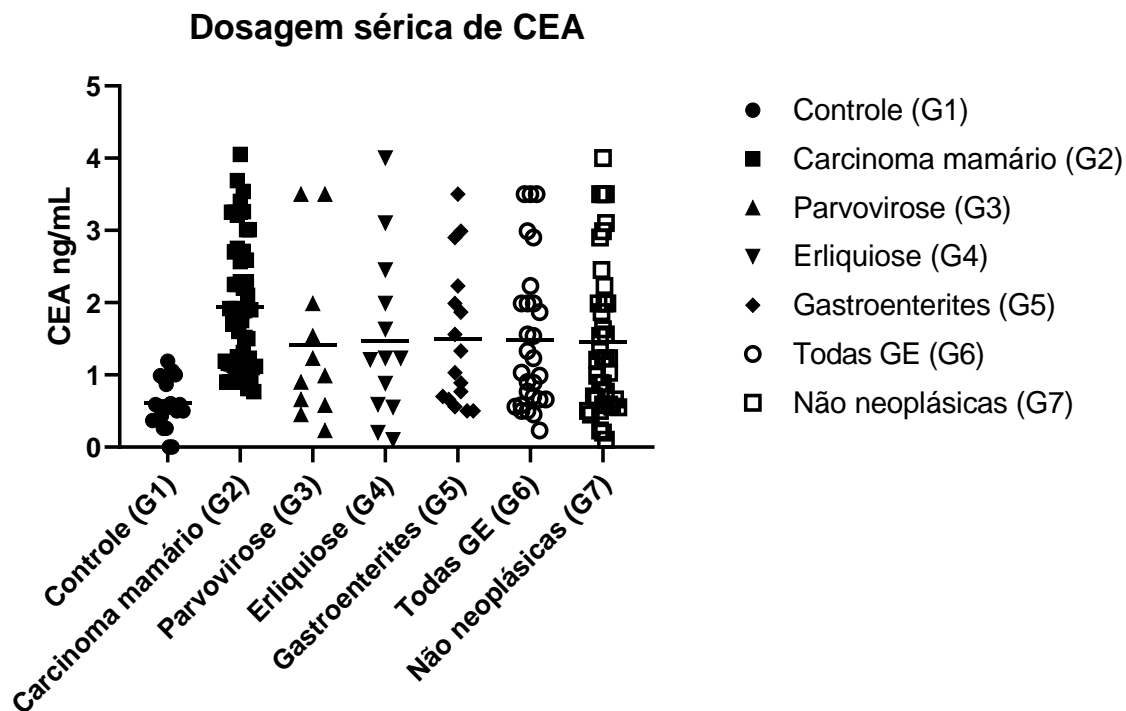


Figura 1- Representação gráfica dos valores de CEA (ng/mL) nos diferentes grupos experimentais.

A tabela 2 mostra a área da curva ROC e os valores de sensibilidade e especificidade para todos os grupos, o ponto de corte foi calculado levando em conta a curva ROC dos animais saudáveis (G1) em relação aos animais com carcinoma mamário (G2). O melhor valor de corte foi estimado para maximizar a soma de sensibilidade e especificidade. O ponto de corte estabelecido foi 1.08 ng/mL com sensibilidade de 82.14% e especificidade de 95.45%, apresentando-se como a melhor sensibilidade em relação a todos os grupos, seguida do G4 com sensibilidade de 61,64%, G6 com 55%, G7 com 52%, G5 com 50% e G3 com 45.45%.

Para avaliar a interferência na especificidade do CEA, foram comparados pacientes com doenças não neoplásicas e animais com carcinomas mamários, onde foi calculada sensibilidade e especificidade (Tabela 3). A sensibilidade foi de 82.14% para todas as análises. Entretanto, a especificidade em comparação aos grupos foi de 54.55% com G3, 38.46% com G4, 50.00% com G5 e G6 e 47.50% com G7. Observando assim, uma diminuição importante da

especificidade do teste caso o paciente apresente uma das doenças não neoplásicas relacionadas.

Tabela 2- Valores de sensibilidade e especificidade dos animais doentes em relação ao grupo controle.

Grupo	Sensibilidade	Especificidade	AUC	Valor P
G2	82.14	95.45	0,95	< 0,0001
G3	45.45	95.45	0,73	0,028
G4	61.64	95.45	0,76	0,011
G5	50.00	95.45	0,79	0,019
G6	55.00	95.45	0,78	0,0007
G7	52.50	95.45	0,76	0,0006

AUC: área sobre a curva

Para avaliar a interferência na especificidade do CEA, foram comparados pacientes com doenças não neoplásicas e animais com carcinomas mamários, calculando-se a sensibilidade e especificidade (Tabela 3). A sensibilidade foi de 82.14% para todos as análises. Entretanto, a especificidade em comparação aos grupos foi de 54.55% com G3, 38.46% com G4, 50.00% com G5 e G6 e 47.50% com G7. Observando assim, uma diminuição importante da especificidade do teste caso o paciente apresente uma das doenças não neoplásicas relacionadas.

Tabela 3- Valores de sensibilidade e especificidade dos animais com doenças não neoplásicas em relação aos animais com carcinomas mamários.

Grupos	Sensibilidade	Especificidade	AUC	Valor P
G3 x G2	82.14	54.55	0,68	0,0526
G4 x G2	82.14	38.46	0,64	0,1
G5 x G2	82.14	50.00	0,66	0,040
G6 x G2	82.14	50.00	0,66	0,014
G7 x G2	82.14	47.50	0,66	0,0053

AUC: área sobre a curva

Na tabela 4 são observadas as correlações entre os valores de CEA dos grupos G3, G4, G5 e G7 e as variáveis hematológicas. Não houve diferença significativa entre a correlação das variáveis hematológicas; leucócitos, neutrófilos, bastonetes, linfócitos, monócitos e eosinófilos com os valores de CEA de todos os grupos ($p > 0,05$). Entretanto, houve diferença significativa nos valores de plaquetas, onde foram observadas correlações positivas moderadas

entre os valores de CEA e a contagem de plaquetas para o G4 ($r = 0.68$) e para o grupo G7 ($r = 0.37$).

Tabela 4- Coeficiente de correlação de Pearson entre os valores de CEA e as variáveis hematológicas para os grupos parvovirose (G3), erliquiose (G4), Gastroenterites (G5) e todas não neoplásicas (G7).

Variáveis	G3		G4		G5		G7	
	r	p	r	p	R	P	r	p
Leucócitos	- 0,19	0,56	- 0,44	0,125	- 0,22	0,41	- 0,3	0,064
Bastonetes	- 0,6	0,86	- 0,34	0,17	- 0,2	0,46	- 0,23	0,14
Neutrófilos	0,22	0,5	- 0,4	0,25	- 0,05	0,84	- 0,18	0,27
Linfócitos	0,33	0,31	- 0,43	0,14	- 0,37	0,17	- 0,31	0,05
Monócitos	0,36	0,27	- 0,2	0,51	- 0,06	0,82	- 0,14	0,39
Eosinófilos	0,38	0,24	- 0,13	0,66	- 0,19	0,17	- 0,07	0,65
Plaquetas	0,17	0,59	0,68	0,01	- 0,37	0,16	0,37	0,01
Hemácias	0,02	0,94	0,48	0,09	0,28	0,29	0,25	0,11
Hemoglobina	- 0,02	0,94	0,39	0,18	0,3	0,26	0,25	0,11
Hematócrito	- 0,02	0,94	0,39	0,18	0,27	0,31	0,25	0,12

Na tabela 5 são observados os valores das correlações entre os níveis séricos do CEA e os valores de bioquímica sérica (creatinina, alanina aminotransferase, ureia e fosfatase alcalina). Nessa análise foram incluídos todos os animais com doenças não neoplásicas que apresentavam resultados de bioquímica sérica ($n=28$). Não houve diferença significativa entre a correlação dos níveis séricos de CEA e as variáveis bioquímicas ($p>0,05$).

Tabela 5. Coeficiente de correlação de Pearson entre os valores de CEA e as variáveis de bioquímica sérica para os animais com doença não neoplásica.

Variáveis	r	P
Creatinina	- 0,07	0,7
ALT	- 0,082	0,68
Ureia	- 0,16	0,39
Fosfatase Alcalina	- 0,21	0,26

5. Discussão

O estudo do CEA na medicina veterinária atualmente está pautado na sua relação com neoplasias mamárias em cadelas (SENHORELLO *et al.*, 2019; FAN *et al.*, 2021; JAIN *et al.*, 2021). Entretanto, não existem trabalhos que comparem o valor de CEA entre caninos machos e fêmeas, somente estudos da dosagem deste biomarcador em fêmeas saudáveis e com neoplasia mamária (LEDECKY *et al.*, 2013; SENHORELLO, *et al.*, 2019 e FAN, *et al.*, 2020). Nesse estudo, foram avaliados os níveis séricos em machos e fêmeas saudáveis, porém não foram observadas diferenças significativas nas médias no CEA em relação ao sexo. Em humanos os estudos com CEA também não demonstraram relação com sexo do paciente e sim, com a doença de base, podendo ser neoplásica como as neoplasias gástricas, colorretais e mamárias (DENG *et al.*, 2015; REITER *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2014) ou não neoplásicas como doenças inflamatórias intestinais, hepatites, pancreatites e COVID-19 (HAO *et al.* 2019; CHEN *et al.*, 2021).

As maiores concentrações médias de CEA foram observadas em cadelas com neoplasias mamárias (G2) em comparação com cadelas saudáveis (G1) e cães com doenças não neoplásicas (G7). Esses resultados confirmam o potencial desse biomarcador para o acompanhamento de cadelas com neoplasias mamárias, corroborando com os estudos de Senhorello *et al.* (2019) e Fan *et al.* (2021) que observaram aumento do CEA em pacientes com tumor de mama e após a mastectomia a concentração sérica deste biomarcador reduziu significativamente e permaneceu baixa nos pacientes avaliados posteriormente (SENHORELLO *et al.*, 2019).

Em humanos, o aumento das concentrações séricas do CEA é conhecido em outras doenças, sendo estas neoplásicas ou não (HAO *et al.*, 2018 e PEÑA *et al.*, 2021). A dosagem do CEA em animais com enfermidades não neoplásicas foi investigada pela primeira vez com esse estudo e não houve diferença do grupo controle (G1) com grupo de animais diagnosticados isoladamente com parvovirose (G3), erliquiose (G4) e gastroenterites de origem desconhecida (G5). Entretanto, quando os animais com manifestações gastrointestinais (G6) e doenças não neoplásicas (G7) foram agrupados, houve diferença significativa

com maiores médias de CEA em relação ao grupo controle, mostrando aumento de CEA também em animais com doenças não neoplásicas.

Nossos resultados vão de encontro aos observados nos estudos em medicina humana, que constataram aumento dos níveis séricos do CEA em pacientes diagnosticados com colite ulcerativa, doença inflamatória intestinal e outras doenças que causam inflamação (RULE *et al*, 1973; HAO *et al.*, 2019; KELLEHER *et al*, 2019). Segundo Tchoupa *et al* (2014) moléculas de adesão celular relacionadas ao antígeno carcinoembrionário (CEACAMs) compreendem um subgrupo de proteínas relacionadas à imunoglobulina, tendo alta adesão celular por alguns patógenos como a *Escherichia coli* (KELLEHER *et al.*, 2019). Sendo este agente um dos principais relacionados ao aumento de secreção de citocinas pró-inflamatórias em cães (SOUSA-FILHO *et al.*, 2020) o que pode justificar o aumento do CEA em gastroenterites conforme observado nesse estudo.

Além disso, a *Escherichia coli* e o principal microrganismo isolado de pacientes humanos com doença inflamatória intestinal o que assegura essa semelhança (TCHOUPA *et al.*, 2014). A adesão celular pode estimular uma resposta inata, ativação de certas quinases, estimulação de pequenas proteínas G e indução de novos eventos de expressão gênica (TCHOUPA *et al*, 2014). Podendo causar dano celular e inflamação, conseqüentemente lesão epitelial podendo induzir tumorigênese, fibrose tecidual e o aumento dos níveis séricos de CEA. (HAO *et al.*, 2019).

A erliquiose tem capacidade de induzir a expressão gênica de citocinas, que participam de muitos processos no organismo, como por exemplo na proteção do hospedeiro contra as infecções, enquanto outras exacerbam os danos causados aos hospedeiros (BRACHELENTE *et al.*, 2005). Uma destas citocinas produzidas pela infecção deste hemoparasita é a interleucina 6 (IL - 6), responsável pela indução da produção de proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa, amiloide A sérico e fibrinogênio (GRONE *et al.*, 1998). Nakagoe e Sawai (2003) descreveram correlações diretas entre os níveis de CEA e IL-6 circulante em pacientes com câncer colorretal, podendo esta correlação justificar o aumento do CEA nos cães com erliquiose. Entretanto, mais

estudos devem ser realizados afim de aprofundar o entendimento sobre essa fisipatogenia.

O parvovírus se replica nas células epiteliais das criptas na mucosa intestinal, causando a perda deste epitélio, permitindo a penetração das bactérias na circulação sanguínea (FLORES, 2007). Devido a esta patogenia, pode ocorrer uma potente resposta celular pois o CEACAM é utilizado por patógenos bacterianos como receptores do hospedeiro em células epiteliais (TCHOUPA *et al.*, 2014), podendo ter um aumento da expressão do CEA. Em um estudo com camundongos, verificaram super expressão de CEACAM após injeção transretal de um construto de adenovírus, causando regulação negativa de citocinas inflamatórias (ZHENG *et al.*, 2015). Membros da família do CEA expressas em roedores, também podem atuar como receptores para vírus, como o vírus da hepatite do rato (DVEKSLER *et al.*, 1993). Podendo estes fatores justificar o aumento do nível de CEA nos pacientes acometidos pela parvovirose, ademais, é necessária novas pesquisas para elucidar melhor esta alteração nestes pacientes.

Vale ressaltar, que além de entender se doenças não neoplásicas podem aumentar os valores do CEA em cães, este estudo tem importância para utilização do CEA na rotina clínica de animais com câncer de mama, uma vez que os estudos suportam essa aplicação (SENHORELLO, *et al.*, 2019, FAN *et al.*, 2021, JAIN *et al.*, 2021, mas ainda não sabemos quais doenças podem interferir nos valores do marcador durante o acompanhamento das pacientes.

A correlação da sensibilidade e especificidade foi utilizada como base de pacientes com tumor de mama devido ao maior uso clínico, portanto, utilizado como ponto de corte. No presente trabalho observamos que os pacientes com tumor de mama, apresentaram boa sensibilidade e especificidade na mensuração do CEA, achado semelhante ao estudo de Senhorello *et al.* (2019) que revelou boa sensibilidade e especificidade na dosagem do CEA nestes pacientes. Ademais, a sensibilidade foi baixa para as doenças não neoplásicas, fato que corrobora com o estudo de Hao *et al* (2018), que considerou baixa sensibilidade na utilização do CEA como biomarcador de diagnóstico na prática clínica em humanos para outras doenças não neoplásicas, recomendando a

associação de outro biomarcador para alcançar melhor sensibilidade e especificidade.

Também foi comparada a sensibilidade e especificidade com objetivo de avaliar se as doenças não neoplásicas poderiam aumentar as dosagens do CEA e interferir com resultados falsos positivos para carcinomas mamários. Com isso, verificou-se menor especificidade da dosagem do CEA quando comparada às enfermidades não neoplásicas. Esse resultado sugere que doenças não neoplásicas aumentam as chances de falsos positivos e que um paciente com tumor de mama em acompanhamento com os níveis séricos CEA que apresentar gastroenterite e/ou erliquiose, podem ter o valor de CEA alterado por estas enfermidades diminuindo a confiabilidade do resultado.

Esses resultados corroboram com os descritos em humanos, pois o CEA é um biomarcador não específico, estando alterado também em condições não cancerígenas, como enfermidades gastrointestinais, processos inflamatórios e outras doenças como doenças renais e hepáticas que podem elevar o CEA na ausência de neoplasia, não sendo útil como uma ferramenta geral de detecção do câncer e a interpretação dos resultados deve levar em consideração as comorbidades do paciente (TRAPE *et al.*, 2011; HAO, *et al.*, 2019; PEÑA *et al.*, 2021).

Correlações foram realizadas neste estudo com o objetivo de identificar alguma influência das alterações hematológicas de doenças não neoplásicas e os valores de CEA. Entretanto, não houve correlação com as variáveis. Ademais, humanos com anemia, apresentam aumento do CEA (HAO, *et al.*, 2019) e a deficiência de vitamina B12 uma causa importante de anemia pode elevar em até dez vezes o valor do CEA (PANIZ, *et al.*, 2005; TRAPE, 2011). Portanto, mais estudos devem ser realizados na medicina veterinária com o intuito de elucidar melhor esta correlação.

A única correlação encontrada no coeficiente de Pearson foi uma correlação positiva moderada entre o aumento do CEA e o aumento das plaquetas, tanto em animais com erliquiose (G4) quanto em todos os animais com doenças não neoplásicas (G7), quando testados simultaneamente. Espera-se que os processos inflamatórios, causem trombocitopenia, devido à destruição e o

consumo de plaquetas, o sequestro de plaquetas pelo baço, a diminuição na produção devido a hipoplasia de medula óssea e a produção de anticorpos antiplaquetários (SPAGNOL *et al*, 2007). Com isso, seria mais lógico os valores de CEA estarem correlacionados negativamente com essa variável e na literatura não existe um estudo de reporta achados semelhantes. Diante desse resultado, novas pesquisas devem ser realizadas, com um número maior de animais, a fim de confirmar esses resultados e no futuro entender melhor esta fisiopatogenia.

Em relação aos resultados de bioquímica sérica testados, não houve correlação com os valores de CEA. Nosso objetivo foi identificar a correlação do CEA com as enzimas hepáticas e renais, visto que, em doenças hepáticas de humanos, verifica-se aumento do CEA e uma relação com as enzimas alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) (RULE *et al.*, 1973 e HAO *et al.*, 2019).

Ademais, doenças renais em humanos também podem elevar os valores do CEA como observado em azotemia e uremia (HAO *et al.*, 2019). As doenças utilizadas nesse estudo podem fazer alteração hepática ou renal (WILLARD, 2010; LAPPIN, 2010), entretanto não são primárias desses órgãos e poucos animais apresentavam aumentos importantes dessas enzimas o que pode justificar nossos resultados. Diante dessa limitação, uma avaliação mais ampla contemplando um maior número de animais com alterações bioquímicas, bem como, associação com achados de ultrassonografia abdominal poderão melhorar os resultados desse estudo.

6. Conclusão

Foi possível concluir que, animais com carcinomas mamários e aqueles com gastroenterites e erliquiose apresentam valores de CEA maiores do que animais saudáveis. Entretanto, apenas para animais com neoplasia mamária o CEA se mostrou com bom valor diagnóstico, por apresentar alta sensibilidade e especificidade. Contudo, doenças não neoplásicas podem afetar drasticamente na especificidade do CEA e isso deve ser elevado em consideração durante o acompanhamento de animais com neoplasias mamárias. Ademais, nenhuma correlação importante foi observada em relação as variáveis hematológicas e bioquímicas com os valores do CEA.

Referência Bibliográficas

ABREU E.; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.48, p. 31-113, 2002.

ASGARALI, Z. et al. Haematological parameters in stray dogs seropositive and seronegative to Ehrlichia canis in North Trinidad. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. v. 3, n. 4, p. 207-211, 2012.

BEAUCHEMIN N. CEA gene family. In: Schwab M. **Encyclopedia of Cancer**., Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, Berlin; 2011. p.712–715.

BIRD, L.; TAPPIN, S. Canine parvovirus: where are we in the 21st Century. **Companion Animal**; v.18, n.4, p. 142- 146, 2013.

BORIN, S. et al. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de Ehrlichia spp. naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 566-571, 2009.

BRACHELENTE C., et al. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. **Veterinary Pathology**. v.42, p.166–175, 2005.

BRAGA, P. F. S.; et al. Fatores associados a gastroenterite em cães. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 12, n. 2, p. 73-73, 28 nov. 2014.

CAMPOS, L.C.; LAVALLE, G.E.; ESTRELA-LIMA, A. et al. CA15.3, CEA, and LDH in dogs with malignant mammary tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.26, n.1383, p.88, 2012.

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; FERREIRA, E. et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors – 2013. **Brazilian Journal of Veterinary Patology**, v. 7, n. 2, p. 38-69, 2014.

CAVALCANTI, M.F.; CASSALI, G.D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas - revisão. **Revista Clínica Veterinária**, v.11, p. 56-64, 2006.

CHEN, Q. et al. Carcino embryonic Antigen: A Potential Biomarkerto EvaluatetheSeverityandPrognosisof COVID-19. **Frontiers in Medicine**, v. 7, 2020.

COSTA, H. X. **Interação de hemoparasitos e hemoparasitoses em casos clínicos de trombocitopenia em cães no município de Goiânia**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2011.

COUTO, C.G. Neoplasias Específicas no Cão e no Gato. In: Nelson, R.W. e Couto C.G. **Medicina Interna de Pequenos animais**. 4ª ed. 2010. p. 1197-1204.

DE NARDI, A. B. et al. Neoplasias Mamárias. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, 2008. p. 371-384.

DENG, K. et al. The prognostic significance of pretreatment serum CEA levels in gastric cancer: a meta-analysis including 14651 patients. **Plos One**, v. 10, n. 4, p. e0124151, 2015.

DENK, H. et al. Carcinoembryonic antigen (CEA) in gastrointestinal and extragastrointestinal tumors and its relationship to tumor-cell differentiation. **International Journal of Cancer**. 10,2, p. 262-272, 1972.

DUMLER, J.S.; et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and „HGE agent” as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

DVEKSLER, G.S., DIEFFENBACH, C.W., CARDELLICHIO, C.B. Several members of the mouse carcinoembryonic antigen-related glycoprotein family are functional receptors for the coronavirus mouse hepatitis virus-A59. **Journal of Virology**. 67, p.1–8, 1993.

EGAWA, K. et al. Carcinoembryonic antigen and related antigens expressed on keratinocytes in inflammatory dermatoses. **British Journal of Dermatology**.134, p. 451 -459, 1996.

FAN, Y. et al. Combined detection of CA15-3, CEA, and SF in serum and tissue of canine mammary gland tumor patients. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2021.

FLORES, E.F. Patogenias das infecções víricas. In: Flores, E.F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM. 2007. p. 189-236.

GANTA, R. R. Anaplasmataceae - *Ehrlichia* e *Neorickettsia*. In: MCVEY, S.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M. M. **Microbiologia Veterinária**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

GOLD, P.; FREEDMAN, S. O. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. **The Journal of Experimental Medicine**, v.122, p. 467–481, 1965.

GONÇALVES, S.; BOTTEON, K. D. Hemoparasitoses em cães e gatos. Boletim 379 Técnico Agener União. 2015.

GRÖNE, A. et al. Cytokine mRNA expression in whole blood samples from dogs with natural canine distemper virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 65, p. 11-27, 1998.

HAO, C. et al. Serum CEA levels in 49 different types of cancer and non cancer diseases. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 162, p. 213-227, 2019.

HALL, C. et al. A Review of the Role of Carcinoembryonic Antigen in Clinical Practice. **Annals of Coloproctology**. 35, 6, p. 294-305, 2019.

HARRIS L.; FRITSCHÉ H.; MENNEL R. American Society of Clinical Oncology 2007: Update of recommendations for the use tumor markers in breast cancer. **Journal Clinical Oncology**, v. 25, p.5287–5312, 2007.

HARRUS. S.; WANER. T.; NEER, T. M. Infecção por *Ehrlichia canis*. In: GREENE, C. E. **Doenças infecciosas em cães e gatos**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2015. p. 505-529,

HEDLUND, C. S. Cirurgia dos Sistemas Reprodutivo e Genital. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de Pequenos animais**. 2ª ed. São Paulo: Roca, 2005. p. 631-636.

ISLAM, E. A. et al. Specific binding to differentially expressed human carcino embryonic antigen-related cellad hesion molecules determines the out come of Neisseria gonor rhoeae. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 8, 2018.

JAIN, M. et al. CEA, CA 15-3 e expressão de mRNA como potenciais biomarcadores em tumores mamários caninos. **Chromosome Research**, p. 1-14, 2021.

JUNIOR, A. R. et al. Doença Intestinal Inflamatória Crônica. In: Souza, H. J. **Coletâneas em Medicina e Cirurgia Felina**. Rio de Janeiro: LF Livros de Veterinária. 2003. p. 155- 164.

KASZAK, I. et al. Current biomarkers of canine mammary Tumors. **Acta Veterinaria Scandinavica**. 60, 66, 2018.

KELLEHER, M. Et al. Carcinoembryonic antigen (CEACAM) family members and Inflammatory Bowel Disease. **Cytokine and Growth Factor Reviews**. 47, p. 21-31, 2019.

KIM, H. Y.; RIKIHISA, Y. Roles of p38 mitogen-activated protein kinase, NF-kappaB, and protein kinase C in proinflammatory cytokine mRNA expression by human peripheral blood leukocytes, monocytes, and neutrophils in response to Anaplasma phagocytophila. **Infection and Immunity**. v. 70, n. 8, p. 4132-4141, 2002.

LABARTHE, N. et al. Serologic prevalence of Dirofilaria immitis, Ehrlichia canis and Borrelia burgdoferi infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, v.4, n.1, p. 67-75, 2003.

LAPPIN, M.R. Infecções Polissistêmicas por Protozoários. In: Nelson, R.W. e Couto C.G. **Medicina Interna de Pequenos animais**. 4ª ed. 2010.p. 1361-1365.

LEAL, P. D. S. *et al.* Infecção por hematozoários nos cães domésticos atendidos em serviço de saúde animal, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 37, p. 55-62, 2015.

LEDECKY, V. et al. Determination of carcinoembryonic antigen and cancer antigen values with the radioimmunoassay method in healthy females dogs. **Veterinární Medicína**, v. 58, n. 5, 2013.

LO GERFO, P et al. Demonstration of an antigen common to several varieties of neoplasia. Assay using zircon phosphate gel. **New England Journal Medicine**, v.285, p. 138-141, 1971.

LOEWENSTEIN, M. S.; ZAMCHECK, N. Carcino embryonic antigen (CEA) levels in benign gastrointestinal disease states. **Cancer**, v. 42, n. S3, p. 1412-1418, 1978.

MARINHO, V. F Z.; et al. Marcadores moleculares em câncer de mama preditivos de metástases axilares. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 53, p. 72-86, 2008.

MCCAW, D.L. E HOSKINS, J.D. Canine viral enteritis. In C.E. Greene (Ed.), **Doenças Infecciosas do Cão e do Gato**. 3 ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006, p. 63-73.

MORAES, M.P.; COSTA, P.R. Parvoviridae. In: Flores E.F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria, 2.ed. da UFSM, 2007.

NAKAGOE, T.; SAWAI, K. et al. The relationship between circulating interleukin-6 and carcinoembryonic antigen in patients with colorectal cancer. **Anticancer Research**. 23:3561–3567, 2003.

PANIS, C. et al. Fisiopatologia da deficiência de vitamina B12 e seu diagnóstico laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.41, n.5, p. 323-334, 2005.

PEÑA, A. D. L. et al. Consensus of the Spanish society of laboratory medicine and the Spanish society of medical oncology on the methodology and criteria for evaluation of circulating tumour markers in breast cancer. **Clinical and Translational Oncology**. v.23, p.1272–1280, 2021.

POLLOCK, R.V.H.; COYNE, M.J. Canine Parvovirus. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v.23, n.3, p. 555-569, 1993.

RANGEL, M. M. Eletroquimioterapia: Uma Nova Promessa para o Tratamento de Cânceres em Animais. **Revista Clínica Veterinária**, 2008. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/namidia/noticia/24857/eletroquimioterapia-nova-promessa-tratamento-canceres/>>. Acesso em: 16 nov. 2021.

REDDY, K.B. et al. Diagnosis of canine parvo viral (CPV) infection in dogs. **Intas Polivet**. v.16, n.2, p.441- 442, 2015.

REITER, W. et al. Multivariate analysis of the prognostic value of CEA and CA 19-9 serum levels in colorectal cancer. **Anticancer Research**, v. 20, n. 6, p. 5195-5198, 2000.

SAVIGNY, M. E MACINTIRE, D.K. Canine parvoviral enteritis. **Standards of Care: Emergence and critical care medicine**, v.9, n.11, p.1-6, 2007.

- SCHROHL, A.S. et al. Tumor markers: from laboratory to clinical utility. **Molecular e Cellular Proteomics**. 2, p. 378-387,2003.
- SENHORELLO, I. L.S. et al. Clinical value of carcino embryonic antigen in mammary neoplasms of bitches. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 18, n. 3, p. 315-323, 2019.
- SILVA, A. B. et al. Detecção molecular de *Babesia canis vogeli* em cães e em *Rhipicephalus sanguineus* na mesorregião do oeste maranhense, nordeste brasileiro. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 3, p. 388-395, 2012.
- SMITH-CARR, S.et al. Canine parvovirus: part 1. Pathogenesis and vaccination. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinary** v.19, p.125-133, 1997.
- SOUSA, K. C. M. de et al. Molecular and serological detection of tick-borne pathogens in dogs from an area endemic for *Leishmania infantum* in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 4, p. 525-531, 2013.
- SOUSA-FILHO, R. P. et al. A relação entre microbiota intestinal e células do sistema imune no desenvolvimento da Doença Inflamatória Intestinal em gatos: uma revisão. **PUBVET**, v.14, n.6, a591, p.1-12, 2020.
- SOUTO, E.P.F. et al. **Surto de parvovirose cardíaca em filhotes de cães no Brasil**. 2018. 5 f. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2018.
- SPAGNOL, F.H. et al. Frequência de anticorpos anti-Ehrlichia canis, Borrelia burgdorfi e antígenos de Dirofilaria immitis em cães na microrregião Ilhéus-Itabuna, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 16.3, p. 117-120, 2007.
- TCHOUPA, A. K.; SCHUHMACHER, T.; HAUCK, C. R. Signaling by epithelial members of the CEACAM family—mucosal docking sites for pathogenic bacteria. **Cell Communication and Signaling**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2014.
- TRAPE, J.et al. Increased plasma concentrations of tumour markers in the absence of neoplasia. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. 49, p.1605–1620,2011
- TROTMAN, T. K. Gastroenteritis. In Deborah C. Silverstein & Kate Hopper. 2 ed. **Small Animal Critical Care Medicine**. p. 622–626. St. Louis: Elsevier, 2015.
- WANG, G.; QIN, Y.; ZHANG, J. et al. Nipple discharge of CA15-3, CA125, CEA and TSGF as a new biomarker panel for breast cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 6, p. 9546-9565, 2014.
- WILLARD, M.D. Canine parvoviral enteritis. In Nelson R.W. e Couto C.G. **Tratado de Medicina Interna de Pequenos Animais**. 4. ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2010. p. 442-443.

ZHENG, C. et al. Exogenous carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 suppresses 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced ulcerative colitis in mice. **Journal of Surgical Research**. 195,1, p.113–120, 2005.

ANEXO



Universidade Vila Velha Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UVV)

PARECER DO RELATOR

Parecer Nº. 589-2021

Pesquisador (a) responsável: **Igor Luiz Salardini Senhorello**

Finalidade: **Pesquisa**

Instituição onde será desenvolvido: **Universidade Vila Velha**

Situação: **APROVADO**

Ao analisar o projeto de pesquisa: **"Valor clínico do antígeno carcinoembrionário (CEA) em cães com neoplasias e doenças infecciosas"**, tendo como pesquisador (a) responsável **Igor Luiz Salardini Senhorello** e considero que o projeto se encontra adequado e satisfatoriamente de acordo com as exigências das Resoluções que regem esse Comitê. A duração do projeto é de **01/08/2021 a 31/07/2022**. Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta, a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, sou de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como **72 (setenta e dois) cães**, pois o mesmo atende aos Requisitos Fundamentais da Normas de Conduta para a Utilização de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão na Universidade Vila Velha.

Vila Velha-ES, 09 de setembro de 2021.

Moacir Carretta Júnior

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UVV