



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MICHELE SALMON FREHSE

**NEOPLASIA MAMÁRIA E MICOTOXINAS:
ESTUDO RETROSPECTIVO E DE CASO-CONTROLE EM
CADELAS**

Londrina
2014

MICHELE SALMON FREHSE

**NEOPLASIA MAMÁRIA E MICOTOXINAS:
ESTUDO RETROSPECTIVO E DE CASO-CONTROLE EM
CADELAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (nível Doutorado) da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Roberta Lemos Freire.
Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Mello Martins.

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F861n Frehse, Michele Salmon.

Neoplasia mamária e micotoxinas : estudo retrospectivo e de caso-controle em
cadelas / Michele Salmon Frehse. – Londrina, 2014.

96 f. : il.

Orientador: Roberta Lemos Freire.

Coorientador: Maria Isabel Mello Martins.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Tumores em animais – Teses. 2. Cães – Doenças – Teses. 3. Mamas – Câncer –
Teses. 4. Aflatoxina – Teses. 5. Oncologia veterinária – Teses. I. Freire, Roberta
Lemos. II. Martins, Maria Isabel Mello. III. Universidade Estadual de Londrina.
Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.
IV. Título.

CDU 619:616-006.6

MICHELE SALMON FREHSE

**NEOPLASIA MAMÁRIA E MICOTOXINAS:
ESTUDO RETROSPECTIVO E DE CASO CONTROLE EM CADELAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (nível Doutorado) da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dr^a. Roberta Lemos Freire
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr^a. Ana Paula Frederico Rodrigues
Loureiro Bracarense
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dr^a. Elisabete Yurie Sataque Ono
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dr^a. Giovana Wingeter di Santis
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dr^a. Fabiana Ferreira de Souza
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Londrina, 19 de fevereiro de 2014.

O presente estudo foi realizado no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, Laboratório de Patologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias e Laboratório de Cromatografia Líquida de Alta Performance, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da mesma Universidade como um dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal pelo programa de Pós Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob orientação da Prof^a. Dr^a. Roberta Lemos Freire e co-orientação da Pro^{af}. Dr^a. Maria Isabel Mello Martins

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa, abaixo relacionados:

- 1. Fundação Araucária apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná - projeto 18334 convênio 7/2011 – UEL**
- 2. CAPES (Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior) - bolsa de doutorado concedida ao programa de Pós graduação em Ciência Animal da UEL.**

DEDICO

Aos meus pais José Maurício Frehse e Rosane Salmon Frehse que investiram em minha formação, me apoiam em todos os momentos desta trajetória, sempre torceram pelo meu sucesso e mesmo morando longe se fizeram presentes. Aos meus queridos avós Silvio Salmon (in memoriam) e Gelta Rodrigues Salmon que me apoiou em toda jornada com carinho e bons conselhos. A vó paterna Irma Frehse que sempre acreditou em mim, e a minha estimada tia avó Guiomar Maria Rodrigues (in memoriam) que de onde estiver tenho certeza que torce muito por mim.
Amo vocês, obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela saúde e força de vontade para alcançar meus sonhos, objetivos e por guiar toda minha trajetória e que nos momentos de dificuldade e fraqueza me deu forças para continuar.

À Prof^ª. Dr^ª. Roberta Lemos Freire pela orientação, apoio, paciência, confiança, amizade e ensinamentos.

À Prof^ª. Dr^ª. Maria Isabel Mello Martins pela co-orientação, amizade e transmissão de conhecimentos.

À Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula F.L.R. Bracarense e Prof^ª. Dr^ª Elisabete Y. Sataque Ono pelo apoio, parceria, confiança, amizade e conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Machado do Departamento de Clínicas Veterinárias, Teriogenologia, pela ajuda, parceria e amizade.

À Prof^ª. Dr^ª Giovana Wingeter di Santis, Prof^ª. Dr^ª Alice Alfieri, Prof. Dr. Itamar Teodorico Navarro e Prof^ª. Dr^ª Karina Flaiban pela amizade, ajuda e ensinamentos a mim transmitidos.

À Prof^ª. Carmen Hilst pela cordialidade em abrir as portas da Clínica Hilst para minhas coletas.

Ao Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri Coordenador do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, pelo apoio na execução do projeto.

À Prof^ª. Dr^ª. Mônica Vicky Bahr Arias pela solidariedade na participação com seus cães em minha pesquisa.

Ao Prof. Dr. Miguel Machinski Júnior da Universidade Estadual de Maringá e à Prof^ª. Dr^ª. Dayse Pontes Netto pela parceria do Laboratório de Toxicologia Veterinária e Plantas Tóxicas para processamento de amostras.

À Prof^ª. Dr^ª. Andréa Name Colado Simão do departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicologia (PAC) do Centro de Ciências da Saúde da UEL pela parceria, ajuda e transmissão de conhecimentos.

À Prof^ª. Dr^ª Neide Mariko Tanaka, pelo incentivo à pesquisa desde o período de graduação, ajuda, pelos bons conselhos, ensinamentos e amizade.

Ao Prof. Dr. Shiguehiro Funayama (in memoriam) eterno mestre, amigo e Orientador, exemplo de pessoa, professor e profissional, me apoiou desde a graduação e incentivou à pesquisa, sempre torceu pelo meu sucesso, eterna gratidão.

Ao Prof. Andrei Fabretti pelo material disponibilizado que facilitou nas coletas de amostras.

Ao Prof. Dr. Silvano César da Costa do Departamento de Estatística pelo auxílio na realização das análises de sobrevivência.

À Prof^a. Dr^a Letícia Yamasaki Buck, Prof^a. Dr^a Maria Isabel Mello Martins e Prof^a. Dr^a Elisabete Yurie Sataque Ono por terem aceito participar da banca de qualificação e pela contribuição para melhorias no trabalho.

Às Professoras Dr^a Ana Paula F.L.R Bracarense, Dr^a Fabiana Ferreira de Souza, Dr^a Giovana Wingeter di Santis, Dr^a Elisabete Yurie Sataque Ono e Dr^a Roberta por terem aceito participar de minha defesa de tese e por contribuírem neste trabalho.

Aos mestrandos em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina Lucas Y. Bissoqui e Erika Mitsuo K. Teixeira pela parceria no processamento das amostras, amizade e por compartilharem experiências.

A todos os colegas médicos veterinários residentes do HV, em especial aos residentes da Teriogenologia de animais de companhia, aos da Anatomia Patológica e aos da Toxicologia que de maneira direta ou indireta me ajudaram nas coletas e processamento de material.

Aos meus pais José Maurício Frehse e Rosane Salmon Frehse por todo carinho, amor, paciência, dedicação, incentivo e apoio nestes anos em que estive fora para realização de um sonho.

À minha amada vó, Gelta Rodrigues Salmon, pessoa maravilhosa que tanto me espelho, não tenho palavras para agradecer o amor, o carinho, apoio e os conselhos a mim transmitidos.

À minha irmã Caroline Salmon Frehse Pauls e meu cunhado Armin Pauls pelo carinho, apoio e força.

À minha tia Maria do Rocio Vasconcelos e meus queridos primos Paulo, Claudia e Thiago, pelo incentivo, apoio e dedicação em todos os momentos.

Aos primos e amigos Maria do Rocio Richter, Antônio Carlos Richter e Camila Richter pelo apoio, incentivo e por torcerem sempre por mim.

À Médica Veterinária e amiga Milene Rochedo Ribeiro pelo auxílio nestes anos de pesquisa, agradeço o apoio, a solidariedade, compreensão e dedicação.

À Sra. Hissako Fujioka do Departamento de Materiais da UEL pela cordialidade e por me atender sempre prontamente.

Aos bolsistas de iniciação científica Igor de Salles Percin e Nelson J. Rodrigues por todo período de coletas que prontamente ajudaram.

À Secretária da pós graduação em Ciência Animal Helenice Kieski e ao Secretário do DMVP Valdecir Gomes pela cordialidade e auxílio sempre que precisei.

À técnica do Laboratório de Toxicologia Veterinária e plantas tóxicas, Aparecida Maria de Oliveira e ao técnico do laboratório de Anatomia Patológica Animal, José Carlos Ferreira pela ajuda no processamento das amostras.

À Médica Veterinária Dra. Elizabeth Marana e Beatriz Nino por todo auxílio e troca de experiências.

À Médica Veterinária Claudia Cristina Boselli Grotti pela amizade, apoio e ajuda.

Aos enfermeiros do HV, Vilma Dias De Santana, Neusa Fronchetti, Nélio da Silva, Rosemary Segovia de Campos e Moacir Oliveira, obrigada pela boa vontade e disposição, pois as coletas ficaram mais fáceis com o auxílio de vocês.

Aos funcionários Mauro Caetano Fortunato, Mara Aquino de Andrade, Débora Sales Rodrigues Machado e Maristela Gabriel, muito obrigada pela atenção e ajuda.

Aos amigos mestrandos e doutorandos Eidi Yoshihara, Felipe Nael Seixas, Letícia Murate, Juliana Rubira Gerez, Liza Ogawa, Renilda Terezinha Monteiro, Rodrigo Azambuja, Elisângela Olegário da Silva, Rogério Marcasso, Jonatas de Campos, Luiz Daniel Barros, Ana Carolina Miura, Victor Tabacow, Sérgio Tosi Cardim, Karina Basso por compartilharem experiências, pelo apoio e pelas boas risadas.

À amiga Arlete Emy Tanaka e família pela solidariedade quando iniciei o curso, obrigada por todo o tempo de hospedagem em sua casa, pela amizade e apoio.

Às minha amigas Vanessa de Campos, Neide Tanaka, Maria Fernanda Lima e Silva, Beatriz C. Vianna, Denise Adamczyk Kozemjakin, Cassiana M. G. Ramos, Cândida Amaral, Tatiana Barbosa, Elaine Ueno, Sandra S. Vasconcelos, Camila P. P. Colaço e Adriana Ferreira Campagnoli, obrigada pela força, incentivo, carinho e compreensão.

À Universidade Estadual de Londrina, ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal pela oportunidade de realização da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de doutorado e à Fundação Araucária Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná pelo apoio financeiro do projeto.

À todos os animais que participaram do estudo e seus respectivos proprietários que sem eles nada aconteceria.

FREHSE, Michele Salmon. **Neoplasia mamária e micotoxinas:** estudo retrospectivo e de caso-controle em cadelas. 2014. 96 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

Neoplasias mamárias são comumente encontradas em cadelas, tem alta taxa de malignidade e é uma das principais causas de morte nesta espécie. O tamanho, comprometimento do linfonodo regional e sentinela, metástase à distância e o tipo histológico são importantes fatores para se traçar o prognóstico e sobrevida dos pacientes. As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos que podem contaminar os cereais utilizados como matéria-prima em ração para cães. Uma das possíveis causas para o desenvolvimento de neoplasia mamária em cães pode ser a ingestão crônica de micotoxinas presentes na ração. O estudo retrospectivo de neoplasias mamárias em cadelas mastectomizadas no Hospital Veterinário (HV) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) durante o período de 2006 a 2010 que totalizou 199 prontuários e teve como objetivo associar a classificação histológica das neoplasias mamárias à frequência das variáveis epidemiológicas pesquisadas. Neste estudo observou-se que os tumores múltiplos foram associados à neoplasia maligna ($p=0,026$) e a presença de neoplasia maligna foi associada à metástases em linfonodo ($p=0,047$). O estudo de caso-controle teve como objetivo avaliar fatores de risco para neoplasias mamárias. Além das variáveis epidemiológicas, fatores dietéticos e a contaminação da ração por micotoxinas foram investigados. No período de outubro de 2010 a outubro de 2012 foram incluídas no estudo 256 cadelas do HV/UEL, sendo 85 com neoplasia mamária (grupo caso) e 171 sem qualquer alteração em mama (grupo controle). A castração teve efeito protetor no estudo ($p=0,0004$; OR= 0,32; IC95%= 0,17-0,60). Animais castrados previamente à mastectomia representaram 20,2% (17/84). Os tumores múltiplos foram mais frequentes e as glândulas mamárias mais acometidas foram as abdominais seguido das inguinais. Os tumores malignos representaram 84%, sendo os carcinomas em maior proporção 93,7% (59/63) seguido de sarcomas 4,8% (3/63), carcinosarcoma 1,6% (1/63) e 16% tumores benignos. O tumor misto benigno representou 72,7% (8/11). Foi identificada a presença de metástase em linfonodo regional em 16% (12/75) dos casos e metástase pulmonar em 14,7% (11/75). A análise de sobrevida dos tipos histológicos mais frequentes dos animais com tumores malignos, demonstrou 33,3% (EP=0,157, IC95%= 0,13–0,84) de sobrevida nos carcinomas simples tubular grau I aos 15 meses após cirurgia, 29,6% (EP=0,164, IC95%=0,10-0,87) no grau II aos 25 meses após cirurgia, 33,3% (EP=0,27, IC95%=0,06-1) para grau III aos 17 meses após cirurgia, 72,9% (EP=0,13, IC95%=0,50-1) para carcinoma complexo grau I, aos 20 meses após cirurgia, 58,7% (EP=0,15, IC95%=0,34-1) para carcinoma complexo grau II aos 22 meses após mastectomia. A mastectomia unilateral total foi o tratamento de escolha para todos os pacientes. A determinação de micotoxinas na ração de ambos os grupos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As aflatoxinas, fumonisinas e zearalenona foram detectadas em 98,6% (146/148) das amostras. As rações analisadas foram classificadas em econômica, *premium* e *superpremium* de acordo com a qualidade mencionada pelo fabricante no rótulo da ração. Todas as amostras do tipo econômica apresentaram alguma micotoxina

(72/72), seguido das amostras do tipo *premium* 98,4% (62/63) e 92,3% (12/13) nas *superpremium*. A aflatoxina B₁ (p=0,0356; OR=2,74; IC95%=1,13-6,60), G₁ (p=0,00007; OR=4,60; IC95%=2,16-9,79) e G₂ (p=0,0106; OR=9,91; IC95%=1,21-81,15) tiveram significância estatística em relação à presença de neoplasia mamária, mostrando que a presença de cereais e sua diversidade são importantes fontes para micotoxinas, mesmo que em pequenas quantidades. Os resultados indicam a importância do diagnóstico precoce, pois tumores malignos tem alta frequência na cadela e metástase em linfonodo e a distância tem influência no prognóstico e sobrevida do paciente. A castração tem efeito protetor para neoplasia mamária em cadela. A qualidade da ração ingerida deve ser monitorada, pois em todos os tipos de ração foi detectada a presença de micotoxinas, com significância estatística para as aflatoxinas B₁, G₁ e G₂ em relação à presença de neoplasia mamária.

Palavras-chave: Tumor de mama. Cães. Aflatoxina. Fumonisina. Zearalenona

FREHSE, Michele Salmon. **Neoplasm of the breast and mycotoxins: retrospective study and case-control in female dogs.** 2014. 96 p. Thesis (Doctoral Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Tumors of the mammary gland are the most commonly neoplasms found in female dogs, the mammary tumors have a high rate of malignancy and a major cause of death in dogs. The size, involvement in regional and sentinel lymph node, distant metastasis beyond the histological type are important factors to delineate the prognosis and survival of patients. Mycotoxins are metabolites of fungi which may contaminate naturally cereals used as raw material in food for dogs. One possible cause of the development of tumors in dogs can be chronic ingestion of mycotoxins present in the feed. The retrospective study of mammary tumors in female dogs of hospital population, in bitches undergoing mastectomy at the Veterinary Hospital (HV), State University of Londrina (UEL), aimed to associate the histological classification of mammary neoplasms the frequency of searches for epidemiological variables. Survey conducted during the period 2006 to 2010 add up to 199 records. In this study it was observed that the multiple tumors were associated with malignancy ($p = 0.026$) and the presence of malignancy was associated with lymph node metastasis ($p = 0.047$). The Case-control study aimed to evaluate risk factors for breast cancer. In addition to the epidemiological variables, dietary factors and the contamination of feed by mycotoxins were investigated. From October 2010 to October 2012 were included in the study 256 bitches from HV/UEL, 85 with breast cancer (case group) and 171 without any change in breast (control group). Castration had a protective effect in the study ($p=0.0004$; $OR= 0,32$; $IC95\%= 0,17-0,60$). Castrated prior to mastectomy accounted for 20.2% (17/84). Multiple tumors were more frequent and the most affected mammary glands were followed by abdominal inguinal. Malignant tumors represented 84%, in a higher proportion carcinomas 93.7% (59/63) followed sarcomas 4.8% (3/63) carcinosarcoma 1.6%(1/63) and 16% benign tumors where benign mixed tumor represented 72.7% (8/11). The presence of regional lymph node metastasis in 16% (12/75) of cases and pulmonary metastasis in 14.7% (11/75) were identified. Survival analysis curve was performed of the most frequent histological types of animals with malignant tumors. There was obtained 33.3% ($SE= 0.157$, $95\% CI = 0.13$ to 0.84) survival in grade I at 15 months simple tubular carcinomas after surgery, 29.6% ($SE= 0.164$, $95\% CI = 0$ from 0.10 to $0, 87$) in grade II and 25 months after surgery, 33.3% ($SE = 0.27$, $95\% CI = 0.06$ to 1) for grade III to 17 months after surgery 72.9% ($SE = 0.13$, $95\% CI = 0.50$ to 1) for complex carcinoma grade I, at 20 months after surgery, 58.7% ($SE= 0.15$, $95\% CI = 0.34$ to 1) for carcinoma complex grade II at 22 months after mastectomy. The unilateral total mastectomy was the treatment of choice for all patients. The detection of mycotoxins in food for both groups was performed by the high performance liquid chromatography (HPLC) technique. Aflatoxins, zearalenone and fumonisins were detected in 98.6% (146/148). The rations were classified into economic, premium and super premium according to the quality mentioned by the manufacturer in the feed label. All samples showed some kind of economic mycotoxin 100 % (72/72), followed by samples of premium type 98.4 % (62/63) and 92.3 % (12/13) in the super-premium. Aflatoxin B1, G1 and G2 respectively had statistical significance ($p =$

0.0356, OR = 2.74, R= 1.13 to 6.60 % C95), (p=0.00007, OR = 4.60; 95% CI = 2.16 to 9.79) and (p= 0.0106, OR = 9.91, 95% CI 1.21 to 81.15) showing that the presence of cereals and their diversity are important sources for mycotoxins. The statistical package Epi Info 3.5.4 was used for the calculations of relative frequency, tabulation of the variables of interest and survival analysis in R 2.15.3 program, the Kaplan-Meier test. The results indicate the importance of early diagnosis, because malignant tumors have high frequency in dogs and lymph node metastasis and distance influences the prognosis and patient survival. Castration has protective effect for mammary cancer in dogs. The quality of feed intake should be monitored, as in all types of feed was detected the presence of mycotoxins, with statistical significance for aflatoxins B₁, G₁ and G₂ related to mammary tumor.

Keywords: Mammary tumor. Dogs. Aflatoxin. Fumonisin. Zearalenone.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO A – Estudo retrospectivo de neoplasias mamárias em cadelas de população hospitalar

- Tabela 1** – Classificação histopatológica das neoplasias mamárias de cadelas de uma população hospitalar, nos anos de 2006 – 2010, Londrina - PR.....46
- Tabela 2** – Distribuição de neoplasias mamárias em cadelas de uma população hospitalar, segundo a classificação histológica e variáveis epidemiológicas, nos anos de 2006 a 2010, Londrina - PR.....47

ARTIGO B – Epidemiological and histological aspects of canine mammary tumors diagnosed at veterinary hospital/UEL

- Table 1** – Clinical aspects of 75 female dogs with mammary tumors attended from 2010-2012 in the Veterinary Hospital at Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil52
- Table 2** – Histological classification, grading and mean survival of 75 female dogs with mammary tumors attended from 2010-2012 in the Veterinary Hospital at Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil.....53

ARTIGO C – Estudo de Caso-Controle em cadelas com neoplasia mamária e detecção de micotoxinas em ração

- Tabela 1** – Resultado de variáveis ambientais e reprodutivas em estudo de Caso-Controle de tumor mamário em 256 cadelas de uma população hospitalar, Londrina, PR, 2010-2012.....61
- Tabela 2** – Resultado de variáveis relacionadas à alimentação em estudo de Caso-Controle de tumor mamário em 256 cadelas de uma população hospitalar, Londrina, PR, 2010-2012.....62
- Tabela 3** – Frequência relativa e concentração de Zearalenona, Fumonisin (FB₁ +FB₂) e Aflatoxinas pela técnica de CLAE, em rações de 168 cadelas em estudo de Caso-Controle de neoplasias mamárias, Londrina, PR, 2010-201263

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 – Estrutura química das aflatoxinas.....	27
Figura 2 – Estrutura química das fumonisinas.....	30
Figura 3 – Estrutura química da zearalenona.....	32

ARTIGO B – Epidemiological and histological aspects of canine mammary tumors diagnosed at veterinary hospital/UEL

Figura 1 – Survival analyses curve of 46 female dogs show the most frequent histologic types malignant mammary tumors attended from 2010 – 2012 in the Veterinary Hospital at Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil	54
--	----

ARTIGO C – Estudo de Caso-Controle em cadelas com neoplasia mamária e detecção de micotoxinas em ração

Figura 1 – Distribuição geográfica das cadelas estudadas no estudo de caso controle de neoplasias mamárias na região de Londrina, PR de outubro de 2010 a outubro de 2012.....	60
---	----

LISTA DE QUADROS

REFERENCIAL TEÓRICO

- Quadro 1** – Classificação clínica de tamanho do tumor primário, linfonodos regionais e metástase pulmonar23
- Quadro 2** – Classificação histopatológica das neoplasias mamárias segundo a Organização Mundial de Saúde24
- Quadro 3** – Graduação histológica para carcinomas mamários em cadelas e gatas25
- Quadro 4** – Limites máximos tolerados para aflatoxinas, fumosinas e zearalenona no produto acabado para animais de companhia.....29

SUMÁRIO

1	REFERENCIAL TEÓRICO	17
1.1	NEOPLASIAS MAMÁRIAS.....	18
1.1.1	Incidência de Neoplasias Mamárias em Cadelas	18
1.1.2	Incidência de Neoplasia Mamária em Mulheres no Brasil e no Mundo	19
1.1.3	Fatores que Contribuem na Etiologia do Câncer	20
1.1.4	Estudos Epidemiológicos de Fatores de Risco.....	21
1.1.5	Estadiamento Clínico, Características Histológicas e Terapêutica	22
1.1.6	Importância do Estudo do Câncer nos Animais em Saúde Pública.....	25
1.2	MICOTOXINAS	26
1.2.1	Aflatoxinas	26
1.2.2	Fumonisina	30
1.2.3	Zearalenona	32
2	OBJETIVOS	43
2.1	OBJETIVO GERAL.....	43
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
3	ARTIGOS CIENTÍFICOS	44
3.1	ARTIGO A – ESTUDO RETROSPECTIVO DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS DE POPULAÇÃO HOSPITALAR	44
3.2	ARTIGO B – EPIDEMIOLOGICAL AND HISTOLOGICAL ASPECTS OF CANINE MAMMARY TUMORS DIAGNOSED AT VETERINARY HOSPITAL / UEL.....	52
3.3	ARTIGO C – ESTUDO DE CASO-CONTROLE EM CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA E DETECÇÃO DE MICOTOXINAS EM RAÇÃO.....	56
4	CONCLUSÃO	72
	APÊNDICES	73
	APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	74
	APÊNDICE B – Questionário Epidemiológico.....	75
	APÊNDICE C – Cálculo de sobrevida realizado no programa R 2.15.3.....	77

ANEXOS	80
ANEXO A – Carta de aceite do Comitê de ética em pesquisa animal	81
ANEXO B – Resumo BISSOQUI, L. Y. Avaliação do risco de exposição de cães à contaminação natural por micotoxinas. 2012. 93f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2012.	83
ANEXO C – Instrução para autores Revista Pesquisa Veterinária Brasileira - ARTIGO A.....	84
ANEXO D – Instruções para autores Brazilian Journal of Veterinary Pathology - ARTIGO B.....	88
ANEXO E – Instrução para autores Research and Veterinary Science – ARTIGO C.....	90

1 REFERENCIAL TEÓRICO

No Brasil, cães e gatos são os animais domésticos mais abundantes e populares, a população de cães representa (34,3 milhões) e de gatos (18,3 milhões) (ABINPET, 2013). O consumo de ração para cães e gatos foi de 1,83 milhões de toneladas no ano de 2010 e movimentou cerca de 7,26 bilhões de reais (ANFALPET, 2011). O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de *pet food*, com 85 fabricantes que produzem ração com preços e qualidade variáveis e mais de 500 marcas foram registradas até 2009 (CARCIOFI et al., 2009). É de suma importância que os fabricantes de *pet food* invistam em sistemas de gestão de qualidade na cadeia de produção, boas práticas de fabricação (BPF) e análises de perigos e pontos críticos de controle (APPCC), o que poderia ser um diferencial de mercado (ABINPET, 2013). Com a melhoria dos cuidados higiênico-sanitários e veterinários, os animais domésticos estão vivendo mais e tornando-se mais suscetíveis a doenças de aparecimento tardio como tumores.

O câncer é uma das principais causas de mortalidade em animais domésticos e em seres humanos, sendo a neoplasia mamária importante causa de morte em ambas as espécies. O estadiamento clínico e ovariectomia são fatores prognósticos para sobrevivência dos cães após o procedimento cirúrgico de mastectomia (WITHROW; MacEWEN, 2001; HATAKA, 2004). As neoplasias mamárias são multifatoriais. Uma das possíveis causas é idade avançada, aplicação de hormônio contraceptivo e ingestão de uma dieta desbalanceada (FONSECA; DALECK, 2000).

Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos que em condições de temperatura, umidade, danos físicos e condições de armazenamento podem contaminar grãos como aveia, arroz, trigo e milho, cereais usados como matéria-prima na cadeia de produção de rações destinada a cães. No Brasil e outros países tropicais as aflatoxinas (AF), fumonisinas (FB) e zearalenona (ZEA) são micotoxinas de grande importância, uma vez que podem causar efeitos tóxicos em seres humanos e animais, além de prejuízos econômicos na cadeia de produção. A contaminação de ração por micotoxinas pode causar riscos à saúde animal alterando a função hepática, renal, digestória, circulatória, neurológica e reprodutiva de cães, além de efeitos mutagênicos e carcinogênicos (LEUNG, AZ-LLANO; SMITH, 2006).

1.1 NEOPLASIAS MAMÁRIAS

1.1.1 Incidência de Neoplasias Mamárias em Cadelas

As neoplasias mamárias normalmente acometem cadelas de meia idade a idosos, com média entre 10-11 anos (LANA; RUTTEMAN; WITHROW, 2007). Não existe predisposição racial evidente, embora fêmeas das raças Poodle, Cocker Spaniel, Teckel, Labrador e Yorkshire terrier apresentem alta ocorrência. Fatores nutricionais têm sido relatados como promotores da carcinogênese. A obesidade aos nove a 11 meses de idade está relacionada ao aumento do risco de desenvolver neoplasia mamária na fase adulta ou idosa (QUEIROGA; LOPES, 2002).

Em machos esse tumor é raro e normalmente agressivo (MORRISON, 1998; KIRPENSTEIJN; RUTTEMAN, 2006). As cadelas possuem em média cinco pares de glândulas mamárias e cerca de 60% dos tumores envolvem o 4º e o 5º pares de glândula, devido ao maior volume destas glândulas e resposta ao estrogênio (MOULTON, 1990; WITHROW; MacEWEN, 2001; QUEIROGA; LOPES, 2002).

Os nódulos das glândulas mamárias podem ser únicos ou múltiplos, os quais poderão apresentar tipos histológicos diferentes e nestes casos o tumor de pior prognóstico determinará a sobrevivência do paciente (CAVALCANTE; CASSALI, 2006). A drenagem linfática é complexa, e envolve os gânglios linfáticos axilares e os inguinais superficiais, havendo conexões linfáticas plexiformes entre as mamas torácicas caudais e abdominais, e possivelmente entre as cadeias mamárias, o que contribui para ocorrência de metástase (RAHAL et al., 1995; MORRISON, 1998; QUEIROGA; LOPES, 2002).

Kumaraguparan et al. (2006), em um estudo na Índia, analisaram tumores mamários em humanos e em cães e caracterizaram a expressão de Bcl-2, Bcl-X e Hsp 70 e 90 com diminuição da regulação da Bax e caspases, onde a Bcl-2 e a Bcl-X são proteínas anti apoptóticas. A Bcl-2 mediada pelos efeitos anti-apoptóticos impedem a ativação das caspases, Bcl-X forma um complexo com Apaf-1 e procaspase 9, impedindo a caspase 9 ativada. Sugere-se que a desregulação da apoptose devido a um desequilíbrio na Bcl-2/ Bax pode contribuir na patogênese do câncer de mama.

1.1.2 Incidência de Neoplasia Mamária em Mulheres no Brasil e no Mundo

Na população humana, em 2005, do total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes: pulmão (1,3 milhão); estômago (um milhão); fígado (662 mil); cólon (655 mil) e mama (502 mil). No Brasil o câncer de mama constitui a primeira causa de morte por câncer em mulheres. No ano de 2009, houve 466.730 casos novos de câncer, os tipos mais frequentes, com exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, são os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e de colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (INCA, 2008). Estimativas do INCA e Ministério da saúde para o ano de 2014 apontam 580 mil casos novos da doença. Os cânceres mais incidentes na população brasileira em 2014 serão pele não melanoma (182 mil), próstata (69 mil); mama (57 mil); cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil) e estômago (20 mil). Ao todo estão relacionados na publicação os 19 tipos de câncer mais incidentes, sendo 14 na população masculina e 17 na feminina. Neoplasia mamária é o tipo mais frequente nas regiões Sul (71 casos/100 mil), Sudeste (71 casos/100 mil), Centro-Oeste (51 casos/100 mil) e Nordeste (37 casos/100 mil). Na região Norte o câncer mais incidente é o de colo de útero com (24/100 mil), e o segundo mais incidente (21 casos/100 mil) de mama. A idade é o principal fator de risco e, o número de casos aumenta de forma acelerada após os 50 anos. Sua ocorrência está relacionada ao processo de urbanização da sociedade, evidenciando menor risco de adoecimento nas mulheres com elevado nível socioeconômico (INCA, 2013).

Estima-se que em 2020 o número de casos novos anuais de câncer no mundo seja da ordem de 15 milhões. Cerca de 60% destes novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento. É também conhecido que pelo menos um terço dos casos novos de câncer, que ocorrem anualmente no mundo, poderia ser prevenido (INCA, 2008).

1.1.3 Fatores que Contribuem na Etiologia do Câncer

Os principais fatores de risco para o câncer de mama em mulheres estão ligados à idade e aos aspectos endócrinos e genéticos. Os aspectos endócrinos

estão relacionados principalmente ao estímulo estrogênico, seja endógeno ou exógeno, com aumento do risco com o maior tempo de exposição. Idade avançada, baixa paridade, menarca precoce, menopausa tardia, obesidade, alcoolismo, terapia de reposição hormonal pós-menopausa, principalmente se prolongada por mais de cinco anos, exposição a radiações ionizantes em idade inferior a 40 anos, sedentarismo e caráter hereditário (predisposição genética) que corresponde aproximadamente de 5-10% do total de casos (INCA, 2013). Já nas cadelas os principais fatores de risco estão associados a idade avançada, uso de contraceptivos e a não realização da ovariectomia precoce (SCHNEIDER et al., 1969; FONSECA; DALECK, 2000). Tais diferenças se devem ao ciclo menstrual na mulher que tem características fisiológicas diferentes das cadelas. Cadelas são monoéstricas, possuem ovulação espontânea e média de intervalo entre estros de seis meses. O ciclo estral na cadela possui a fase folicular (proestro e estro) e a lútea (diestro e anestro). No estro ocorre o pico do hormônio luteinizante (LH) e, 48h após, ocorre a ovulação, com o decréscimo do estrógeno e ascensão da progesterona. No diestro no qual há atividade do corpo lúteo, a progesterona permanece elevada até o final da gestação ou, no caso de cadelas não gestantes, pode ocorrer pseudociese. A prostaglandina é responsável pela lise do corpo lúteo, havendo um decréscimo da progesterona (WANKE; GOBELLO, 2006).

Os hormônios estrógeno e progesterona exercem uma influência central na etiologia dos tumores mamários em cadelas. São encontrados em tecidos mamários normais, porém outros hormônios como a prolactina e o hormônio do crescimento também foram observados nos tecidos mamários neoplásicos e provavelmente interagem na etiologia das neoplasias. Receptores para estrógeno e progesterona são frequentemente encontrados em tumores mamários benignos, em alguns tumores malignos e raramente em metástases (DENG; BRODIE, 2001).

O risco de desenvolvimento do câncer de mama é essencialmente determinado pela intensidade e duração da exposição do epitélio mamário à ação conjunta da prolactina e do estrógeno. A prolactina facilita a ação mitótica do estrógeno, aumentando o número de seus receptores. O estrógeno promove o crescimento celular por estimular a liberação do fator de crescimento tumoral. A progesterona também tem sido incriminada na gênese das neoplasias mamárias, por estimular a síntese do hormônio do crescimento com subsequente proliferação celular e estímulo da secreção alveolar (MULDOON, 1981; HENDERSON et al., 1982;

KOJIMA et al., 1996; MOL et al., 1997; NORMAN; LITWACK, 1997; MEUTEN, 2002).

1.1.4 Estudos Epidemiológicos de Fatores de Risco

O estudo epidemiológico da distribuição da doença em populações animais e os fatores que determinam a distribuição contribuem para esclarecer a etiologia, identificar os grupos de risco e aplicar medidas preventivas apropriadas (O'DONNELL; COUGHLIN; LEMARBRE, 1992).

Em uma revisão de literatura de 34 artigos sobre fatores de risco de câncer de mama realizada em mulheres coreanas, relacionou um total de 84 fatores de risco para câncer de mama, das quais 58 fatores foram estatisticamente significantes. Os fatores mais frequentes foram: índice de massa corporal, menarca, menopausa, histórico familiar, gravidez e parto, amamentação, alcoolismo, tabagismo, dieta, educação e uso de contraceptivos orais (LEE; PARK; PARK, 2008). Não há evidências conclusivas de que ciclos estrais irregulares, pseudociese e prenhez possam influenciar no desenvolvimento de tumores mamários, mas os estrógenos endógenos, administração de progestágenos e estrógenos como contraceptivo, podem ser desencadeantes da patogênese (MORRISON, 1998; JONES; HUNT; KING, 2000; WITHROW; MacEWEN, 2001; QUEIROGA; LOPES, 2002; KIRPENSTEIJN; RUTTEMAN, 2006).

Dorgan et al. (2009) realizaram um estudo caso-controle para determinação do nível sérico da substância inibidora de müller (MIS) e sua associação com o risco de câncer de mama. A associação da MIS com o câncer de mama não variou com a idade no momento da coleta de sangue mas foi expressiva entre mulheres com diagnóstico de câncer de mama em idade avançada. Concluíram que a MIS pode ser um novo biomarcador tumoral para câncer de mama. A terapia a ser instituída é controversa, a cirurgia tem sido eficaz na cura de 50% dos tumores malignos. Nestes casos tem sido usada a mastectomia radical ou em bloco, devendo ser acompanhada da remoção dos linfonodos inguinais e axilares quando estes estiverem aumentados de volume. A ovariectomia concomitante também é recomendada (MOULTON, 1990; JONES; HUNT; KING, 2000; WITHROW; MacEWEN, 2001; QUEIROGA; LOPES, 2002; KIRPENSTEIJN; RUTTEMAN, 2006).

Segundo Morrison (1998), tanto a prolactina quanto o estrógeno são necessários ao crescimento dos tumores mamários em cadelas. O risco de aparecimento de neoplasias mamárias nas cadelas castradas antes do primeiro cio é de 0,05%, após o primeiro cio é 8% e após o segundo cio sobe para 26% (SCHNEIDER et al., 1969).

MORRIS et al, (1998) estudaram a influência da ovariectomia em animais com média de nove anos e portadores de neoplasia mamária. Os resultados sugerem que a castração no momento da mastectomia não tem efeito na progressão da doença maligna e que uma a cada quatro cadelas com tumor benigno poderá desenvolver novos nódulos em outras mamas.

1.1.5 Estadiamento Clínico, Características Histológicas e Terapêutica

O estadiamento clínico relaciona o tamanho do tumor primário, localização, velocidade de crescimento, caráter infiltrativo, aderências e ulceração, com invasão de linfonodos regionais e metástase à distância, pelo sistema TNM (tamanho, comprometimento em linfonodo regional, sentinela e metástase à distância) (OWEN,1980; KIRPENSTEIJN; RUTTEMAN, 2006; CASSALI et al., 2011) e deve ser estabelecido antes de qualquer opção terapêutica (KIRPENSTEIJN; RUTTEMAN, 2006), conforme quadro 1.

Quadro 1 – Classificação clínica de tamanho do tumor primário, linfonodos regionais e metástase pulmonar.

<p>T- Tumor primário</p> <p>T₁ < 3 cm diâmetro</p> <p>T₂ 3-5 cm de diâmetro</p> <p>T₃ >5 cm de diâmetro</p> <p>N- Linfonodos regionais</p> <p>N₀ – histológico ou citológico – ausência de metástase</p> <p>N₁ – Histológico ou citológico – presença de metástase</p> <p>M- Metástase à distância</p> <p>M₀ – Ausência de metástase à distância</p> <p>M₁ – Presença de metástase à distância</p> <p>Estadiamento</p> <p>I: T₁; N₀; M₀</p> <p>II: T₂; N₀; M₀</p> <p>III: T₃; N₀; M₀</p> <p>IV: Qualquer T; N₁; M₀</p> <p>V: Qualquer T; qualquer N; M₁</p>
--

Modificado de Owen L.N.: Classificação dos tumores em animais domésticos, Gênova, 1980, World Health Organization (Lana et al, 2007).

A radiografia torácica avalia metástase pulmonar quando maior que 8 mm (WITHROW; MacEWEN, 2001).

A citopatologia tumoral pela punção aspirativa com agulha fina (PAAF) é útil na diferenciação entre tumores benignos e malignos, pode ser considerado um exame de triagem. Porém o histopatológico de fragmentos, obtidos por biópsia excisional, determina o diagnóstico definitivo, grau de malignidade e prognóstico (MORRISON, 1998; GUEDES et al., 2000; MAGALHÃES et al., 2001; HATAKA, 2004; DeNICOLA, 2007). A classificação das neoplasias malignas, proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1999, separou as neoplasias de acordo com o seu prognóstico (Misdorp *et al.*, 1999; Rutteman e Kirpensteijn, 2003). Os carcinomas foram subdivididos em não infiltrativos, complexos e simples (tubulopapilares, sólidos ou anaplásicos), para que as neoplasias fossem determinadas de acordo com o seu potencial de malignidade (Lana *et al.*, 2007), conforme quadro 2.

Quadro 2 – Classificação histopatológica das neoplasia mamárias segundo a Organização Mundial de Saúde.

<i>Tumores malignos</i>	<i>Tumores benignos</i>
Carcinoma <i>in Situ</i> (não infiltrativo)	Adenoma
Carcinoma Complexo	Adenoma Simples
Carcinoma Simples	Adenoma Complexo
Carcinoma Tubulopapilar	Adenoma Basalóide
Carcinoma Sólido	
Carcinoma Anaplásico	Fibroadenoma
Carcinomas de tipo especial	Tumor Misto Benigno
Carcinoma de Células Fusiformes	Papiloma Ductal
Carcinoma de Células Escamosas	
Carcinoma Mucinoso	
Carcinoma Rico em Lipídeos	
Sarcomas	
Fibrossarcoma	
Osteossarcoma	
Outros sarcomas	
Carcinossarcoma (Tumor Misto Maligno)	
Carcinoma ou Sarcoma em Tumor Benigno	

Fonte: MISDORP et al, 1999

A graduação histológica dos carcinomas em cães e gatos considera como critérios a formação de túbulos, o pleomorfismo nuclear e o índice mitótico, conforme quadro 3.

Quadro 3 – Graduação histológica para carcinomas mamários em cadelas e gatas.

Características	Contagem	
Formação de túbulos		
>75% do tumor	1	
10-75% do tumor	2	
<10% do tumor	3	
Pleomorfismo nuclear		
pequenos e regulares	1	
aumento moderado do tamanho e variação	2	
grande variação no tamanho e na forma	3	
Índice Mitótico		
0-8 mitoses	1	
9-16 mitoses	2	
acima de 17 mitoses	3	
	Total contagem/Grau de malignidade	
	3-5	I
	6-7	II
	8-9	III

Fonte: MISDORP et al, 1999

1.1.6 Importância do Estudo do Câncer nos Animais em Saúde Pública

O câncer é uma das principais causas de mortalidade em animais domésticos. As neoplasias mamárias possuem alta taxa de malignidade na espécie humana e canina, e em mulheres é a principal causa de morte no mundo (MORRISON, 1998; WITHROW; MacEWEN, 2001; JEMAL et al., 2011; INSTITUTO NACIONAL DE CANCER, 2013)

Modelos animais para estudo de neoplasias, usualmente envolvem a indução artificial de tumores por agentes químicos e virais que nem sempre reproduzem as condições de desenvolvimento espontâneo dos tumores. Animais com tumores espontâneos propiciam uma excelente oportunidade para estudar aspectos etiológicos e terapêuticos da doença. Tumores espontâneos de animais domésticos são conseqüentemente, modelos comparativos atrativos (GILLETTE, 1982; RICHARDSON, 1983) porque: 1) animais domésticos compartilham o meio

ambiente com os seus proprietários e os mesmos fatores etiológicos podem estar envolvidos na gênese dos tumores em diferentes espécies como por exemplo a radioatividade; 2) os animais podem servir de sentinelas para mudanças nos padrões do desenvolvimento de tumores observados em seres humanos. 3) várias neoplasias compartilham as mesmas características fisiológicas e metabólicas em seres humanos e animais domésticos (WITHROW; VAIL, 2007); 4) alguns tumores desenvolvem-se mais rapidamente em animais do que seres humanos, como os tumores mamários em gata, conseqüentemente, o comportamento biológico e a resposta à terapia podem ser estudados mais facilmente em animais e os resultados serem extrapolados para estudos prospectivos no homem.

Tumores espontâneos de animais também são um excelente modelo para o câncer humano em termos de antigenicidade, fatores de crescimento e extensão de diferenciação celular (WITHROW; MacEWEN, 2001).

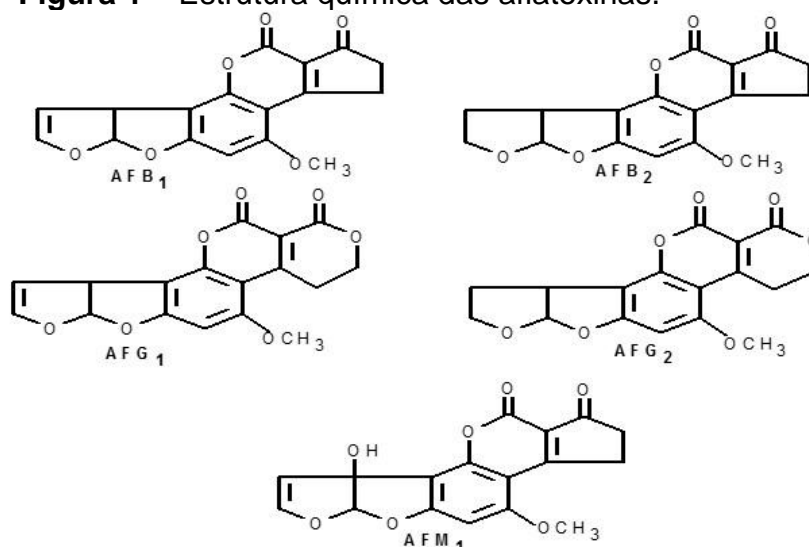
1.2 MICOTOXINAS

1.2.1 Aflatoxinas

A produção mundial anual de cereais excede os 160 kg *per capita* e estima-se que cerca de 10 a 30% dos grãos colhidos são perdidos pela presença de fungos (LINO; SILVA; PENA, 2004). No Brasil, várias micotoxinas tem sido identificadas em alimentos destinados ao consumo humano e animal, no entanto deve-se destacar as aflatoxinas não somente pela frequente ocorrência, mas também pelo seu elevado potencial tóxico demonstrado em animais de interesse zootécnico e animais de companhia (ABINPET, 2013).

As aflatoxinas (AFs) são difuranocumarinas produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, tem grande importância por sua ocorrência e toxicidade (Figura 1).

Figura 1 – Estrutura química das aflatoxinas.



Fonte: <http://www.toxicologia.unb.br>

O reconhecimento do seu potencial tóxico foi estabelecido no fim da década de 60 na Inglaterra, onde a morte de aves (perus jovens) foi ocasionada pela ingestão de ração a base de amendoim contaminado proveniente do Brasil (SARGEANT, et al, 1961). A exposição ocorre principalmente por ingestão, mas intoxicação por via tópica e inalação podem ocorrer (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003). São substâncias lipofílicas e de baixa massa molecular, absorvidas pelo intestino, passando à corrente sanguínea, onde aproximadamente 90% se liga à albumina e o restante é distribuído aos tecidos. O metabolismo hepático é a principal via de detoxificação (MIDIO; MARTINS, 2000). São estáveis e podem resistir a altas temperaturas como os processos de torrefação, extrusão, assar e cocção (SARGEANT et al., 1961; MARIN et al., 2013). As aflatoxinas podem ser encontradas em cereais, frutas, sementes antes e após a colheita e a contaminação depende de fatores como temperatura e umidade elevadas. São comumente encontradas na América do Sul, África, Ásia e Austrália. As aflatoxinas tem a denominação de B e G pois quando submetidas a luz ultravioleta apresentam fluorescência de coloração azul (blue) e verde (green) (MIDIO; MARTINS, 2000).

As aflatoxinas (AFs) mais estudadas são: AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂. A AFB₁, é o análogo mais abundante e tóxico classificado no Grupo 1, importante carcinógeno para seres humanos, seguido por AFG₁, AFB₂ e AFG₂ com toxicidades de aproximadamente 50, 20 e 10%, respectivamente. Bingham et al. (2004)

demonstraram que cães que receberam 100µg/kg de AFB₁ excretaram o metabólito AFM₁ na urina 12h após a ingestão.

Os análogos AFM₁ e AFM₂ podem ser encontrados em leite, urina e fezes pois são resultantes do metabolismo hepático das AFB₁ e AFB₂ e sua toxicidade é aproximadamente dez vezes menor que a AFB₁(YU et al., 2005; MARIN, et al., 2013).

Efeitos tóxicos e carcinogênicos da AFB₁ são manifestados após sua metabolização, nos hepatócitos, pela monoxigenase citocromo p-450 dependente. A monoxigenase catalisa o metabolismo oxidativo da AFB₁ resultando na formação de vários derivados hidroxilados: AFM₁, AFQ₁ e AFP₁, bem como a formação do AFB₁ 8-9-epóxido mais prevalente e altamente reativo. Efeito carcinogênico e mutagênico da AFB₁ tem afinidade eletrofílica do AFBO pelo DNA e proteínas, ocasionando na formação de adutos macromoleculares tais como: AFB₁ N⁷ – guanina com o DNA e a AFB₁ – lisina com a albumina do soro (WANG et al, 1996). Em virtude da capacidade de se ligarem ao DNA das células, as aflatoxinas afetam a síntese proteica, tem efeitos oncogênicos, imunossupressivos, hepatotóxico, nefrotóxico e anti coagulante. Os cães são considerados altamente sensíveis a aflatoxinas (CHAFFEE et al., 1969; KETTERER et al., 1975). O primeiro relato de aflatoxicose em cães foi em 1952 nos Estados Unidos da América (EUA), quando ração contaminada por fungos foi a causa da ‘hepatite X’ em cães.

Os sinais clínicos de aflatoxicose aguda em suínos poderão iniciar seis horas após a ingestão do alimento contaminado, ocasionando depressão, presença de sangue nas fezes, tremores musculares, incoordenação motora, inapetência, hipertermia podendo levar a morte nas 12-24 horas seguintes (COOK, W.O.; ALSTINE, W.G.V.; OSWEILER, G.D, 1984). Em cães normalmente são casos de intoxicação aguda e fatal. O diagnóstico é realizado pela análise da ração e histopatológico do fígado (BAILLY et al., 1997).

Estudo realizado em 1998 no Texas, (EUA) apontou morte de 55 cães decorrente da ingestão de ração contaminada com aflatoxina em diferentes níveis 150 – 300µg/Kg (BINGHAM et al., 2004). Ração comercial para cães contaminada com altos níveis de aflatoxina foi responsável pela intoxicação aguda e morte de 23 cães nos EUA em 2005 (LIGHTFOOT; YEAGER, 2008). Sharma e Márquez (2001) avaliaram a presença de aflatoxinas em 35 amostras de ração comercial para cães e

gatos no México. A aflatoxina B₁ foi detectada em 88,5% das amostras de ração e este nível foi elevado em 17% das amostras de ambas as espécies.

No Brasil (SP) foram analisadas aflatoxinas e fumonisinas em 24 amostras de milho destinadas à fabricação de ração para animais de companhia (pet). Aflatoxinas totais foram detectadas em 10 amostras (41,66%), com variação de 0,35 a 3,93µg/Kg, todas as amostras apresentaram níveis de contaminação abaixo de 5,0 µg/Kg. Em 100% (n=24) das amostras foi detectada FB₁, com níveis variando de 0,539 a 9,707 µg/kg e média de 3,275 µg/Kg e em 83,3% das amostras foi detectado FB₂, com níveis variando de 0,01 a 6,672 µg/Kg e média de 1,307 µg/Kg (CRUZ, 2010).

Nas intoxicações subagudas, os sinais clínicos em suínos são de evolução mais lenta, os animais podem apresentar icterícia, desidratação e perda progressiva de peso. Nos casos de intoxicação crônica ocorre diminuição do ganho de peso, inapetência, redução da conversão alimentar, podendo ocorrer ataxia, icterícia e por vezes convulsão. Em aves a intoxicação está associada à esteatorréia que é acompanhada por diminuição nas atividades específicas e totais da lipase pancreática que é responsável pela digestão de gorduras, levando à esteatose hepática. Observa-se também palidez de mucosas e penas devido à absorção deficiente, diminuição no transporte e deposição tecidual de carotenoides da dieta, ocasionando a 'síndrome da ave pálida (DILKIN; MALLMANN, 2004).

As aflatoxinas representam um sério risco para saúde humana e animal. O limite máximo de tolerância (LMT) previstos na legislação para aflatoxinas totais em milho grão e sub-produtos será o mesmo valor estabelecido no Brasil para consumo humano: 20 µg/kg de aflatoxinas totais (BRASIL, 2002). A ABINPET recomenda limites para o produto acabado (ração para cães e gatos), porém não há legislação no Brasil para fumonisina e zearalenona, conforme quadro 4.

Quadro 4 – Limites máximos tolerados para aflatoxinas, fumonisinas e zealeronona no produto acabado para animais de companhia.

MICOTOXINAS	LIMITE MÁXIMO PARA O PRODUTO ACABADO
Aflatoxina total (B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂)	20 µg/kg [§]
Fumonisina (B ₁ +B ₂)	4000 µg/kg [*]
Zearalenona	100 µg/kg [*]

[§] Diário Oficial da União – Resolução RDC nº 274 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

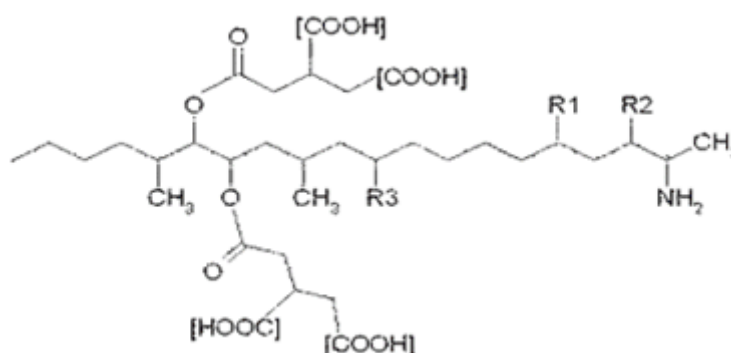
^{*} Recomendação ABINPET 2013

Fonte: Adaptado da ABINPET (2013).

1.2.2 Fumonisin

A fumonisin é caracterizada quimicamente como um hidrocarboneto alifático, com um grupo amino terminal e duas cadeias laterais de ácido tricarbóxico (Figura 2).

Figura 2 – Estrutura química das fumonisin.



Fonte: <http://micotoxinas.com.br>

São produzidas por fungos do gênero *Fusarium*, principalmente *F. verticillioides* e *F. proliferatum* e são consideradas micotoxinas de grande impacto na saúde humana, animal e nas indústrias de rações e alimentos, detectadas principalmente em milho e alimentos a base de milho no Brasil e no mundo (DOKO; VINCONTI, 1994). As micotoxinas produzidas podem estar presentes nas fases de pré colheita e pós colheita, condições de armazenamento e fatores como temperatura e umidade são essenciais para o crescimento do fungo (ONO et al., 1999).

São moléculas fortemente polares, solúveis em água, em solventes polares como metanol e acetonitrila (KRSKA; WELZIG; BOUDRA, 2007). Os processos térmicos de extrusão, cozimento, assar e fritar em temperaturas entre 150 e 200°C pode reduzir as concentrações de fumonisin em rações e alimentos em até 85%, porém não se pode assegurar completamente a isenção de fumonisin em alimentos (HUMPF; VOSS, 2004).

Existem pelo menos três diferentes compostos de ocorrência natural que fazem parte do grupo das fumonisin sendo denominadas fumonisin B₁ (FB₁), fumonisin B₂ (FB₂) e fumonisin B₃ (FB₃). A FB₁ a mais abundante e carcinogênica, hepatotóxica, nefrotóxica e hepatocarcinogênica para ratos (MIDIO; MARTINS,

2000). O primeiro relato sobre a ocorrência natural de fumonisina B₁ em milho foi em uma região da África do Sul com alta incidência de câncer esofágico (GELDERBLOM et al, 1988). Os efeitos em seres humanos e nos animais podem diferir de acordo com o nível de contaminação e toxicidade da micotoxina, espécie, tempo de exposição, idade e estado nutricional do indivíduo (BENNET; KLICH, 2003; BINDER et al., 2007).

A absorção das fumonisinas pelo trato digestório é muito baixa nos animais, sendo rapidamente excretada, entretanto o fígado e os rins são os órgãos alvo (VOSS et al., 2001). A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, 2002) avaliou o risco de carcinogenicidade das fumonisinas em seres humanos e classificou-as como possivelmente carcinogênicas.

As fumonisinas são estruturalmente semelhantes aos esfingolipídeos, esfinganina e esfingosina, que inibem competitivamente a ceramida sintase (esfingosina e esfinganina N-acetiltransferase, enzima importante na biossíntese e degradação de esfingolipídeos (IARC, 2002).

Nos mamíferos as bases esfingóides estão presentes no cérebro de mamíferos e aves, sendo o glicosfingolipídeo galactosil ceramida o maior constituinte da membrana dos oligodendrócitos e das células de Schwann. Atuam na regulação celular e no controle de proteínas membranares, mediando o crescimento celular, diferenciação e morte celular (TURNER; NIKIEMA; WILD, 1999).

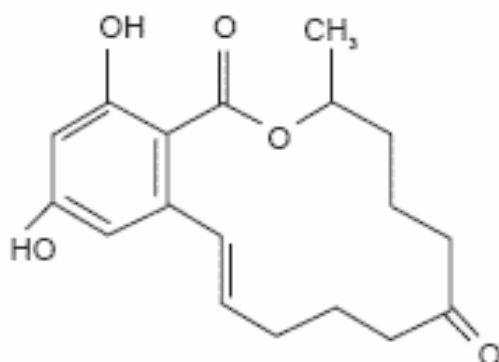
A exposição à FB₁ induz à leucoencefalomalácia em equinos, edema pulmonar em suínos, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade em ratos, em ovelhas e coelhos nefrotoxicidade, câncer esofágico em seres humanos expostos a altos níveis de contaminação de milho por fumonisina (BEZUIDENHOUT et al., 1998; MALLMANN et al., 2009; TURNER; NIKIEMA; WILD, 1999). A FB₁, tem efeitos carcinogênicos, inibe a síntese proteica, promove estresse oxidativo, induz a fragmentação do DNA e interrompe o ciclo celular (CREPPY et al., 2004).

Mallmann et al. (2001) avaliaram os níveis de fumonisina B₁ em 407 amostras de cereais (milho, arroz, trigo, cevada, aveia e farelo de soja) na região sul do Brasil. A FB₁ foi detectada em 32% das amostras. As maiores concentrações foram encontradas no arroz, 14,21 µg/g; trigo, 24,35 µg/g; e cevada, 2,43 µg/g.

1.2.3 Zearalenona

Zearalenona (ZEA) é uma micotoxina produzida por diversas espécies de fungos do gênero *Fusarium*, o mais comum é o *Fusarium roseum* (*F. graminearum*), comumente encontrado em milho, trigo, soja, cevada, centeio, aveia e arroz e também de rações animais destinadas a aves e, principalmente, a suínos (GAJECKI et al., 2010; DOLL; DANICKE, 2011). Fungos do gênero *Fusarium* destacam-se como um dos mais importantes em termos de perdas globais devido às micotoxicoses, produzem uma variedade de micotoxinas, dentre elas a zearalenona (SMITH; SEDDON, 1998). A ZEA é uma lactona do ácido resorcíclico substituída, é estruturalmente similar aos estrogênios (Figura 3).

Figura 3 – Estrutura química da Zearalenona



Fonte: www.qnint.s bq.org.br

Fisiologicamente a ZEA se assemelha ao 17 β estradiol, liga-se aos receptores em células alvo do corpo como: útero, glândulas mamárias, hipotálamo e glândula pituitária e exerce ação estrogênica (ABID-ESSIFI et al., 2004; PILLAY et al., 2002). O complexo receptor ZEA migra para os núcleos e liga-se aos sítios do estradiol no DNA, iniciando a síntese do RNA específico. Funciona como estrógeno inibindo a secreção e liberação do hormônio folículo estimulante (FSH), que inibe a maturação do folículo ovariano pré ovulatório (OSWEILLER, 1998). A espécie suína é a mais suscetível aos efeitos reprodutivos da ZEA como infertilidade, edema vulvar, prolapso vaginal, hipertrofia mamária em fêmeas, feminização em machos e atrofia testicular (PERAICA et al., 1999).

Efeitos tóxicos da ZEA foram demonstrados em nível celular e molecular como a indução da apoptose, fragmentação do DNA, produção de micronúcleo,

aberração cromossômica (PARVEEN; ZHU; KIYAMA, 2009; RAMANATHAN; GRAY, 2003).

A ZEA quando ingerida é rapidamente absorvida 80-85% via trato gastrointestinal e metabolizada no fígado, sendo seus metabólitos α e β zearalenol detectados no sangue cerca de 30 minutos após a ingestão (OLSEN, 1989). A ZEA pode ser excretada na bile ou na urina. Os metabólitos excretados na urina na forma de glucuronídeos derivam da conjugação com o ácido glucurônico pela ação da enzima uridina difosfato glucuronil transferase (ZINEDINE et al., 2007). A ingestão de ração contaminada com ZEA pode provocar desordens reprodutivas em cães como apoptose em células ovarianas em cadelas pré púberes (BOERMANS; LEUNG, 2007; GAJECKA; PRZYBYLSKA-GORNOWICZ, 2012; GAJECKA, 2013).

Pillay et al. (2002) adaptaram uma metodologia analítica para determinar a concentração de ZEA e seus metabólitos utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. A concentração de ZEA e seus metabólitos (α -zearalenol e β -zearalenol) presente no plasma de pacientes com carcinoma mamário e cervical foram comparados com níveis de pacientes que apresentaram outro diagnóstico e voluntários saudáveis. Não houve diferença significativa entre os grupos. Os resultados sugerem que a presença destas micotoxinas no sangue não indicam relação causal entre a exposição e seus efeitos micoestrogênicos exógenos e subsequente biológicos na população estudada, mas pode ser usado como indicador de exposição.

Abid-Essefi et al. (2009) investigaram o mecanismo molecular da toxicidade de ZEA, α -zearalenol e β -zearalenol. Os efeitos tóxicos foram estudados pelo teste MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) para determinação da viabilidade de células isoladas e indução do estresse oxidativo pela mensuração da produção do malondialdeído (MDA). Os resultados demonstraram que a ZEA bem como os seus dois metabólitos apresentaram efeitos tóxicos variáveis. Eles induziram a morte celular e o aumento da formação do MDA. Estes efeitos estão associados com a fragmentação do DNA assim como ativação da caspase-3.

No estudo realizado por Abid-Essefi et al. (2003) observaram diversas linhas de investigação que sugerem que a ZEA pode ser genotóxica *in vivo*, a genotoxicidade da ZEA foi confirmada em três linhagens celulares, Vero (rim de macaco verde), Caco 2 (câncer de cólon humano) e DOK (queratinócito oral displásico) na concentração de 10, 20 e 40 μ M. ZEA induz a fragmentação dose

dependente de DNA resultando na progressão do padrão do DNA na eletroforese em gel de agarose. Esta observação é compatível com apoptose, da qual foi confirmado pela detecção da formação de corpo apoptótico. Além disso, ZEA induz o controle do ciclo celular das três linhagens celulares caracterizados pelo aumento do número de células em fase G2/M do ciclo celular. A vitamina E na concentração de 25µM adicionado simultaneamente com ZEA, reduziu parcialmente a fragmentação de DNA e formação de corpo apoptótico após 24 horas de incubação. A vitamina E pode agir pela manutenção prolongada do controle do ciclo celular durante o período na qual ocorre o reparo do DNA.

Abid-Essefi et al. (2004) avaliaram o envolvimento de possíveis mecanismos induzidos pela toxicidade da ZEA, citotoxicidade, desordem do ciclo celular, inibição proteica e síntese do DNA bem como marcador presuntivo tardio do estresse oxidativo, malondialdeído, os quais foram monitorados em células Vero (rim de macaco verde) e Caco-2 (câncer de cólon humano) expostos a zearalenona. Os resultados demonstraram que a ZEA reduz a viabilidade celular correlacionado ao desarranjo do ciclo celular, inibe a síntese proteica do DNA e aumenta a formação de MDA em ambas linhagens celulares dose-dependente. Concluíram que a citotoxicidade e dano oxidativo são mecanismos adicionais da toxicidade dependente de ZEA.

Em um estudo realizado em 30 cadelas beagle pré-púberes divididas em três grupos, onde foi administrado 50 µg/ZEA/kg por dia para o grupo I, 75µg/ZEA/kg para o grupo II e o grupo III recebeu placebo e após 112 dias realizada ovariectomia em todos os grupos onde observou-se receptores de estrógeno em amostras de ovário pela técnica de imuno-histoquímica Os resultados revelaram ausência de receptores de estrógeno alfa em todos os grupos e hiperestrogenismo (GAJECKA, 2012).

Gajecka et al. (2008a, 2008b) analisaram 9 cadelas expostas à contaminação artificial por zearalenona nos níveis de 25 e 50 µg/Kg de peso do animal por dia. As análises histopatológicas e imunohistoquímica nos ovários mostraram degeneração das células da granulosa e atrofia, assim como edemas e hemorragias. Houve diminuição da atividade dos folículos ovarianos, das conexões intercelulares e surgimento de espaços intercelulares. A intensidade dos efeitos foi proporcional à dose administrada. Outro estudo experimental realizado por Gajecka et al. (2007), em cadelas utilizou 25µg ZEA/kg animal/dia na ração durante 100 dias.

Houve degeneração e atrofia no endométrio e miométrio, além de edema e hemorragia.

Neoplasia mamária em cadelas é uma doença crônica e multifatorial. Acredita-se que a ingestão, por tempo prolongado, de ração contaminada com micotoxinas potencialmente carcinogênicas e acrescida de comida caseira rica em gordura, possa contribuir para o desenvolvimento da doença.

REFERÊNCIAS

- ABID-ESSEFI, S. et al. Comparative study of toxic effects of zearalenone and its two major metabolites α zearalenol and β zearalenol on cultured human caco-2 cells. **Journal Biochemical Molecular Toxicology**, v. 23 n. 4, p. 233-243, 2009.
- ABID-ESSEFI, S. et al. DNA fragmentation, apoptosis and cell cycle arrest induced by zearalenone in cultured DOK, Vero and Caco- 2 cells: prevention by Vitamin E. **Toxicology**, v. 192, p. 237-248, 2003.
- ABID-ESSEFI, S. et al. Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 467- 474, 2004.
- ANFALPET. **Perfil Pet 2011**. 2011. Disponível em <<http://www.anfalpet.org.br>>. Acesso em 29 nov.2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO - ABINPET. **Manual pet food Brasil**. 7. ed. Disponível em: <<http://www.mflip.com.br/pub/abinpet/index.jsp>>. Acesso em: 30 out. 2013.
- BAILLY, J. D. et al. Canine aflatoxicosis: reported case and review of the literature. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 148, n. 11, p. 907-914, 1997.
- BENNET, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.
- BEZUIDENHOUT, S. C. et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, v. 11, p. 743-745, 1998.
- BINDER, E. M. et al. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 265-282, 2007.
- BINGHAM, A.K. et al. Identification and reduction of urinary aflatoxin metabolites in dogs. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 11, p. 1851-1858, 2004.
- BOERMAN, H. J.; LEUNG, M. C. Mycotoxins and the pet food industry: toxicological evidence and risk assessment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 95-102, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº8, de 11 de outubro de 2002. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, 2002. Seção 2, p.1-6.
- BRASIL. **Resolução RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/2002/274_02rdc.htm>. Acesso em: 5 out. 2013.
- CARCIOFI, A. C. et al. Qualidade e digestibilidade de alimentos comerciais de diferentes segmentos de mercado para cães adultos. **Revista Brasileira Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 10, n. 2, p. 489-500, 2009.

- CASSALI, G. D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 4, p. 153-180, 2011.
- CAVALCANTE, M. F.; CASSALI, G. D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas – revisão. **Clínica Veterinária**, v. 11, p. 56-64, 2006.
- CHAFFEE, V.W.; EDDS, G.T.; HIMES, J.A. Aflatoxicosis in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.30, p.1737-1749, 1969.
- CIRILLO, T. et al. Natural co-occurrence of deoxynivalenol and fumonisins B1 and B2 in Italian marketed foodstuffs. **Food Additives & Contaminants**, v. 20, n. 6, p. 566-571, 2003.
- COOK, W.O.; ALSTINE, W.G.V.; OSWEILER, G.D. Aflatoxicosis in Iowa swine: Eight cases (1983-1985). **J .Am. Vet. Med. Ass.**, Chicago, v.194, p.554-558, 1989.
- COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY - CAST. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. **Task Force Report**, Iowa, v. 139, 2003.
- CREPPY, E. E. Synergistic effects of fumonisin B1 and ochratoxin A: are in vitro cytotoxicity data predictive of in vivo acute toxicity? **Toxicology**, v. 201, n. 1-3, p. 115-123, 2004.
- CRUZ, J. V. S. **Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos a base de milho e milho utilizado como ingrediente em ração para animais de companhia, comercializados na região de Pirassununga, Estado de São Paulo**. 2010. 88 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.
- DALECK, C. R. et al. Aspectos clínico e cirúrgico do tumor de mama canino. **Ciência Rural**, v. 28, n. 1, p. 85-100, 1998.
- DENG, C.; BRODIE, S. G. Knockout mouse models and mammary tumorigenesis. **Cancer Biology**, v. 11, p. 387-394, 2001.
- DeNICOLA, D. B. **Cytology of neoplasia**. In: NAVC Proceedings 2007, North American Veterinary Conference (Eds).
- DILKIN, P.; MALLMANN, C. A. Sinais clínicos e lesões causadas por micotoxinas. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 11., 2004, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba, Universidade Federal de Santa Maria, 2004. Disponível em:<<http://www.lamic.ufsm.br/papers/142z.pdf>> Acesso em: 4 dez. 2013.
- DOKO, M. B.; VINCONTI, A. Occurrence of fumonisins B1 e B2 in corn and corn based human foodstuffs in Italy. **Food Additives and Contaminants**, v. 11, n. 4, p. 433-439, 1994.
- DOLL, S.; DANICKE, S. The fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. **Preventive Veterinary Medicine**, v.102, p.132-145, 2011.

- DORGAN, J. F. et al. Prospective case – control study of serum mullerian inhibiting substance and breast cancer risk. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, p. 1-9, 2009.
- FONSECA, C. S.; DALECK, C. R. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovário-histerectomia como terapia adjuvante. **Ciência Rural**, v. 30, p. 731-735, 2000.
- GAJECKA, M. et al. Histopathological and immunohistochemical examinations, and changes in proliferation activity of the uterus in bitches following zearalenone micotoxicosis. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 10, n. 3, p. 141-151, 2007.
- GAJECKA, M. et al. Histopathological examination of ovaries in bitches after experimental zearalenone mycotoxicosis. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 11, n. 4, p. 363-366, 2008a.
- GAJECKA, M. et al. Ultrastructural changes of ovarian follicle and corpus luteum after experimental zearalenone mycotoxicosis in bitch. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 11, n. 4, p. 327-337, 2008b.
- GAJECKA, M. The effect of experimental low zearalenone intoxication on ovarian follicles in pre-pubertal bitches. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 16, n. 1, p. 45-54, 2013.
- GAJECKA, M. The effect of low-dose experimental zearalenone intoxication on the immunoexpression of estrogen receptors in the ovaries of pre-pubertal bitches. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 15, n. 4, p. 685-691, 2012.
- GAJECKA, M.; PRZYBYLSKA-GORNOWICZ, B. The low doses effect of experimental zearalenone (ZEN) intoxication on the presence of Ca²⁺ in selected ovarian cells from pre-pubertal bitches. **Polish Journal of Veterinary Science**, v. 15, n. 4, p. 711-720, 2012.
- GAJECKI, M. et al. Zearalenone – undesirable substance. In: MAHENDRA, R; AJIT, V. (Ed.). Mycotoxins in food, feed and bioweapons. **Verlag Berlin Heidelberg**, p. 131-144, 2010.
- GELDERBLOM, W.C.A .et al. Fumonisin- novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.7, p.1806-1811, 1988.
- GILLETTE, E. L. Spontaneous canine neoplasms as models of therapeutic agents. In. FIDLEY, I. J.; WHITE, R. J. (Ed.). **Design of models for testing cancer therapeutic agents**. New York: Van Nostrand Reinhold Co, 1982. p. 185-192.
- GUEDES, R. M. C. et al. Acurácia do exame citológico no diagnóstico infecciosos e proliferativos dos animais domésticos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 5, 2000.
- HATAKA, A. **Citologia aspirativa com agulha fina e histopatologia**: valor e significado para o diagnóstico e prognóstico do câncer de mama em cadelas. 2004. 90 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, 2004.

HENDERSON, B. E. et al. Endogenous hormones as a major factor in human cancer. **Cancer Research**, v. 42, p. 3232-3239, 1982.

HUMPF, H. U.; VOSS, K. Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. **Molecular Nutrition and Food Research**, v.48, p.255-269, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **Estimativa 2008**: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=2> Acesso: 24 out 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. Programa nacional de controle do câncer de mama. **Fatores de risco**. 2008. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_controle_cancer_mama/fatores_risco>. Acesso: 29 nov. 2013.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC. Some mycotoxins – Aflatoxins. In: _____. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**: some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene, 2002. p. 171-300.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **Cancer Journal of Clinicians**, v. 61, p. 134, 2011.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000.

KETTERER, P.J., WILLIAMS, E.S., BLANEY, B.J. et al. Canine aflatoxicosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 51, p. 355-357, 1975.

KIRPENSTEIJN, J.; RUTTEMAN, G. R. Practical treatment of mammary neoplasia. In: NAVC Proceedings 2006, North American Veterinary Conference.

KOJIMA, H. et al. Apoptosis of pregnancy-dependent mammary tumor and transplantable pregnancy-dependent mammary tumor in mice. **Cancer Letters**, v. 110, p. 113-121, 1996.

KRSKA, R.; WELZIG, E.; BOUDRA, H. Analysis of *fusarium* toxins in feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 241-64, 2007.

KUMARAGURUPARAN, R. et al. Of humans and canines: a comparative evaluation of heat shock and apoptosis-associated proteins in mammary tumors. **Clinica Chimica Acta**, v. 365, p. 168-176, 2006.

LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S.J.; Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Small animal clinical oncology**. 4. ed. Philadelphia: Saunders, 2007. p. 619-633.

LEE, S. M; PARK, J. H; PARK, H. J. Breast cancer risk factors in Korean women: a literature review. **International Nursing Review**, v. 55, p. 355-359, 2008.

LEUNG, M.C.K.; AZ-LLANO, G.; SMITH, T.K. Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventive strategies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9623-9635, 2006.

LIGHTFOOT, T. L.; YEAGER, J. M. Pet bird toxicity and related environmental concerns. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 11, p. 245-246, 2008.

LINO, C. M; SILVA, L. J. G; PENA, A. S. Fumonisin: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 99, n. 552, p. 181-192, 2004.

MAGALHÃES, A. M. et al. Estudo comparativo entre citopatologia e histopatologia no diagnóstico de neoplasia canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, 2001.

MALLMANN, C. A. et al. Efeito das micotoxinas em pets. **International Pet Meeting**, São Paulo, p. 17-19, 2009.

MALLMANN, C. A. et al. Fumonisin B₁ levels in cereals and feeds from southern Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 1, p. 41-45, 2001.

MARIN, S. et al. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 218-237, 2013.

MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Iowa State: Univ. California, 2002.

MÍDIO, A. F.; MARTINS, D. I. Agentes tóxicos contaminantes diretos de alimentos. In: MÍDIO, A. F. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. p. 61-90.

MISDORP W. et al. Definitions and explanatory notes. Who Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat. Washington: Armed Forces **Institute of Pathology**, 1999, 18-27.

MOL, J. A. et al. The role of progestins, insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 51, p. 339-344, 1997.

MORRIS, J.S et al. Effect of ovariohysterectomy in bitches with mammary neoplasms. **The Veterinary Records**, v.142, p.656-658, 1998.

MORRISON, W. B. Cancer of the reproductive tract. In: _____. **Cancer in dogs and cats**. Pennsylvania: Williams & Wilkins, 1998. p. 591-598.

MOULTON, J. E. Tumors of the mammary gland. In: _____. **Tumors in domestic animals**. 3. ed. Berkeley: University of California, 1990. p. 518-552.

MULDOON, T. G. Interplay between estradiol and prolactin in the regulation of steroid hormone receptor levels, nature, and functionality in normal mouse mammary tissue. **Endocrinology**, v. 109, n. 5, p. 1339-1346, 1981.

NORMAN, A. W.; LITWACK, G. **Hormones**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1997. p. 213-523.

O'DONNELL, J. F., COUGHLIN, C. T.; LEMARBRE, P. J. Cancer epidemiology. In: FISCHER, M. G. (Ed.). **Oncology for the house officer**. Williams & Wilkins, 1992. p. 18-40.

OLSEN, M. Metabolism of zearalenone in farm animals. In: CHELKOWSKI, J. **Fusarium mycotoxins, taxonomy and pathogenicity**. Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 167-177.

ONO, E.Y.S. et al. Effect of climatic conditions on natural microflora in fumonisins freshly harvested corn of the state of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, v. 147, p. 139-148, 1999.

OSWEILER, G. D. Toxicologia veterinária. In: _____. **Micotoxinas**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998.

OWEN, L. N. TNM Classification of tumors of domestic animals. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, p. 237-246, 1980.

PARVEEN, M.; ZHU, Y.; KIYAMA, R. Expression profiling of the genes responding to zearalenone and its analogues using estrogen-responsive genes. **Febs Letters**, v. 583, p. 2377-2384, 2009.

PERAICA, M. et al. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, n. 9, 1999.

PILLAY, D. et al. The quantitative analyses of zearalenone and its derivatives in plasma of patients with breast and cervical cancer. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 40, n. 9, p. 946- 951, 2002.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos - novas perspectivas- **Congresso de Ciências Veterinárias**, Oeiras, 2002. p. 183-190.

RAHAL, S. C. et al. Uso da fluoresceína na identificação de vasos linfáticos superficiais das glândulas mamárias das cadelas. **Ciência Rural**, v. 25, n. 2, p. 251-254, 1995.

RAMANATHAN, L.; GRAY, W.G. Identification and characterization of a phytoestrogen-specific gene from the MCF-7 human breast cancer cell. **Toxicology and Applied Pharmacology**. V.191, p.107-117, 2003.

RICHARDSON, R. C. Spontaneous canine and feline neoplasms as models of cancer in man. **Kal Kan Forum**, v. 2, p. 89-94, 1983.

RUTTEMAN, G.R; KIRPENSTEIJN, J. Tumours of the Mammary Glands. **BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology**. Dobson JM e Lascelles BD, BSAVA: 234-242, 2003.

SARGEANT, K., O'KELLY, J., CARNAGHAN, R.B.A. & ALLCROFT, R. The assay of a toxic principle in certain groundnut meals. **Vet. Rec.**, 73, 1219–1222, 1961.

SCHNEIDER, R.; DORN, C. R.; TAYLOR, D.O.N Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. **Journal of the National Cancer Institute**, v.43, p.1249-1261, 1969.

SHARMA, R.; MÁRQUEZ, C. Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dogs and cats) using immunoaffinity column and HPLC. **Animal Feed Science and Technology**, v. 93, p. 109-114, 2001.

SMITH, T. K.; SEDDON, I. R. Synergism demonstrated between Fusarium mycotoxins. **Feedstuffs**, p. 12-17, 1998.

TURNER, P. C.; NIKIEMA, P.; WILD, C. P. Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. **Mutation Research**, v. 443, p. 81-93, 1999.

VOSS, K. A. et al. An overview of rodent toxicities: liver and kidney affects of fumonisins and Fusarium moniliforme. **Environmental Health Perspectives**. v. 109, n. 2, p. 259-266, 2001.

WANKE, M.M.; GOBELLO, C. Ciclo Estral Canino. In: _____. **Reproduccion en Caninos y Felinos domesticos**. Buenos Aires: Inter-Médica, 2006. p. 1-9.

WANG, LI YU. et al. Aflatoxin Exposure and Risk of Hepatocellular Carcinoma in Taiwan. **Internal Journal Cancer**. v. 67, p. 620-624, 1996.

WITHROW, J.; VAIL, D. M. (Ed.). Part III. Therapeutic modalities for the cancer patient. In: _____. **Small animal clinical oncology**. 4. ed. St Louis: Saunders, 2007. p. 157-371.

WITHROW, S. J.; MacEWEN, E. Tumors of the mammary gland. In: _____. **Small animal clinical oncology**. 3. ed. Philadelphia: Saunders Co, 2001. p. 356-372.

YU, J. et al. Aspergillus flavus genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.22, p. 194-202, 2005.

ZINEDINE, A. et al. Review on the toxicity, occurrence, metabolismo, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An estrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1-18, 2007.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Descrever os aspectos epidemiológicos, histopatológicos e de sobrevida e, determinar os fatores associados às neoplasias mamárias em cadelas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar os aspectos epidemiológicos, histopatológicos e de sobrevida, em cadelas com neoplasia mamária submetidas à mastectomia por meio de levantamento de dados de prontuário hospitalar;

Avaliar os fatores associados à neoplasia mamária em cadelas, por meio de um estudo observacional de caso-controle;

Pesquisar a presença de Aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂), Fumonisina (B₁ e B₂) e Zearalenona (ZEA), em ração consumida por cadelas selecionadas para um estudo de caso-controle;

Analisar e avaliar a relação entre as neoplasias mamárias nas cadelas e a presença de micotoxinas na ração.

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1 ARTIGO A – ESTUDO RETROSPECTIVO DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS DE POPULAÇÃO HOSPITALAR

Estudo retrospectivo de neoplasias mamárias em cadelas de população hospitalar¹

MS Frehse², APFRL Bracarense², MIM Martins³, EO Silva², IS Perecin², NJR Santos², MC Sant'Anna³; RL Freire²

ABSTRACT.- Frehse M.S., Bracarense A.P.F.R.L., Martins M.I.M., Silva E.O., Perecin I.S., Santos N.J.R., Sant'anna M.C., Freire R.L. 2013. [A retrospective study of mammary tumors in female dogs hospital population] *Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00*. Centro de Ciências agrárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid PR 445 Km 380, Campus Universitário, Cx. Postal 10.011, Londrina, PR 86.057-970, Brasil. E-mail: rlfreire@uel.br

The mammary gland neoplasms are the most common tumor found in intact female dogs, is a leading cause of death in pets. The aim of this assay was realize a retrospective study in canine mammary neoplasms submitted to mastectomy at University Veterinary Hospital, and analysis the histopathological classification of these tumors and frequency of epidemiological variables surveyed. The survey was conducted over a 5-year period (2006-2010), accomplishing 199 records. For the data compilation a designed form with variable review such as food, housing, breeding and metastasis were filled according to the records of animals treated as well as variables related to histopathological diagnosis. All data were inserted to the statistical package EpiInfo (3.5.4) for determine the frequencies. Chi-square test and Fisher exact tests with significance level of 5% were used for statistical establishment. Data concerning to breed, age, type of feeding, castration, applying hormone (progestin), reproductive history and tumor size for the presence of malignancy were not associated with the presence of malignancy ($p>0,05$). Multiple tumors were associated with the presence of malignancy ($p=0,026$). Likewise, the presence of malignancy has been associated with lymph node metastasis ($p=0,047$).

INDEX TERMS: Mammary tumor, dogs, mastectomy, histopathological, diagnosis.

RESUMO.- Tumores da glândula mamária são as neoplasias mais comumente encontradas em cadelas não castradas, sendo importante causa de mortalidade em animais de companhia. Objetivou-se realizar um estudo retrospectivo em cadelas submetidas à mastectomia em uma população hospitalar e associar a classificação histológica das neoplasias mamárias à frequência das variáveis epidemiológicas pesquisadas. O levantamento dos dados foi realizado entre os anos de 2006 a 2010 e totalizou 199 prontuários. Para a compilação dos mesmos foi elaborado um formulário com variáveis de resenha, alimentação, habitação, reprodução e metástases, preenchidas de acordo com o prontuário dos animais atendidos, bem como variáveis relacionadas ao diagnóstico histopatológico. Os dados foram inseridos no pacote estatístico EpiInfo (3.5.4) para a realização dos cálculos de frequências e tabulações. A variável raça, idade, tipo de alimentação, habitação, castração, aplicação de hormônio (progestágeno), histórico reprodutivo e tamanho do tumor não apresentaram diferença estatística ($p>0,05$) em relação ao comportamento maligno. Tumores múltiplos foram associados à presença de neoplasia maligna ($p=0,026$). Da mesma forma, a presença de neoplasia maligna foi associada à metástase em linfonodo ($p=0,047$). O carcinoma

¹Recebido em

Aceito para publicação em

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rodovia Celso Garcia Cid | PR 445 Km 380 | Campus Universitário, Cx. Postal 10.011, Londrina, PR 86.057-970, Brasil. *Autor para correspondência: rlfreire@uel.br

³ Departamento de Clínicas Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina (UEL), Rodovia Celso Garcia Cid | PR 445 Km 380 | Campus Universitário, Cx. Postal 10.011, Londrina, PR 86.057-970, Brasil.

complexo e o carcinoma simples foram os tipos histológicos mais frequentes com 36,41 e 33,15% respectivamente.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Tumor de mama, cães, mastectomia, histopatológico, diagnóstico.

INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias são os tumores mais comuns em cadelas. Cerca de 50% são diagnosticados como malignos e frequentemente apresentam metástases que levam o animal à óbito (Misdorp 2002, Lana et al. 2007). Em mulheres, a incidência mundial de tumores mamários é alta e representa a principal causa de morte por câncer (Jemal et al. 2011). As características clínicas, epidemiológicas e o comportamento biológico dos tumores de cadelas são similares aos tumores mamários na mulher, por esta razão a cadela é um bom modelo experimental para entender a carcinogênese (Peleteiro 1994, Misdorp 2002, Withrow & Vail 2007).

As neoplasias mamárias são hormônio dependentes. O risco de desenvolvimento do câncer de mama é essencialmente determinado pela intensidade e duração da exposição do epitélio mamário à ação conjunta da prolactina e do estrogênio. A prolactina facilita a ação mitótica do estrogênio, aumentando o número de seus receptores. O estrogênio é responsável pelo desenvolvimento de ductos mamários e promove o crescimento celular por estimular a liberação do fator de crescimento epitelial. Este fator é semelhante à insulina que é expresso em animais normais e em portadores de neoplasias benignas. Já nas mulheres com neoplasia maligna é pouco expresso (Rutterman 1990, Klopffleisch et al. 2010). A progesterona também tem sido associada à gênese das neoplasias mamárias benignas, pois induz aumento dos alvéolos, lóbulos e estimula a síntese do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) com subsequente proliferação celular e estímulo da secreção alveolar (Henderson et al. 1982, Kojima et al. 1996). Em um estudo realizado por Ferreira et al. (2009) houve correlação negativa entre a expressão de receptores de progesterona e o tamanho do tumor; também foi observada a expressão de receptores para progesterona em 100% dos tumores benignos e 24% nos malignos.

As neoplasias mamárias acometem cadelas de meia idade a idosas, sexualmente intactas ou castradas (Daleck et al. 1998, De Nardi et al. 2002), no entanto a ovariectomia (OHE) realizada precocemente tem sido associada à baixa prevalência (Moe 2001, Egenvall et al. 2005). Estudo retrospectivo sobre tumores de mama em cadelas (1647 casos) realizado no sul do Brasil identificou 73,3 e 26,6% de tumores malignos e benignos, respectivamente (Oliveira Filho, 2010). Em outro estudo, os tumores malignos representaram 83,7% dos casos, com predomínio de carcinomas 81% (Gómez et al., 2012). Dados da literatura indicam que neoplasias benignas como o tumor misto benigno podem transforma-se em malignos com a evolução do processo (Auclair & Ellis 1996, Meuten 2002, Genelhu et al. 2007).

As neoplasias mamárias na cadela apresentam-se, geralmente, como nódulos circunscritos, com grande variação nas dimensões, consistência e mobilidade à pele e musculatura, podendo estar associadas à ulceração cutânea e reações inflamatórias locais. Frequentemente são observados múltiplos tumores em uma mesma mama ou envolvimento simultâneo de várias mamas (tumores multicêntricos), os quais podem apresentar diferentes tipos histológicos (Kurzman & Gilbertson 1986, Misdorp et al. 1999). Nesses casos, o tumor de pior prognóstico determinará a sobrevivência do paciente (Cavalcanti & Cassali 2006).

As mamas abdominais caudais e inguinais são acometidas com uma maior frequência quando comparadas às mamas torácicas, representando 60% dos casos de mamas acometidas e tumores multicêntricos ocorrem em 50% dos casos (Moulton 1990, Cassali et al. 2011). O pulmão é o sítio mais comum para metástase em cães com tumores malignos da glândula mamária, mas exames adicionais, como a ultrassonografia abdominal, podem ser indicados dependendo de sinais clínicos específicos. A detecção de metástases à distância está relacionada com um prognóstico desfavorável (Sorenmo 2003). A cirurgia é o tratamento de escolha para tumores de mama em cadelas; em pacientes sem envolvimento metastático, após a completa excisão cirúrgica, existe melhora na qualidade de vida e alta probabilidade de cura; a única exceção é o carcinoma inflamatório (Daleck et al. 1998, De Nardi et al. 2007).

O objetivo deste estudo foi realizar um estudo retrospectivo de cadelas submetidas à mastectomia, por um período de cinco anos, e associar a classificação histológica das neoplasias mamárias à frequência das variáveis epidemiológicas.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (Ofício n.13/10 do CEUA).

O estudo teve como base o levantamento dos registros de exames histopatológicos de neoplasias mamárias de cadelas submetidas à mastectomia em um Hospital Veterinário Escola no período de 2006 a 2010. Foram colhidas as informações sobre as pacientes (prontuário) e os aspectos macroscópicos e microscópicos dos tumores. A classificação histológica seguiu os critérios propostos por Meuten, 2002.

As informações foram coletadas mediante a confecção de um formulário com questões fechadas e relacionadas à raça, idade, local de criação (zona rural ou urbana), tipo de alimentação, dados reprodutivos (número de gestações, castração, aplicação de hormônios), doenças concomitantes, presença de metástase, realização de quimioterapia, tipo de procedimento cirúrgico efetuado, além dos dados de classificação histológica dos tumores após a mastectomia.

Utilizou-se o programa estatístico EpiInfo (3.5.3) para a tabulação dos dados obtidos, bem como para os cálculos de frequência relativa e tabulação das variáveis de interesse. Foram aplicados os testes estatísticos de qui-quadrado ou exato de Fisher, considerando-se um nível de significância de 5%.

RESULTADOS

No período avaliado, amostras de tecidos mamários provenientes de 199 cadelas submetidas à mastectomia tiveram diagnóstico histopatológico de neoplasia. Os prontuários relacionados foram avaliados para o preenchimento do formulário de pesquisa, porém alguns encontravam-se incompletos.

Todos os animais foram provenientes do Estado do Paraná sendo: 161 (82,6%) de Londrina; 28 (14,4%) da região metropolitana e seis (0,5%) de outros municípios. Houve maior ocorrência de neoplasia mamária em cadelas com raça (65,3%) do que naquelas sem raça definida (SRD) (34,7%). As raças mais frequentes foram: Poodle (26,9%; 35/130), Cocker Spaniel (20%; 26/130) e Teckel (16,1%; 21/130). A idade média dos animais foi $10 \pm 1,9$ anos. Foram encontrados animais de 3 a 15 anos. Da população estudada, 190 (96,9%) habitavam a área urbana e seis (3,1%) a área rural. Quanto ao tipo de alimentação 105 animais recebiam ração acrescida de comida caseira (56,5%), 60 eram alimentados com ração (32,3%) e 21 com comida caseira (11,3%).

Cadelas não castradas representaram 127 (65,5%) animais. Entre as portadoras de neoplasia mamária, 40 (28,6%) tinham histórico de aplicação de contraceptivos. Em relação ao histórico reprodutivo, 79 (54,5%) foram cadelas nulíparas, 32 (22,1%), primíparas e 34 (23,4%) múltiparas.

Nos registros analisados, 141 (74,6%) animais apresentaram tumores em múltiplas mamas e 48 (25,4%) tumores únicos. Em relação ao tamanho do tumor 111 (48%) eram pequenos (≤ 3 cm); 104 (45%) médios (3,1 a 10 cm) e 16 (6,9%) grandes (> 10 cm). Afecções concomitantes foram verificadas em 107 (54%) cadelas, as mais frequentes foram: doença periodontal (61%), sopro cardíaco (14%), catarata (8%) e otite (2,9%). Foram detectadas metástases em linfonodo por histopatologia em 24 (13,2%) pacientes e metástases pulmonares pela técnica radiográfica de tórax em 11 (6,5%) das pacientes.

Em 21 (11,4%) cadelas foi realizada mastectomia total bilateral, em 17 (9,3%) mastectomia total bilateral em dois procedimentos, em 81 (44,8%) mastectomia unilateral com tumores contralaterais, em 60 (33%) mastectomia unilateral sem tumores contralaterais, e em 19 (10,4%) mastectomia em bloco. Em todos os animais foi realizada OSH e mastectomia, exceto nos casos de mastectomia em bloco onde o objetivo foi proporcionar qualidade de vida ao animal de maneira paliativa. A quimioterapia, como tratamento adjuvante, foi realizada em quatro pacientes (2,3%). Os protocolos quimioterápicos utilizados foram vimblastina ou ciclofosfamida associada à vimblastina.

A classificação histológica dos tumores resultou em 172 (86,4%) tumores malignos e 27 (13,6%) benignos, conforme descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação histológica das neoplasias mamárias de cadelas de uma população hospitalar, nos anos de 2006 a 2010, Londrina, PR.

Classificação histológica	Número	%
Carcinoma complexo (grau I a III)	67	36,41
Carcinoma simples (grau I a III)	61	33,15
Carcinossarcoma	18	9,78
Tumor misto benigno	17	9,24
Osteossarcoma	5	2,72
Carcinoma anaplásico	3	1,63

Sarcoma pouco diferenciado	3	1,63
Fibroma	2	1,09
Adenoma	2	1,09
Carcinoma inflamatório	2	1,09
Carcinoma <i>in situ</i>	2	1,09
Fibrossarcoma	1	0,54
Osteoma	1	0,54
TOTAL	184	100

Dos 199 tumores avaliados, 15 (7,54%) não eram de origem de tecido mamário, sendo representados por hemangiossarcoma (5/15), lipomas (4/15), hemangiomas (1/15), tumor de células escamosas (2/15), melanoma (1/15), tricoepitelioma (1/15) e mastocitoma (1/15).

As variáveis constantes do formulário foram analisadas quanto à presença ou ausência de tumor maligno e estão apresentados na Tabela 2. A raça ($p=0,952$), idade ($p=0,452$), local de habitação ($p=0,694$), tipo de alimentação ($p=0,536$), castração ($p=0,166$), aplicação de hormônio (progestágeno) ($p=0,912$), histórico reprodutivo ($p=0,052$), tamanho do tumor ($p=0,077$) não apresentaram significância estatística, enquanto a presença do tumor maligno foi associada a tumores múltiplos ($p=0,026$) e à metástase em linfonodo ($p=0,047$).

Tabela 2. Distribuição de neoplasias mamárias em cadelas de uma população hospitalar, segundo a classificação histológica e variáveis epidemiológicas, nos anos de 2006 a 2010, Londrina PR.

Variáveis	Neoplasia maligna / Total	(%)	Valor de p
Raça			
Sim	60/69	(86,9)	0,952
Não	112/130	(86,1)	
Idade			
3-5 anos	6/6	(100)	0,452*
5-10 anos	96/114	(84,2)	
10-15 anos	67/76	(88,1)	
Habitação			
Área urbana	163/190	(85,7)	0,694
Área rural	6/6	(100)	
Tipo de Alimentação			
Ração	49/60	(81,6)	0,536
Comida caseira	19/21	(90,4)	
Comida caseira e ração	91/105	(86,6)	
Castração			
Sim	54/67	(80,5)	0,166
Não	113/127	(88,9)	
Aplicação de hormônio progestágeno			
Sim	34/40	(85,0)	0,912
Não	84/100	(84,0)	
Histórico Reprodutivo			
Nulíparas	63/79	(79,7)	0,052
Primíparas	28/32	(87,5)	
Múltiparas	33/34	(97,0)	
Tipo de tumor			
Único	36/48	(75,0)	0,026
Múltiplo	126/141	(89,3)	
Tamanho do tumor			
≤ 3cm	52/67	(77,6)	0,077
3,1-10cm	87/98	(88,7)	
≥ 10cm	16/17	(94,1)	

* Três animais não tiveram a idade informada.

Amplitude 3-15 anos; média $10 \pm 1,9$ anos

DISCUSSÃO

A classificação histológica dos tumores resultou em 172 (86,4%) tumores malignos e 27 (13,6%) benignos. Estudos realizados no Brasil também obtiveram frequências mais elevadas de neoplasias malignas (Hataka 2004, Oliveira Filho et al, 2010, Cassali et al. 2011), provavelmente a razão para a alta prevalência de tumores malignos foi o tempo prolongado entre o aparecimento do tumor e a avaliação clínica (Oliveira et al. 2003).

No presente estudo, raças de pequeno porte foram mais frequentes em relação as demais. Animais de pequeno porte são mais facilmente mantidos em áreas urbanas e a qualidade da alimentação fornecida, restrição de exercício e estresse também devem ser levados em consideração. Resultados semelhantes foram relatados em estudos realizados no Japão (Itoh et al. 2005) e no Brasil (Oliveira Filho et al. 2010), nestes as raças Poodle e Teckel estão entre as mais acometidas, porém não houve predisposição racial. Animais de pequeno porte convivem mais diretamente com os proprietários, o que facilita a percepção do aparecimento de nódulo mamário e a busca por tratamento. Itoh et al. (2005) verificaram em 101 animais com neoplasia mamária, que raças pequenas apresentaram 25% de tumores malignos e 6,7% de mortalidade; enquanto que as raças maiores apresentaram 58% de tumores malignos e 26,8% de mortalidade.

A idade média das fêmeas acometidas foi semelhante à relatada em outros estudos nacionais e internacionais (Karayannopoulou et al. 2005, Cassali et al. 2011). Há um consenso de que a maioria dos tumores mamários se desenvolve em cadelas com idade de 8 a 10 anos (Schneider 1970, Hellmen et al. 1993, Chang et al. 2005). Embora a ocorrência de neoplasia mamária não tenha sido influenciada pela idade ($p>0,05$), as cadelas mais idosas estiveram expostas por mais tempo à ação hormonal, o que pode ter contribuído para o aparecimento de neoplasias.

Schneider et al. (1969) verificaram que o risco de desenvolver tumor mamário em fêmeas castradas antes do primeiro cio é de 0,05% e demonstraram o efeito protetor da castração na idade jovem, bem como a dependência hormonal da neoplasia mamária. No presente estudo não houve diferença significativa quanto à castração, porém não foi determinada a idade de realização da cirurgia. A maioria dos proprietários possuem baixo poder aquisitivo, sendo o custo da cirurgia um fator limitante. Além disso desconhecem os benefícios da castração, portanto não a realizam como prevenção às neoplasias mamárias.

Em 28,6% dos casos analisados relatou-se a administração hormonal; possivelmente para solucionar de maneira simples e a baixo custo o aparecimento indesejável do cio. Em outro estudo nacional realizado em Marília/SP, 46,8% dos animais receberam contraceptivos (Hataka, 2004). O progestágeno, exógeno ou endógeno, está entre os fatores indutores ou promotores da carcinogênese (Oliveira et al. 2003, Bocardo et al. 2008).

A prevalência de tumores mamários malignos foi maior em cadelas múltiparas e naquelas não castradas. Estudo retrospectivo realizado por Oliveira Filho et al. (2010) demonstraram em 9,4% (123) dos casos a castração prévia à exérese tumoral.

Em relação aos tumores malignos observou-se associação significativa com a presença de tumores múltiplos. Sorenmo et al. (2009) verificaram que em 90 cadelas com neoplasias mamárias, 66% apresentaram tumores múltiplos. Os mesmos autores constataram que tumores mamários malignos foram significativamente maiores (4,7cm) do que os benignos (2,1cm). Animais com tumores malignos foram mais propensos a desenvolver novos tumores primários do que aqueles com tumores benignos. Houve associação entre o tamanho do tumor e malignidade e evidências de que os tumores malignos se desenvolvem a partir de lesões benignas pré-existentes.

Segundo Otoni et al. (2010), aproximadamente 50% de todos os tumores mamários em cadelas são classificados histologicamente como malignos e em 25% a 50% dos animais há metástase pulmonar. No presente estudo, 86,5% foram diagnosticados como malignos e 13,5% como benignos. Em estudo realizado em cadelas na Cidade de Marília-SP, das 32 neoplasias analisadas, o carcinoma complexo e carcinoma sólido infiltrativo foram os mais encontrados, sendo que estes apresentaram o pior prognóstico (Hataka 2004).

O diagnóstico precoce e preciso da neoplasia mamária tem considerável importância para o estabelecimento de medidas terapêuticas. No presente estudo, a mastectomia foi o tratamento de escolha realizado em todas as cadelas, entretanto o método e o critério foi individual e levou em consideração o tamanho do tumor, o comprometimento de linfonodos regionais e sentinelas, a metástase à distância e as condições físicas do indivíduo. Neste estudo, a mastectomia unilateral total foi medida terapêutica mais frequente. A mastectomia é indicada em todos os casos, pois a completa remoção cirúrgica na ausência de metástase é o procedimento com melhor prognóstico e probabilidade de cura (Daleck et al. 1998, De Nardi et al. 2007). Stratmann et al. (2008) sugerem que a cadeia mamária deva ser removida por completo

independentemente do número de tumores e do tamanho da lesão. Os autores observaram alta frequência (58%) de novas lesões neoplásicas em tecido mamário remanescente em casos onde foi realizada a mastectomia regional.

CONCLUSÕES

O tipo histológico mais encontrado foi carcinoma complexo, graus I, II e III; Tumores múltiplos foram associados à neoplasia maligna e a neoplasia maligna foi associada à metástase em linfonodos.

Agradecimentos.- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de doutorado e à Fundação Araucária Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná pelo apoio financeiro do projeto 18334 convênio 7/2011 - UEL.

REFERÊNCIAS

- Auclair P.L & Ellis, G.L. 1996. Atypical features in salivary gland mixed tumors: their relationship to malignant transformation. *Mod. Pathol.* 9(6):652-657.
- Bocardo M., Dabus D.M.M., Tentrin T.C., Lima G.S. & Bariani M.H. 2008. Influência hormonal na carcinogênese mamária em cadelas. *Revta Cient. Eletrôn. Med. Vet., São Paulo*, 6(11):1-6.
- Cassali G.D., Lavalle, G.E., De Nardi A.B., Ferreira E., Bertagnolli A.C., Estrela-Lima A., Alessi A.C., Daleck C.R., Salgado B.S., Fernandes C.G., Sobral R.A., Amorim R.L., Gamba C.O., Damasceno K.A., Auler P.A., Magalhães G.M., Silva J.O., Raposo J.B., Ferreira A.M.R., Oliveira L.O., Malm C., Zuccari D.A.P.C., Tanaka N.M., Ribeiro L.R., Campos L.C., Souza C.M., Leite J.S., Soares L.M.C., Cavalcanti M.F., Fonteles Z.G.C., Schuch I.D., Paniago J., Oliveira T.S., Terra E.M., Castanheira T.L.L., Felix A.O.C., Carvalho G.D., Guim T.N., Guim T.N., Garrido E., Fernandes S.C., Maia F.C.L., Dagli M.L.Z., Rocha N.S., Fukumasu H., Grandi F., Machado J.P., Silva S.M.M.S., Bezerril J.E., Frehse M.S., Almeida E.C.P. & Campos C.B. 2011. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Braz. J. Vet. Pathol.* 4:153-180.
- Cavalcanti M.F. & Cassali G.D. 2006. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas: revisão. *Clín. Vet.* 61:56-63.
- Chang S.C., Chag C.C., Chang T.J. & Wong M.L. 2005. Prognostic factors associated with survival two years surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227(10):1625-1629.
- Daleck C.R., Franceschini P.H., Alessi A.C., Santana A.E. & Martins M.I.M. 1998. Aspectos clínico e cirúrgicos do tumor mamário canino. *Cinc Rural* 28(1):95-100.
- De Nardi A.B., Rodaski S., Sousa R.S., Costa T.A., Macedo T.R., Rodigheri S.M., Rios A. & Piekarcz C.H. 2002. Prevalência de neoplasias modalidade de tratamentos em cães, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. *Archs Vet. Sci.* 7(2):15-26.
- De Nardi A.B., Daleck C.R., Laufer Amorim R., Dodaski S., Piekarcz C.H., Magalhães G.M., Calazans S.G., Fernandes S.C., Cesar J.R.F., Castro J.H.T., Silva M.C.V. & Motta F.R. 2007. Correlação da cicloxigenase-2 com o prognóstico dos carcinomas mamários de cadelas. *Acta Scient. Vet.* 35:619-627.
- Egenvall A., Bonnett B.N., Ohagen P., Olson P., Hedhammar A. & Von Euler H. 2005. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prev. Vet. Med.* 69(1-2):109-127.
- Ferreira E., Bertagnolli A.C., Cavalcanti M.F., Schimitt F.C., Cassali G.D. 2009. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology.* 7(4): 230-235.
- Genelhu M.C., Cardoso S.V., Gobbi H. & Cassali G.D. 2007. A comparative study between mixed-type tumors from human salivary and canine mammary glands. *BMC Cancer.* 7:218.
- Goldschmidt M., Peña L., Rasotto R. & Zapulli V. 2011. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet. Pathol.* 48(1):117-131.
- Gómez J.B., Ramírez R. M. & Maldonado E.J. 2012. Presence of lung metastases in bitches affected by malignant neoplasms in Medellín (Colombia). *Revta MVZ Córdoba* 17(2):2983-2990.
- Hataka A. 2004. Citologia aspirativa com agulha fina e histopatologia: valor e significado para o diagnóstico e prognóstico do câncer de mama em cadelas. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, SP. 90p.

- Hellmen E., Bergstrom R., Holmberg L., Spangberg I.B., Hansson K. & Lindgren A. 1993. Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Vet. Pathol.* 30(1):20-27.
- Henderson B.E., Ross R. K., Pike, M.C. & Casagrande J.T. 1982. Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Res.* 42(8):3232-3239.
- Itoh T., Uchida K., Ishikawa K., Kushima K., Kushima E., Tamada H., Moritake T., Nakao H. & Shii H. 2005. Clinicopathological Survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. *J. Vet. Med. Sci.* 67(3):345-347.
- Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E. & Forman D. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 61(2):69-90.
- Karayannopoulou M., Kaldrymidou E., Constantinidis T.C. & Dessiris A. 2005. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *J. Comp. Pathol.* 133(4):246-252.
- Klopfleisch R., Hvid H., Klose P., Da Costa A. & Gruber A.D. 2010. Insulin receptor is expressed in normal canine mammary gland and benign adenomas but decreased in metastatic canine mammary carcinomas similar to human breast cancer. *Vet. Comp. Oncol.* 8(4):293-301.
- Kojima H., Fukazawa Y., Sato T., Enaria M., Matsuzawa A., Tsunodac S., Nagasawa H., Ohtad Y. & Iguchi T. 1996. Apoptosis of pregnancy-dependent mammary tumor and transplantable pregnancy-dependent mammary tumor in mice. *Cancer Lett.* 110(1-2):113-121.
- Kurzman I.D. & Gilbertson S.R. 1986. Prognostic factors in canine mammary tumors. *Semin. Vet. Med. Surg. (Small Anim).* 1(1):25-32.
- Kvale G. 1992. Reproductive factors in breast cancer epidemiology. *Acta Oncol.* 31(2):187-194.
- Lana S.E., Rutteman G.R. & Withrow S.J. 2007. Tumors of the mammary gland, p.619-633. In: Withrow S.J. & Vail D.M. (Eds), *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 4th ed. W.B. Saunders, St Louis. 846p.
- Meuten D. J. 2002. Tumors in Domestic Animals. 4th ed. Iowa State Press, Iowa. 788p.
- Misdorp W. 2002. Tumors of the mammary gland, p.575-606. In: Meuten S.J. (Ed.), *Tumors in Domestic Animals*. 4th ed. Iowa State Press, Iowa.
- Misdorp W., Else R.W., Hellmén E. & Lipscomb E. 1999. Definitions and explanatory notes, p.18-27. In: Ibid. (Eds), *WHO Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat*. Armed Forces Institute of Pathology, Washington. DC.
- Moe L. 2001. Population-based incidence of mammary tumors in some dog breeds. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 57:439-443.
- Mol J.A., Selman P.J., Sprang E.P., Van Neck J.W. & Oosterlaken-Dijksterhuis M.A. 1997. The role of progestins, insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch: a review. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 51:339-344.
- Morrison W.B. 1998. Cancer of the reproductive tract, p.591-598. In: Ibid. (Ed.), *Cancer in Dogs and Cats*. Williams and Wilkins, Pennsylvania.
- Moulton J.E. 1990. Tumors of the mammary gland, p.518-552. In: Ibid. (Ed.), *Tumors in Domestic Animals*. 3rd ed. University of California Press, Los Angeles.
- Muldoon T.G. 1981. Interplay between estradiol and prolactin in the regulation of steroid hormone receptor levels, nature, and functionality in normal mouse mammary tissue. *Endocrinology.* 109(5):1339-1346.
- Norman A.W. & Litwack G. 1997. *Hormones*. 2nd ed. Academic Press, San Diego. 558p.
- Oliveira L.O., Oliveira, R.T., Loretto A.P., Rodrigues R. & Driemeier D. 2003. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta Scient. Vet.* 31:105-110.
- Oliveira Filho J.C., Kommers G.D., Masuda E.K., Marques M.F.P.P., Figuera R.A., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2010. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários de cães. *Pesq. Vet. Bras.* 30(2):177-185.
- Otoni C.C., Rahal S.C., Vulcano L.C., Ribeiro S.M., Hette K., Giordano T., Doiche D.P. & Amorim R.L. 2010. Survey radiography and computerized tomography imaging of the thorax in female dogs with mammary tumors. *Acta Vet. Scand.* 52:1-10.
- Peleteiro M.C. 1994. Tumores mamários na cadela e na gata. *Revta Port. Ciênc. Vet.* 89:10-29.
- Porter P.L. 2009. Câncer de mama em el mundo: revision. *Salud Publica Mex.* 51:s141-146.
- Queiroga F. & Lopes C. 2002. Tumores mamários caninos: novas perspectivas. *Anais Congresso de Ciências Veterinárias, SPVC, Oeiras, PI*, p.183-190.
- Rahal S.C., Hossne W.S. & Teixeira E.M.S. 1995. Uso da fluoresceína na identificação de vasos linfáticos superficiais das glândulas mamárias das cadelas. *Ciênc. Rural.* 25:251-254.
- Russo J., Santucci-Pereira J., Cicco R.L., Sheriff F., Russo P.A., Peri S., Slifker M., Ross E., Mello M.L.S., Vidal B.C., Belitskaya-Lévy I., Arslan A., Zeleniuch-Jacquotte A., Bordas P., Lenner P., Ahman J., Afanasyeva Y.,

- Hallmans G., Toniolo P. & Russo I.H. 2012. Pregnancy-induced chromatin remodeling in the breast of postmenopausal women. *Int. J. Cancer*. 131(5):1059-1070.
- Rutterman G.R. 1990. Hormones and mammary tumor disease in the female dog: an update. *In Vivo*. 4(1):33-40.
- Schneider, R., Dorn, C. R., Taylor, D.O.N. 1969. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *Journal of the National Cancer Institute* .43: 1249-1261.
- Schneider R. 1970. Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer* 26(2):419-426.
- Scowitz M.L., Menezes A.M.B., Gigante D.P. & Tessaro S. 2005. Condutas na prevenção secundária do câncer de mama e fatores associados. *Revta Saúde Pública* 39:340-349.
- Sorenmo K.U. 2003. Canine mammary gland tumors. *Vet. Clin. North Am., Small Anim. Pract.* 33(3):573-596.
- Sorenmo K.U., Kristiansen V.M., Cofone M.A., Shofer, F.S., Breen A.M., Langeland M., Mongil C.M., Grondahl A.M., Teige J. & Goldschmidt M.H. 2009. Canine mammary gland tumors; a histological continuum from benign to malignity: clinical and histopathological evidence. *Vet. Comp. Oncol.* 7(3):162-172.
- Stratmann N., Failing K., Richter A. & Wehrend A. 2008. Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. *Vet. Surg.* 37(1):82-86.
- Withrow S.J. & Vail D.M. 2007. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 4th ed. W.B. Saunders, St Louis. 846p.

3.2 ARTIGO B – EPIDEMIOLOGICAL AND HISTOLOGICAL ASPECTS OF CANINE MAMMARY TUMORS DIAGNOSED AT VETERINARY HOSPITAL/UUEL

EPIDEMIOLOGICAL AND HISTOLOGICAL ASPECTS OF CANINE MAMMARY TUMORS DIAGNOSED AT VETERINARY HOSPITAL/UUEL

Michele Salmon Frehse¹, Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense^{2*}, Giovana Wingeter di Santis², Elisângela Olegário da Silva², Roberta Lemos Freire¹, Marco Antônio Machado³ e Maria Isabel Mello Martins³

¹Department of Preventive Veterinary Medicine - Agricultural Sciences Center – UEL, Londrina, PR, Brazil

²Laboratory of Animal Pathology, Department of Preventive Veterinary Medicine - UEL, Londrina, PR, Brazil

³Department of Clinical Veterinary - Agricultural Sciences Center – UEL, Londrina, PR, Brazil

***Corresponding Author:** Laboratory of Animal Pathology - Department of Preventive Veterinary Medicine – UEL

e-mail: ana.bracarense@pq.cnpq.br

Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445 Km 380 | Campus Universitário
Cx. Postal 10.011 | CEP 86051-970 | Londrina – Paraná, Brasil

OBJECTIVES

This study aims to characterize epidemiological and histopathological data of canine patients with mammary tumors treated at the Veterinary Hospital of Universidade Estadual de Londrina (HV/UUEL), Paraná-Brazil.

MATERIAL AND METHODS

In the year 2010 to 2012, medical records on canine patients with mammary tumors attended at HV/UUEL were reviewed. Epidemiological (age, breed, time of survival), clinical (number of pregnancies, progesterone administration, metastasis, treatment) and pathological (affected glands, histological classification and grading of tumors) data were recorded. Histological classification followed the criteria proposed (6). Data were processed and tabulated with the statistical software for epidemiology EPI INFO 3.5.4. The survival analysis was performed in free software R 2.15.3 using the Kaplan-Meier test.

RESULTS AND DISCUSSION

Seventy-five animals with mean age of 10.1 (\pm 2.4) years were included in this study. The group aged 9 to 11 years corresponded to 44.7% of the cases. Mixed breed dogs had higher frequency 53.3% of the disease, followed by Poodles 33.3%. Regarding reproductive information, 22.7% (17/75) female dogs were previously spayed and 21.3% (16/75) have received progesterone for controlling the estrous cycle.

The tumors were observed more frequently in abdominal mammary glands 69% (49/71) followed by inguinal glands 53.5% (38/71) and thoracic glands 38% (27/71). In 64.8% (46/71) of the animals, multiple glands were affected by tumors. We identified 16% (12/75) cases with regional lymph node metastasis, and 14.7% (11/75) with distant metastases, mainly affecting the lungs.

Histological classification of the tumors revealed that 16% were benign neoplasms, and 84% were malignant neoplasms (59 carcinomas, 3 sarcomas and 1 carcinosarcoma), as shown in Table 1.

Table 1 – Clinical aspects of 75 female dogs with mammary tumors attended from 2010-2012 in the Veterinary Hospital at Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

Histological type	N	Surgery	OSH therapeutic	Surgery + P1	Months Survival Global (mean)
Benign tumors	11	all	Yes all	Yes all	14
Carcinomas <i>in situ</i>	1	all	Yes all	Yes all	15
Carcinomas without metastasis	25	all	Yes all	Yes all	17.89
Carcinomas with aggressive feature without metastasis grade II/III	29	all	Yes all	Yes all	12.16

Carcinomas with metastasis	5	all	Yes all	Yes all	6.37
Sarcomas	3	all	Yes all	Yes all	9.66
Carcinosarcoma	1	all	Yes all	Yes all	13
Total	75				

P1: Protocol 1 (Total unilateral mastectomy + Ovariosalpingohysterectomy)

*The Survival Analyses Curve was not done for each kind of tumor due the low number of samples.

Non-neoplastic cellular changes were not diagnosed. Frequency and grading of mammary tumors are disposed in Table 2.

Table 2- Histological classification, grading and mean survival of 75 female dogs with mammary tumors attended from 2010-2012 in the Veterinary Hospital at Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

Histologic Type	N	ER Pos	PR Pos	MIB-1 Medium Index	COX-2 High Score	Mitosis Medium Index	Months Survival Global (mean)
Benign Mixed Tumor	8	NA	NA	NA	NA	scarce	10.37
Adenoma	1	NA	NA	NA	NA		20
Papilloma	0	NA	NA	NA	NA		0
Fibroadenoma	1	NA	NA	NA	NA		27
Mixoma	1	NA	NA	NA	NA		12
Sarcomas	3	NA	NA	NA	NA		9.66
Comedocarcinoma	1	NA	NA	NA	NA		9
Hemangiopericitoma	1	NA	NA	NA	NA		1
Simple Cribriforme carcinoma	0	NA	NA	NA	NA		0
Simple Cribriforme carcinoma with metastasis	1	NA	NA	NA	NA		20
Cystic papillary Carcinoma	1	NA	NA	NA	NA		23
Tubular Simple Carcinoma grade I	9	NA	NA	NA	NA		14.44
Tubular Simple Carcinoma grade II	10	NA	NA	NA	NA		18.4
Tubular Simple Carcinoma grade III	3	NA	NA	NA	NA		8.66
Carcinoma <i>in situ</i>	1	NA	NA	NA	NA	1	15
Carcinoma into mixed tumor	0	NA	NA	NA	NA		0
Carcinoma into mixed tumor with metastasis	0	NA	NA	NA	NA		0
Complex Carcinoma grade I	11	NA	NA	NA	NA	≤1/until3	23.09
Complex Carcinoma grade II	13	NA	NA	NA	NA		15
Complex Carcinoma with metastasis grade I	1	NA	NA	NA	NA	≤1/until3	1
Complex Carcinoma with metastasis grade II	1	NA	NA	NA	NA		20
Invasive Papillary Carcinoma grade I	2	NA	NA	NA	NA	≤1/until3	16.5
Invasive Papillary Carcinoma grade II	2	NA	NA	NA	NA		17
Invasive Papillary Carcinoma grade I with metastasis	1	NA	NA	NA	NA	≤1	0
Micropapillary Carcinoma	0	NA	NA	NA	NA		0
Micropapillary Carcinoma with metastasis	0	NA	NA	NA	NA		0
Tubular Carcinoma grade III	0	NA	NA	NA	NA		0
Tubular Carcinoma grade III	2	NA	NA	NA	NA	>3	4.5

with metastasis							
Solid Carcinoma	0	NA	NA	NA	NA	NA	0
Solid Carcinoma with metastasis	0	NA	NA	NA	NA	NA	0
Carcinosarcoma	0	NA	NA	NA	NA	NA	0
Carcinosarcoma with metastasis	1	NA	NA	NA	NA	NA	13
Total	75						

NA: Not applicable; ER: Estrogen Receptor; PR: Progesterone Receptor

*The Survival Analyses Curve was not done for each kind of tumor due the low number of samples

The most prevalent malignant tumor was tubular simple carcinoma, and grade II was the most frequent histological grading. Histological analysis of regional lymph nodes was performed in all cases, showing metastasis in 16% of the animals. All animals were submitted to surgical treatment that consisted of total unilateral mastectomy and ovariosalpingohysterectomy. Chemotherapy was not realized.

Survival analysis was performed in 46 female dogs with malignant tumors. Figure 1 exhibits the survival analysis curve for the group with malignant tumors (46 animals). The survival rate for: Tubular simple carcinoma grade I, was 33% at 15 months after surgery [(standard error (SE) = 0.157, 95% CI (0.132 to 0.840)]; Tubular simple carcinoma grade II, 29,6% at 25 months after surgery [(standard error (SE) = 0.164, 95% CI (0.10 to 0.87)]; Tubular simple grade III, 33% at 17 months after surgery [(standard error (SE) = 0.27, 95% CI (0.06 to 1.00)]; Complex carcinoma grade I, 72,9% at 20 months after surgery [(standard error (SE) = 0.13, 95% CI (0.50 to 1.00)] and Complex carcinoma grade II, 58,7% at 22 months after surgery [(standard error (SE) = 0.15, 95% CI (0.34 to 1.00)]. The mortality rate until May 2013 was 47.6% (30/63) for all malignant tumors. Survival was considered from the first one mastectomy, with the average time after removal of tumors was 11.7 months. The small size (≤ 3 cm) accounted for 52.7%, followed by tumors of medium size (4-10cm) 35.5% and large size (>10 cm) represented 11.8%.

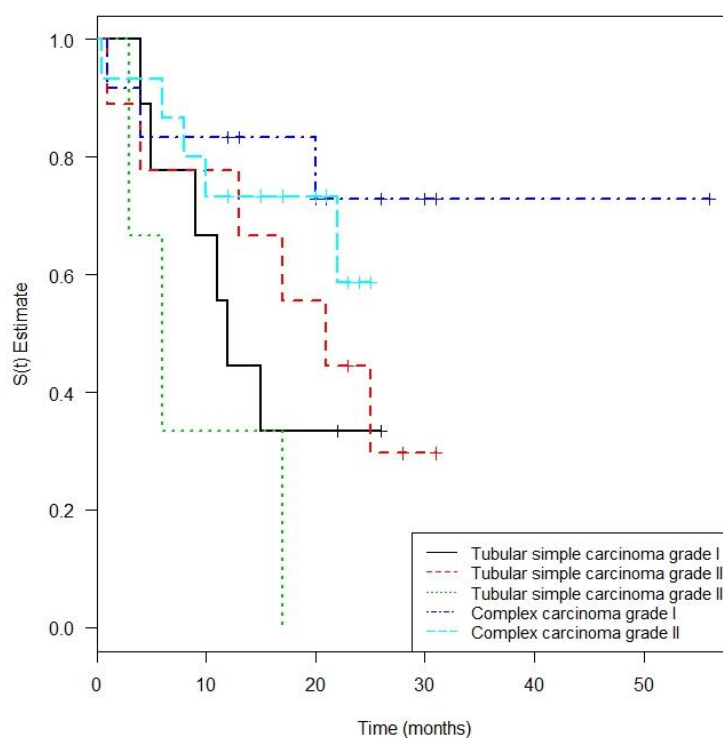


Figure 1. Survival Analyses Curve of 46 female dogs show the most frequent histologic types malignant mammary tumors, attended from 2010-2012 in the Veterinary Hospital at Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil.

Several studies reported that mammary tumors affect middle-aged and older intact or spayed females dogs, which is in accordance with the present study (3,4). In addition, similar results on the average age of affected females was reported in literature (8,2). In this study, Poodle was the most affected breed similarly to data reported in other Brazilian study (9). The risk of developing mammary tumors in spayed females prior to the first heat cycle is 0.5%, showing the protective effect of castration at a young age, as well as hormone-dependent mammary cancer (2). However, as only 22.7% dogs had been castrated prior to mastectomy, such effect could not be observed in the present study. The use of progesterone contraceptives increases the chance of developing

benign mammary tumors. The results found in this study showed that 21.3% patients underwent hormonal treatment, and 16% had benign neoplasms (1).

Concerning the location of tumors, 69% and 53.5% tumors were located in the abdominal and inguinal mammary glands, respectively, similar to previous studies (9). The high incidence of inguinal mammary gland tumors has been associated with an increased amount of parenchyma and hormone receptors (5). In the neoplastic changes, 16% were benign and 84% were malignant, resembling to other studies (4, 9). This high prevalence of malignant mammary tumors may be due to the long period between the onset and clinical evaluation (9). The most prevalent malignant tumor was simple carcinoma, similar to other studies (8,9,7), and grade II was the most frequent histological grading.

CONCLUSION

The epidemiological results observed in this study were similar to data reported in the literature. Interestingly, the survival rates observed tubular carcinoma grade III was worse than compare with others carcinomas. These data reinforces the need to improve the diagnosis and treatment of mammary tumors, considering the histological types, leading patients to a good quality of life.

REFERENCES

1. BOCARDO, M., DABUS, DMM., TENTRIN, TC., LIMA, GS., BARIANI, MH. Influência hormonal na carcinogênese mamária em cadelas. **Rev. Ci. Eletr. Med. Vet.** 2008, 6, 11, 1-6.
2. CASSALI GD.; LAVALLE, GE.; DE NARDI, AB., FERREIRA, E., BERTAGNOLLI, AC., ESTRELA-LIMA, A., ALESSI, AC., DALECK, CR., SALGADO, BS., FERNANDES, CG., SOBRAL, RA., AMORIM, RL., GAMBA, CO., DAMASCENO, KA., AULER, PA., MAGALHÃES, GM., SILVA, JO., RAPOSO, JB., FERREIRA, AMR., OLIVEIRA, LO., MALM, C., ZUCCARI, DAPC., TANAKA, NM., RIBEIRO, LR., CAMPOS, LC., SOUZA, CM., LEITE, JS., SOARES, LMC., CAVALCANTI, MF., FONTELES, ZGC., SCHUCH, ID., PANIAGO, J., OLIVEIRA, TS., TERRA, EM., CASTANHEIRA, TLL., FELIX, AOC., CARVALHO, GD., GUIM, TN., GUIM, TN., GARRIDO, E., FERNANDES, SC., MAIA, FCL., DAGLI, MLZ., ROCHA, NS., FUKUMASU, H., GRANDI, F., MACHADO, JP., SILVA, SMMS., BEZERRIL, JE., FREHSE, MS., ALMEIDA, ECP., CAMPOS, CB. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Braz. J. Vet. Pathol.** 2011, 4, 153-80.
3. DALECK CR., FRANCESCHINI PH., ALESSI AC., SANTANA AE., MARTINS, MIM. Aspectos clínico e cirúrgicos do tumor mamário canino. **Ci. Rural.** 1998, 28, 95-100.
4. DE NARDI, AB.; RODASKI, S.; SOUSA, RS.; COSTA, TA.; MACEDO, TR.; RODIGHIERI, SM.; RIOS, A.; PIEKARZ, CH. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Arch. Vet. Sci.** 2002, 7, 15-26.
5. DONNAY, I.; RAUIS, J.; DEVLEESHIUWER, N.; WOUTERS-BALLMAN, P.; LECLERCQ, G.; VERSTEGEN, J. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. **Am. J. Vet. Res.** 1995, 56, 1188-94.
6. GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and grading of canine mammary tumors. **Vet. Pathol.** 2011, 4, 153-180.
7. GÓMEZ, JB.; RAMÍREZ, RM.; MALDONADO, EJ. Presence of lung metástases in bitches affected by mammary neoplasms in Medellin (Colombia). **Rev. MVZ Cordoba.** 2012, 17, 2,2983-2990.
8. KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, TC.; DESSIRIS, A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. **J. Comp. Pathol.** 2005, 133, 246-52.
9. OLIVEIRA FILHO, JC.; KOMMERS, GD.; MASUDA, EK.; MARQUES, BMFPP.; FIGHERA, RA.; IRIGOYEN, LF.; BARROS, CSL. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesqui. Vet. Bras.** 2010, 30, 177-85.

3.3 ARTIGO C – ESTUDO DE CASO-CONTROLE EM CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA E DETECÇÃO DE MICOTOXINAS EM RAÇÃO

Estudo de caso-controle em cadelas com neoplasia mamária e detecção de micotoxinas em ração

M. S. Frehse¹, M. I. M. Martins,³ E. Y. S. Ono², A. P. F. R. L. Bracarense¹, L. Y. Bissoqui², E. M. K. Teixeira², M. R. Ribeiro¹, D. Horta¹, R. L. Freire^{1*}

¹*Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rodovia Celso Garcia Cid | PR 445 Km 380 | Campus Universitário, Cx. Postal 10.011, Londrina, PR 86.057-970, Brasil. *Autor para correspondência: rffreire@uel.br*

²*Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rodovia Celso Garcia Cid | PR 445 Km 380 | Campus Universitário, Cx. Postal 10.011, Londrina, PR 86.057-970, Brasil.*

³*Departamento de Clínicas Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina (UEL), Rodovia Celso Garcia Cid | PR 445 Km 380 | Campus Universitário, Cx. Postal 10.011, Londrina, PR 86.057-970, Brasil.*

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo de caso-controle em cadelas com neoplasia mamária, avaliar variáveis de interesse e detectar micotoxinas em ração consumida por estes animais. Foram incluídas no estudo 256 cadelas de uma população hospitalar, sendo 85 com neoplasias mamárias (grupo caso) e 171 sem neoplasias mamárias (grupo controle). Foi aplicado questionário epidemiológico nos dois grupos e os dados foram inseridos no pacote estatístico EpiInfo (3.5.4). A castração teve efeito protetor para neoplasia mamária ($p=0,0004$; $OR= 0,32$; $IC95\%= 0,17-0,60$). Foram coletadas 168 amostras de ração e realizada pesquisa de aflatoxinas, fumonisina e zearalenona pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foram detectadas micotoxinas em 100% (79/79) das amostras do grupo caso e em 97,8% (87/89) no grupo controle. Em rações econômicas 100% (72/72) das amostras apresentaram detecção de micotoxinas, nas amostras *premium* 98,4% (62/63) e 92,3% (12/13) nas amostras *superpremium*. Os valores encontrados apresentaram-se baixos, zearalenona média de 38,87 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para o grupo caso e 38,66 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para o grupo controle, para fumonisina média de 184,81 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para o grupo caso e 130,70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para o grupo controle e para aflatoxina total grupo caso 1,32 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e grupo controle 1,16 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A aflatoxina B₁ ($p=0,0356$; $OR=2,74$; $IC95\%=1,13-6,60$), aflatoxina G₁ (AFG₁) ($p=0,00007$; $OR= 4,60$; $IC95\%= 2,16-9,79$), aflatoxina G₂ (AFG₂) ($p=0,0106$; $OR= 9,91$; $IC95\%= 1,21-81,15$), apresentaram significância estatística quanto a presença de neoplasia mamária. Conclui-se que a castração é um fator protetor para neoplasia mamária e que a qualidade da ração ingerida deve ser continuamente monitorada pois, embora em níveis baixos, todos os tipos de ração apresentavam micotoxinas.

Palavras chave: Tumor de mama. Cães. Fatores de risco. Aflatoxinas. Fumonisin. Zearalenona.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze case-control in bitches with mammary tumors, evaluating variables of interest and detect mycotoxins in feed consumed by these animals. The study included 256 female dogs from a hospital population, 85 with mammary tumors (case group) and 171 without mammary tumors (control group). Epidemiological questionnaire was applied in two groups and the data were into EpiInfo statistical package (3.5.4). It was found that castration as a protective factor for breast cancer ($p = 0.0004$, OR = 0.32, 95% CI = 0.17 to 0.60). For study were collected 168 samples of stored and offered foods to dogs. aflatoxins, fumonisin and zearalenone were analysed by the technique of high performance liquid chromatography (HPLC). Mycotoxins were found in 79 samples (100%) in the case group and 87/89 (97.8%) in the control group. All 72 rations from economic type showed detection of mycotoxins. Aflatoxin B₁ ($p=0.0356$, OR = 2.74, 95% CI 1.13 to 6.60), aflatoxin G₁ (AFG₁) ($p=0.00007$, OR = 4.60 , 95% CI = 2 0.16 to 9 , 79) , aflatoxin G₂ (AFG₂) ($p = 0.0106$,OR = 9.91, 95% CI 1.21 to 81.15), statistical significance for the presence of mammary cancer. In all types of feed mycotoxin detected, regardless of the quality thereof.

Keyword: Breast cancer. Dogs. Risk factors. Aflatoxin. Fumonisin. Zearalenone.

1. Introdução

O estudo das neoplasias mamárias em cadelas é um bom modelo para a investigação clínico-patológica, diagnóstica e prognóstica de tumores mamários que acometem a espécie humana (Zuccari et al., 2008). O câncer de mama é definido como doença multifatorial. É a neoplasia mais frequente em cadelas e em mulheres é a principal causa de morte no mundo, apresentando alta taxa de malignidade em ambas as espécies (Jemal et al., 2011; Morrison, 1998; INCA, 2013). Fatores de risco como idade, influência hormonal, nutrição e administração de progestágenos exógenos podem influenciar na transformação neoplásica nas cadelas (Cassali, 2000); em mulheres a baixa paridade, menarca precoce, menopausa tardia, alcoolismo e tabagismo (INCA, 2013).

Segundo Schneider et al.(1969), em cadelas a ovariectomia antes do primeiro cio reduz o risco de desenvolver neoplasias mamárias para 0,05%, após o primeiro cio 8,0%, após o segundo cio 26% e após os 30 meses de idade não há mais o efeito protetor. Aproximadamente 50 a 70% das neoplasias mamárias apresentam classificação histológica maligna, mas, a evolução clínica e a ocorrência de metástase regional e/ou distante pode variar entre os indivíduos (Zuccari et al., 2001).

A dieta balanceada é importante para a qualidade de vida e desenvolvimento dos animais de estimação. Estudos epidemiológicos relatam maior risco de neoplasias mamárias em animais que se apresentaram obesos ao primeiro ano de vida. A alimentação baseada em comida caseira possui teor de gordura insaturada maior quando comparada à dieta comercial e pode estar associada à maior frequência de neoplasias e displasias mamárias (Perez et al., 2000; Rutteman e Kirpensteijn, 2003).

Fontes de proteína vegetal, como o milho, estão presentes em todos os tipos de ração e são ingredientes potenciais para contaminação por micotoxinas (Carciofi et al., 2006 ; Twomey et al., 2002). No Brasil e outros países tropicais as fumonisinas, zearalenona e aflatoxinas são micotoxinas de grande importância, uma vez que podem ter efeitos tóxicos e carcinogênicos, além de prejuízos econômicos na cadeia de produção.

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo de caso-controle em cadelas com neoplasia mamária, avaliar variáveis de interesse e detectar a presença de micotoxinas em ração de consumo destes animais.

2. Material e Métodos

Este estudo foi registrado e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais institucional nº13/10.

2.1. Seleção dos casos e controles

Este estudo foi realizado em um Hospital Veterinário Escola no período de outubro de 2010 a outubro de 2012. Foram incluídas 256 cadelas no estudo, considerando 1 caso para 2 controles, $\alpha = 5\%$ e $\beta = 80\%$. Foram utilizadas 85 cadelas com neoplasia mamária (grupo caso) atendidas no setor de Teriogenologia de Animais de Companhia (TAC) e 171 cadelas que não apresentavam alteração em glândula mamária (grupo controle) atendidas nos setores de Clínica Médica, Cirúrgica de Animais de Companhia e TAC. Os animais do grupo controle foram pareados de acordo com a idade dos animais do grupo caso.

Foi confeccionado questionário epidemiológico contendo variáveis relacionadas ao ambiente, à alimentação e à reprodução. Os mesmos foram aplicados a todos os proprietários que autorizaram a pesquisa por meio do termo de consentimento livre e esclarecido, nas dependências do Hospital ou nas residências.

2.2. Diagnóstico histopatológico

Após o procedimento cirúrgico de mastectomia unilateral total e ovariectomia, as cadeias mamárias foram encaminhadas ao Laboratório de Anatomia Patológica Veterinária para a análise histopatológica. A classificação histológica das mamas foi realizada de acordo com Goldschmidt et al. (2011).

2.3. Amostras de ração

Foram analisadas 168 amostras de ração comercial destinada à alimentação das cadelas no estudo. Foram coletadas 79 amostras de ração das cadelas do grupo caso e 89 do grupo controle. As rações foram classificadas quanto à qualidade em: econômica, *premium* e *superpremium*, de acordo com as informações declaradas pelo fabricante no rótulo do produto, observando os níveis de proteína bruta, extrato etéreo, fibra bruta e matéria mineral, de acordo com Carciofi et al. (2009). As amostras de ração foram coletadas logo após a realização do questionário epidemiológico. Cada proprietário forneceu 300g de ração do recipiente no qual a armazenava. As amostras foram pesadas e acondicionadas em sacos de papel tipo "kraft" duplo, identificadas, datadas e armazenadas a 4°C por até 24 horas.

2.4. Determinação de micotoxinas pela técnica de CLAE

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de análise cromatográfica. Para a determinação de aflatoxinas, fumonisina e zearalenona (ZEA), 200g de cada amostra foi triturada a uma granulometria de 50 mesh e estocada a -20°C até o momento da análise.

2.4.1 Determinação de Fumonisinas

A determinação de fumonisinas foi realizada por CLAE segundo o método de Shephard et al. (1990) modificado por Ueno et al. (1993). Os limites de detecção (LD) para fumonisina B1 (FB₁) e para fumonisina B2 (FB₂) foram 27,5 µg/kg e 35,3 µg.kg, respectivamente, definido como a concentração mínima de toxina que pode gerar um pico cromatográfico 3 vezes acima da razão altura/ruído da linha de base.

2.4.2 Determinação de Zearalenona

Para a determinação de ZEA foi utilizado CLAE segundo método de Sabater-Vilar et al. (2007) adaptado, com LD de 3,95 µg/kg.

2.4.3 Determinação de Aflatoxinas

A determinação de aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ foi realizada por CLAE de acordo com Miyamoto et al. (2008), com LD de 0,128 µg.kg, 0,027 µg.kg, 0,593 µg.kg e 0,222 µg.kg, respectivamente.

2.5. Análise estatística

Foi utilizado o programa estatístico EPI INFO 3.5.4 para a tabulação dos dados obtidos, cálculos de frequência relativa e tabulação das variáveis de interesse. Foram aplicados os testes estatísticos de qui-quadrado ou exato de Fisher, com nível de significância de 5%. Utilizou-se o cálculo de *Odds Ratio* como medida de associação, com intervalo de confiança de 95%.

3. Resultados

3.1. Variáveis ambientais e reprodutivas

Oitenta e cinco animais do (grupo caso) e 171 do (grupo controle) foram avaliados no período em estudo. Todos os animais do grupo caso foram provenientes do estado do Paraná: 76,5% (65/85) da cidade de Londrina e 23,5% (20/85) da região metropolitana de Londrina; para o grupo controle 98,8% das cadelas foram provenientes do estado do Paraná: 72,5% (124/171) da cidade de Londrina, 33,9% (58/171) da região metropolitana de Londrina, 4% (7/171) de outros municípios do Estado do Paraná e 1,2% (2/171) provenientes de Jales, SP, conforme Figura 1.

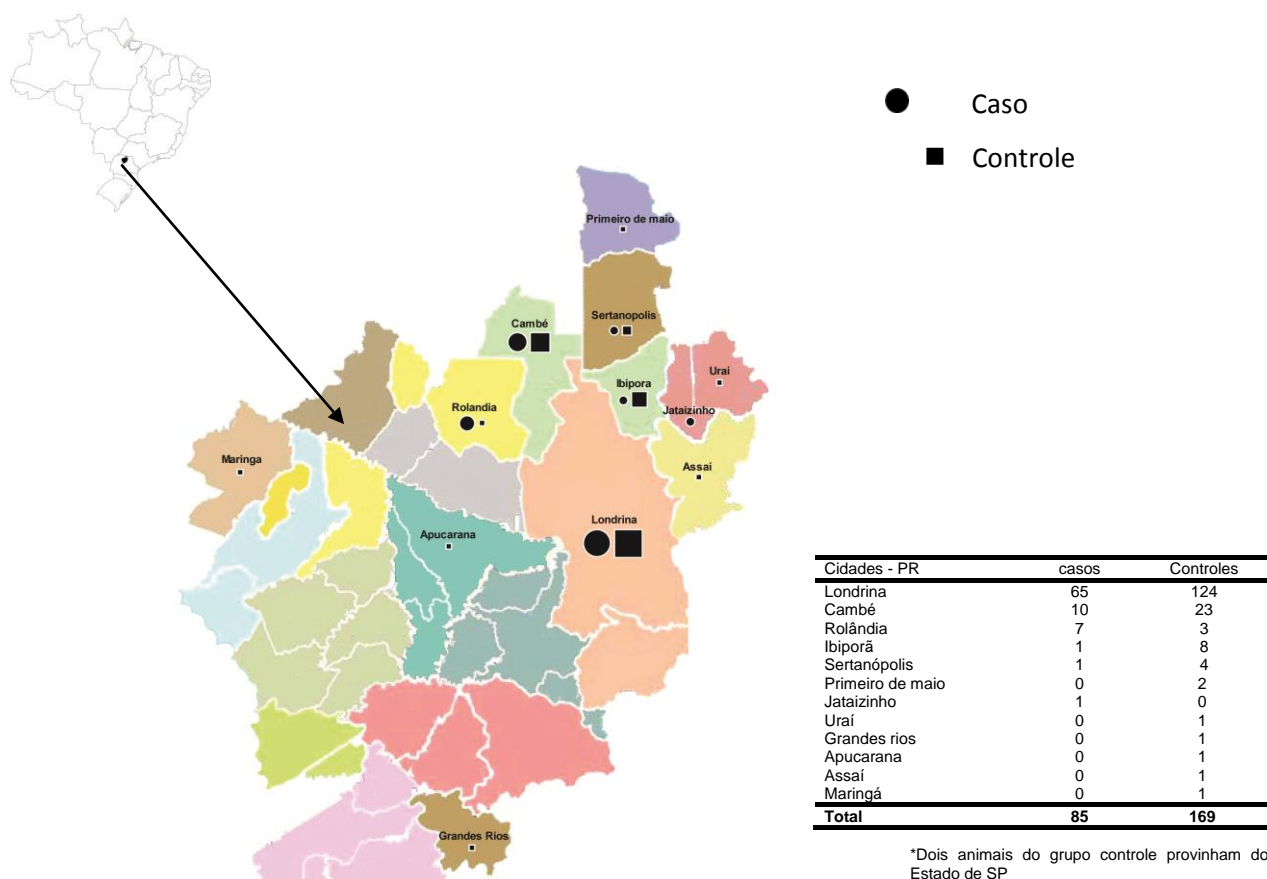


Fig. 1. Distribuição geográfica das cadelas estudadas no estudo de caso controle de neoplasias mamárias na região de Londrina, PR de outubro de 2010 a outubro de 2012.

A frequência das raças para o grupo caso foram: Poodle 33,3% (15/45), Pinscher 13,3% (6/45), Teckel e Cocker Spaniel 11,1% (5/45); e a frequência das raças para grupo controle foram: Poodle 20% (17/85), Boxer 11,8% (10/85), Pinscher 10,6% (9/85) Teckel e Cocker Spaniel 9,4% (8/85). A raça Poodle foi a mais frequente nos dois grupos, porém não houve diferença significativa ($p=0,0931$) em relação à presença de neoplasia mamária. A idade média dos animais para o grupo caso foi 10,11($\pm 2,43$ anos) e de 8,44 ($\pm 2,58$ anos) para o grupo controle.

Os resultados da análise das variáveis ambientais e reprodutivas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 Resultado de variáveis ambientais e reprodutivas em estudo de caso-controle de tumor mamário em 256 cadelas de uma população hospitalar, Londrina, PR, 2010-2012.

Variáveis	Expostos/Caso (%)	Expostos/Controle (%)	Valor de <i>p</i>	OR (IC 95%)
Raça				
Sim	45/85 (52,9)	85/170 (50,0)	0,7565	0,88 (0,52-1,49)
Não	40/85 (47,1)	85/170 (50,0)		
Idade (anos)				
Média (desvio padrão)	10,11 (± 2,43)	8,44 (±2,58)	-	-
Mediana	10	8		
Amplitude	3-18	3-16		
Onde Habita				
Área urbana	82/85 (96,5)	167/171 (97,7)	0,6884*	0,65 (0,14-2,99)
Área rural	3/85 (3,5)	4/171 (2,3)		
Área agrícola				
Sim	2/83 (2,4)	7/171 (4,1)	0,7221*	0,57 (0,11-2,84)
Não	81/83 (97,6)	164/171 (95,9)		
Vive próximo a Indústria				
Sim	22/85 (25,9)	30/169 (17,8)	0,1768	1,61 (0,86-3,02)
Não	63/85 (74,1)	139/169 (82,2)		
Fumante na casa				
Sim	21/84 (25,0%)	41/166 (24,7)	0,9180	1,01 (0,55-1,86)
Não	63/84 (75,0%)	125/166 (75,3)		
Tumor de mama na família				
Sim	19/85 (22,4)	34/170 (20,0)	0,7849	1,15 (0,61-2,17)
Não	66/85 (77,6)	136/170 (80,0)		
Outros animais na casa				
Sim	60/85 (70,6)	127/171 (74,3)	0,6344	0,83 (0,46-1,48)
Não	25/85 (29,4)	44/171 (25,7)		
Castração				
Sim	17/84 (20,2)	73/167 (43,7)	0,0004	0,32 (0,17-0,60)
Não	67/84 (79,8)	94/167 (56,3)		
Quando castrou				
Até o segundo cio	0/17 (0)	14/69 (20,3)	0,0621	0 (0-1,32)
Após o segundo cio	17/17 (100)	55/69 (79,7)		
Administração de contraceptivo				
Sim	16/84 (19,0)	30/169 (17,8)	0,9372	1,09 (0,55-2,13)
Não	68/84 (81,0)	139/169 (82,2)		
Frequência administração de contraceptivo				
Uma vez	3/15 (20,0)	9/25 (36,0)	0,5272	-
Duas vezes	3/15 (20,0)	5/25 (20,0)		
Três ou mais vezes	9/15 (60,0)	11/25 (44,0)		
Gestação				
Sim	34/83 (41,0)	73/168 (43,4)	0,8107	0,90 (0,52-1,53)
Não	49/83 (59,0)	95/168 (56,5)		
Quantas vezes teve cria				
≤ três	26/30 (86,7)	63/70 (90,0)	0,7293*	0,72 (0,19-2,67)
≥ quatro	4/30 (13,3)	7/70 (10,0)		

*Teste exato de Fischer (bicaudal).

A variação no número total de casos e controles deve-se à ausência de resposta dos entrevistados.

3.2 Aspectos histopatológicos

A classificação histológica dos tumores resultou em 64 (85,3%) tumores malignos e 11 (14,7%) benignos. O tipo histológico maligno mais freqüente foi o carcinoma simples (grau I a III) 29/75 (38,7%) seguido de carcinoma complexo (grau I a III) 28/75 (37,3%), sendo o tumor misto benigno 8/75 (10,7%) o mais freqüente dentre os benignos.

3.3 Variáveis relacionadas à alimentação

Quanto as variáveis relacionadas à alimentação, os resultados das análises estão demonstrados na Tabela 2.

Foram coletadas e analisadas 168 amostras de ração para cães de 17 empresas fabricantes, sendo 49 marcas distintas. Em todas as marcas observou-se a presença de milho em sua composição. Nem todos os proprietários souberam informar a marca da ração no momento da coleta da amostra.

Tabela 2 Resultado de variáveis relacionadas à alimentação em estudo de Caso-Controlle de tumor mamário em 256 cadelas de uma população hospitalar, Londrina, PR, 2010-2012.

Variáveis	Expostos/Casos (%)	Expostos/Controles (%)	Valor de p	OR (IC 95%)
Alimentação				
Comida Caseira	1/85 (1,2)	4/170 (2,3)	0,3365	-
Ração	35/85 (41,2)	55/170 (32,3)		
Comida caseira + ração	49/85 (57,6)	111/170 (65,3)		
Tempo que come ração				
Desde filhote	68/84 (81)	123/164 (75)	0,0749	-
Adulto	9/84 (10,7)	9/164 (5,5)		
Outro	7/84 (8,3)	32/164 (19,5)		
Onde compra ração				
Supermercado	20/82 (24,4)	26/163 (16,0)	0,2259	-
Casa Agropecuária	17/82 (20,7)	44/163 (27,0)		
Pet shop	45/82 (54,9)	93/163 (57,1)		
Compra a granel/fracionado				
Sim	21/84 (25)	50/166 (30,1)	0,2227	0,68 (0,39-1,18)
Não	57/84 (67,9)	98/166 (59)		
Frequência compra ração				
Semanal	13/82 (15,9)	35/165 (21,2)	0,6588	-
Quinzenal	20/82 (24,4)	41/165 (24,8)		
Mensal	32/82 (39)	53/165 (32,1)		
Outro	17/82 (20,7)	36/165 (21,8)		
Pacote ração armazenado aberto				
Sim	22/82 (26,8)	26/162 (16)	0,0671	1,91 (1,00-3,65)
Não	60/82 (73,2)	136/162 (84)		
Local de armazenagem coberto				
Sim	83/84 (98,8)	166/167 (99,4)	1,00*	0,50 (0,03-8,09)
Não	1/84 (1,2)	1/167 (0,6)		
Local de armazenagem é úmido				
Sim	18/84 (21,4)	35/165 (21,2)		1,01

Não	66/84 (78,6)	130/165 (78,8)	0,9010	(0,53-1,92)
Classificação				
Econômica	42/72 (58,3)	64/140 (45,7)		-
Premium	26/72 (36,1)	59/140 (42,1)	0,1334	
Superpremium	4/72 (5,6)	17/140 (12,1)		

*Teste exato de Fischer (bicaudal)

3.4 Detecção de micotoxinas

Em 100% (79/79) das amostras do grupo caso detectou-se alguma micotoxina, o mesmo ocorreu em 97,8% (87/89) das amostras do grupo controle.

Foram classificadas 148 amostras de ração dos grupos caso e controle quanto a qualidade: econômica 48,64% (72/148), *premium* 42,56% (63/148) e *superpremium* 8,78% (13/148). Em todas as categorias de ração foi detectada a presença de micotoxinas. Nas rações do tipo econômica 100% (72/72) apresentaram micotoxinas, já para rações do tipo *premium* 98,4% (62/63) e *superpremium* 92,3% (12/13), porém não houve diferença estatística ($p=0,0849$). As aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$) foram detectadas em 83,1% (123/148) das amostras, sendo 84,7% (61/72) em rações do tipo econômica, 84,1% (53/63) nas rações *premium* e 69,2% (9/13) nas *superpremium*. As fumonisinas foram detectadas em 70,9% (105/148) das amostras, 77,8% (56/72) em rações econômicas, 71,4% (45/63) *premium* e 30,8% (4/13) *superpremium*. Zearalenona foi detectada em 95,3% (141/148) das amostras, 93,1% (67/72) nas do tipo econômicas, 98,4% (62/63) nas rações *premium* e 92,3% (12/13) nas *superpremium*.

Na tabela 3 são apresentados os dados de frequência relativa e concentração ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de zearalenona, fumonisinas (FB_1+FB_2) e aflatoxinas.

Tabela 3 Frequência relativa e concentração de zearalenona, fumonisinas (FB_1+FB_2) e aflatoxinas, pela técnica de CLAE, em rações de 168 cadelas em estudo de caso-controle de neoplasia mamária, Londrina, PR, 2010-2012.

Micotoxinas ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Caso	Controle	Valor p	OR (IC 95%)
Zearalenona				
Sim	93,7% (74/79)	96,6% (86/89)	0,2959	0,51 (0,11-2,23)
Não	6,3% (5/79)	3,4% (3/89)		
Média(desvio padrão)	38,87 ($\pm 59,38$)	38,66 ($\pm 40,68$)	0,3226*	
Mediana	23,20	26,47		
Amplitude	(4,07-442,25)	(4,45-208,91)		
Fumonisina				
Sim	78,5% (62/79)	67,4% (60/89)	0,1521	1,76 (0,87-3,53)
Não	21,5% (17/79)	32,6% (29/89)		
Média (desvio padrão)	184,81 ($\pm 170,00$)	130,70 ($\pm 113,45$)	0,0212*	
Mediana	150,00	99,37		
Amplitude	(30,00-1014,72)	(0,09-503,02)		
Aflatoxina Total				
Sim	89,9% (71/79)	77,5% (69/89)	0,052	2,57 (1,06-6,22)
Não	10,1% (8/79)	22,5% (20/89)		

Média (desvio padrão)	1,32 (\pm 1,13)	1,16 (\pm 0,64)	0,7014*	
Mediana	1,15	1,37		
Amplitude	(0,16-6,16)	(0,19-3,36)		
Aflatoxina B1				
Sim	89,9% (71/79)	76,4% (68/98)	0,0356	2,74 (1,13-6,60)
Não	10,1% (8/79)	23,6% (21/89)		
Média (desvio padrão)	1,01 (\pm 0,97)	1,03 (\pm 0,59)	0,1481*	
Mediana	0,67	1,37		
Amplitude	(0,16-4,99)	(0,19-2,08)		
Aflatoxina G1				
Sim	41,8% (33/79)	13,5% (12/89)	0,00007	4,60 (2,16-9,79)
Não	58,2% (46/79)	86,6% (77/89)		
Média (desvio padrão)	0,53 (\pm 0,24)	0,52 (\pm 0,29)	0,3731*	
Mediana	0,44	0,43		
Amplitude	(0,39-1,46)	(0,38-1,5)		
Aflatoxina B2				
Sim	6,3% (5/79)	1,1% (1/89)	0,0800	5,94 (0,67-52,03)
Não	93,7% (74/79)	98,9% (88/89)		
Média (desvio padrão)	0,37 (\pm 0,15)	1,84 (\pm 0,00)	0,1432*	
Mediana	0,27	1,84		
Amplitude	(0,25-0,61)	(1,84-1,84)		
Aflatoxina G2				
Sim	10,1% (8/79)	1,1% (1/89)	0,0106	9,91 (1,21-81,15)
Não	89,9% (71/79)	98,9% (88/89)		
Média (desvio padrão)	0,41 (\pm 0,34)	1,63 (\pm 0,00)	0,1213*	
Mediana	0,28	1,63		
Amplitude	(0,24-1,25)	(1,63-1,63)		

* Kruskal-Wallis

4. Discussão

O diagnóstico histopatológico das neoplasias mamárias evidenciou que a maioria dos tumores eram malignos, similar a outros estudos nacionais e internacionais (Queiroga; Lopes, 2002; Hataka, 2004; Oliveira Filho et al, 2010; Gómez et al, 2012).

Aproximadamente 50% dos animais de ambos os grupos não apresentavam raça definida. As raças de pequeno porte foram mais frequentes tanto no grupo caso quanto no grupo controle, provavelmente devido à característica da população canina atendida no hospital escola. Estudo realizado em cadelas com neoplasia mamária no Japão comparou a ocorrência desta doença entre todas as raças avaliadas e verificou que aquelas de pequeno porte foram as mais atingidas (Itoh et al., 2005). No Brasil, Oliveira Filho et al. (2010), também verificaram maior ocorrência em raças de pequeno porte, sendo que a raça Poodle representou 23,7% (180/759) do total de cadelas com tumor de mama. Resultado semelhante foi relatado na Colômbia (n=30) onde, em cadelas com idade média de 10,87 (\pm 2,65 anos), a raça poodle mostrou-se a mais acometida (46,6%) (Gómez et al., 2012).

Estudos demonstram que a maioria dos tumores mamários se desenvolve em cadelas com idade entre oito e 10 anos (Schneider, 1970; Hellmen et al., 1993; Queiroga e Lopes, 2002; Chang et al., 2005; Cassali et al., 2011). A idade média das fêmeas acometidas foi semelhante à relatada em outros estudos nacionais e internacionais (Karayannopoulou et al., 2005; Cassali et al., 2011; Ezerskyte et al., 2011). Os animais de pequeno porte tem maior contato com os seus proprietários, o que facilita a percepção do aparecimento de nódulos mamários e o diagnóstico e tratamento mais precoce.

Segundo Rutteman e Kirpensteijn (2003) as neoplasias mamárias são hormônio dependentes. No presente estudo, a castração prévia à mastectomia representou apenas 20,2% (17/84) dos animais do grupo caso. A castração mostrou ter efeito protetor ($p=0,0004$, $OR= 0,32$, $IC95\%=0,17-0,60$) para tumor de mama.. a castração precoce quando realizada antes do primeiro cio diminui a incidência de neoplasias mamárias para 0,05%; aumentando o risco em cadelas castradas após o primeiro estro em 8% e após o segundo estro em 26% (Schneider et al, 1969; Rutteman et al., 2001). O efeito protetor conferido pela OSH desaparece ou atua de forma moderada, quando realizada após dois anos e meio de idade (Fonseca e Daleck, 2000; Sorenmo et al., 2000; Rutteman e Kirpensteijn, 2003). No presente estudo, a castração realizada antes do segundo cio não demonstrou efeito protetor ($p=0,0621$).

A administração de progestágenos é considerado um fator de risco para neoplasias mamárias em cadelas, porém tal associação não foi verificada no presente estudo ($p=0,9372$) Doses elevadas de progesterona de longa ação provocam o aumento dos alvéolos e lóbulos, proporcionando principalmente o aparecimento das neoplasias benignas (Tamada et al., 2003). A utilização de progesterona por tempo prolongado está associado ao aumento no número de casos de hiperplasia e neoplasias benignas de mama, enquanto que a administração de progestinas e estrógeno, está associado à ocorrência de neoplasias malignas (Misdorp, 2002). No presente estudo, todos os proprietários informaram que o intuito da aplicação do contraceptivo foi evitar a prenhez e que desconheciam a informação sobre o método cirúrgico de OSH e seus benefícios, se realizada precocemente.

Na espécie humana a gravidez precoce e a multiparidade são fatores que reduzem o risco de desenvolvimento de neoplasia mamária na menopausa. Em cadelas, não há estudos que apontem a gestação como efeito protetor para a neoplasia mamária e no presente estudo também não foi demonstrada esta relação ($p=0,8107$). Russo et al. (2012), estudaram mulheres com idade entre 50 e 69 anos na menopausa, com o objetivo de avaliar diferenças morfológicas e no padrão de expressão dos genes no tecido mamário de nulíparas e múltíparas. Os autores concluíram que nas mulheres que tiveram filhos a quantidade de núcleos com a cromatina mais condensada foi maior, o que sugere uma modificação epigenética intensa nessas células, permanecendo até a menopausa. Após a gravidez a mama adquire um perfil genômico e fenotípico diferente, o que favorece a proteção contra o cancer na mulher.

A alimentação foi um outro fator estudado e a maioria dos animais deste estudo alimentava-se de ração acrescida de comida caseira. A nutrição à base de ração e limentos com alto teor de gordura pode estar relacionado às neoplasias mamárias; no entanto depende do tipo ou quantidade de gordura ingerida (Perez et al., 1998; Greenwald, 1999). Em mulheres, estudos epidemiológicos sugerem a associação de dieta rica em gordura, principalmente a saturada, a um maior risco de

se desenvolver câncer de mama; em países desenvolvidos e principalmente no ocidente, onde o consumo de alimentos ricos em gordura é alto (INCA, 2013). Estudo de caso-controle realizado em mulheres com neoplasia mamária na Paraíba apontou a ingestão de carne vermelha como fator de risco e o consumo de frutas, sucos, feijão, leite e derivados apresentou uma forte associação com a redução no risco de câncer de mama (Lima et al., 2008).

A qualidade das rações secas para cães e gatos, comercializadas no Brasil, é considerada boa sob o ponto de vista nutricional e sanitário (Carpim e Oliveira, 2009). No presente estudo constatou-se que 98,6% das 168 amostras de ração canina avaliadas, independente da classificação de qualidade, estavam contaminadas com micotoxinas. O limite máximo de tolerância (LMT) previstos na legislação para aflatoxinas totais em milho grão e sub-produtos é o mesmo valor estabelecido no Brasil para consumo humano: 20 µg/kg de aflatoxinas totais. (BRASIL, 2002). A ABINPET (2013) recomenda limites para o produto acabado nos valores de: aflatoxinas totais 20 µg/kg, fumonisina (B₁+B₂) 4000 µg/kg e zearalenona 1 µg/kg; porém não há legislação para fumonisina e zearalenona. Nos Estados Unidos e Canadá, o nível máximo tolerado de aflatoxinas totais para ração animal é de 20 µg/kg e na Europa o nível máximo para AFB₁ para qualquer ração animal é de 20 µg/kg. No entanto deve-se atentar para a contaminação da ração com vários tipos de micotoxinas e seus efeitos crônicos em cães.

Estudos experimentais realizados por Gajecka et al. (2007, 2008a, 2008b) mostraram degeneração e atrofia dos ovários, endométrio, miométrio, edema e hemorragia no útero das cadelas pré-pubescentes que foram alimentadas com dieta acrescida de ZEA nas doses de 50 µg/Kg e 75 µg/Kg. Geralmente em estudos experimentais são utilizadas doses elevadas de micotoxinas para avaliar os efeitos tóxicos, o que difere da ingestão em menor quantidade por tempo mais prolongado.

A AFB₁ é altamente reativa e é considerada o principal metabólito genotóxico, induzindo mutações devido a fixação ao DNA. As mutações mais estudadas associadas à AFB₁ envolvem o gene supressor do crescimento p53 e o protooncogene ras (EATON e GALLAGHER, 1994). Em relação aos efeitos genotóxicos e mutagênicos dos demais metabólitos, os estudos experimentais são limitados (AFSSA, 2009). A maioria dos estudos epidemiológicos demonstram uma tendência de correlação entre a exposição crônica à ingestão de aflatoxina e a prevalência de câncer hepático primário (BEASLEY et al 1981; STOLOFF, 1987) . No entanto, esta relação é modulada por outros fatores como a infecção pelo vírus da hepatite B (BEASLEY et al 1981). Não há dados a respeito da associação entre aflatoxinas e neoplasias mamárias em mulheres e animais.

No presente estudo a aflatoxina B₁ foi detectada em 89,9 % amostras de ração do grupo caso e em 76,4% do grupo controle. A aflatoxina é considerada como um dos mais potentes carcinógenos de origem natural, possui efeitos oncogênicos, imunossupressivos, hepatotóxicos, nefrotóxicos e anti coagulante, são as mais abundantes e tóxicas dentre os análogos. Estudo internacional aponta similaridade ao presente estudo em relação a aflatoxina B₁ (SHARMA e MÁRQUEZ, 2001).

Neste estudo de caso-controle, foi verificada associação entre a presença de aflatoxinas na ração e tumor de mama: aflatoxina B₁ (p=0,0356), aflatoxina G₁ (p=0,00007) e aflatoxina G₂ (p=0,0106); sugerindo que a exposição a estas micotoxinas pode levar ao desenvolvimento de neoplasias. Apesar da baixa quantidade de micotoxinas detectadas, deve-se levar em consideração o efeito acumulativo devido ao tempo de exposição e a coocorrência. Para confirmar tais achados fazem-se necessários estudos epidemiológicos prospectivos. Na Áustria

foram analisadas a co-ocorrência de micotoxinas em 76 amostras de ração de cães, constatou-se em 83% desoxinivalenol, 47% zearalenona, 42% fumonisina e 5% ocratoxina A e a co-ocorrência de duas ou mais micotoxinas variou de 3 a 47% das amostras (BOHM et al, 2010).

5. Conclusão

Com base nos resultados obtidos conclui-se que a castração é um fator protetor para neoplasia mamária. A qualidade da ração ingerida deve ser monitorada, pois em todos os tipos de ração foi detectada a presença de micotoxinas, mesmo que em baixas doses. A significância estatística para as aflatoxinas B₁, G₁ e G₂ em relação à presença de neoplasia mamária, sugere uma possível associação

Referências

Agence Française de Sécurité Sanitaire Des Aliements (AFSSA), 2009. Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale.

Associação Brasileira da Indústria de Produtos Para Animais de Estimação - ABINPET. 2013. Manual Pet Food Brasil. 7. ed. Disponível em: <<http://www.mflip.com.br/pub/abinpet/index.jsp>>. (acesso 30.10.2013).

Beasley, R.P.; Hwang, L.Y.; Lin, C.C.; Chien, C.S., 1981. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: a prospective study of 22.707 men in Taiwan. *Lancet*, 2: 1129-33.

Bissoqui, L.Y. 2012. Avaliação do risco de exposição de cães à contaminação natural por micotoxinas. 93f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR.

Bohn, J., Koinig, L., Razzazi-Fazeli, E., Blajet-Kosicka, A., Twaruzek, M., Grajewski, J., Lang, C., 2010. Survey and risk assessment of the mycotoxins deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins, ochratoxin A, and aflatoxins in commercial dry dog food. *Mycotox Res.* 26, 147-153.

Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº8, de 11 de outubro de 2002. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2002. Seção 2, p.1-6.

Burini, C.H.P. 2002. Caracterização clínica, citopatológica e bioquímica do câncer mamário de cadelas sem raça definida. 164p. Dissertação (Mestrado Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP.

Carciofi, A.C., Vasconcellos, R.S., Borges, N.C., Moro, J.V., Prada, F., Fraga, V.O. 2006. Composição Nutricional e avaliação de rótulo de rações secas para cães

- comercializadas em Jaboticabal-SP. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 58, 421-426.
- Carciofi, A.C., Teshima, E., Bazolli, R.S., Brunetto, M.A., Vasconcellos, R.S., Pereira, G.T., Oliveira, L.D. 2009. Qualidade e digestibilidade de alimentos comerciais de diferentes segmentos de mercado para cães adultos. *Revista Brasileira Saúde e Produção Animal*, 10, 489-500.
- Carpim, W. G., Oliveira, M. C. 2009. Qualidade nutricional de rações secas para cães adultos comercializadas em Rio Verde-GO. *Revista Biotemas* 22, 181-186.
- Cassali, G.D. 2000. Estudos morfológicos, imuno-histoquímico e citométrico de tumores de cadela - Aspectos comparativos com neoplasias da mama humana. 80f. Belo Horizonte. Tese Doutorado – Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG.
- Cassali G.D., Lavallo, G.E., De Nardi, A.B., Ferreira, E., Bertagnolli, A.C., Estrela-Lima, A., Alessi, A.C., Daleck, C.R., Salgado, B.S., Fernandes, C.G., Sobral, R.A., Amorim, R.L., Gamba, C.O., Damasceno, K.A., Auler, P.A., Magalhães, G.M., Silva, J.O., Raposo, J.B., Ferreira, A.M.R., Oliveira, L.O., Malm, C., Zuccari, D.A.P.C., Tanaka, N.M., Ribeiro, L.R., Campos, L.C., Souza, C.M., Leite, J.S., SOARES, L.M.C., Cavalcanti, M.F., Fonteles, Z.G.C., Schuch, I.D., Paniago, J., Oliveira, T.S., Terra, E.M., Castanheira, T.L.L., Felix, A.O.C., Carvalho, G.D., Guim, T.N., Guim, T.N., Garrido, E., Fernandes, S.C., Maia, F.C.L., Dagli, M.L.Z., Rocha, N.S., Fukumasu, H., Grandi, F., Machado, J.P., Silva, S.M.M.S., Bezerril, J.E., Frehse, M.S., Almeida, E.C.P., Campos, C.B. 2011. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 4, 153-180.
- Chang, S.C., Chag, C.C., Chang, T.J., Wong, M.L. 2005. Prognostic factors associated with survival two years surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). *Journal of American Veterinary Medical Association*. 227, 1625-1629.
- Cowell, R.L., Tyler, R.D., Meinkoth, J.H. 1999. *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat*. 2nd ed. Mosby, St Louis.
- Eaton, D.L., Gallagher, E.P. 1994. Mechanisms of Aflatoxin Carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 34, 135-172.
- Ezerskyte, A., Zamokas, G., Grigonis, A., Juodziukyniene, N. 2011. The retrospective analysis of mammary tumors in dogs. *Medicina Veterinária e Zootecnia*. 53,3-8.
- Fonseca, C.S., Daleck, C.R. 2000. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovariectomia como terapia adjuvante. *Ciência Rural*, 30, 731-735.
- Gajecka, M., Janowski, T., Jakimiuk, E., Polak, M., Podhalez-Dziegielewska, M., Rotkiewicz, T., Otrócka-Domagala, I., Obremski, K., Zielonka, L., Gajecki, M. 2007. Histopathological and immunohistochemical examinations, and changes in proliferation activity of the uterus in bitches following zearalenone micotoxicosis. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 10, 141-151.

- Gajecka, M., Obremski, K., Jakimiuk, E., Skorska-Wyszynska, E., Zielonka, L., Gajecki, M. 2008a. Histopathological examination of ovaries in bitches after experimental zearalenone mycotoxicosis. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 11, 363-366.
- Gajecka, M., Przybylska-Gornowick, B., Obremski, K., Polak, M., Jakimiuk, E., Skorska-Wyszynska, E., Zielonka, L., Gajecki, M. 2008b. Ultrastructural changes of ovarian follicle and corpus luteum after experimental zearalenone mycotoxicosis in bitch. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 11, 327-337.
- Goldschmidt, M., Pena, L., Rasotto, R., Zappulli, V. 2011. Classification and Grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*. 48, 117-131.
- Gómez, B.J., Ramírez, M.R., Maldonado, J.E. 2012. Presence of lung metastases in bitches affected by malignant mammary neoplasms in Medellín (Colombia). *Revista MVZ*, 17, 2983-2990.
- Greenwald, P. 1999. Role of dietary fat in the causation of breast cancer: point. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 8, 3-7.
- Hataka A. 2004. Citologia aspirativa com agulha fina e histopatologia: valor e significado para o diagnóstico e prognóstico do câncer de mama em cadelas. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, SP. 90 pp.
- Hellmen E., Bergstrom R., Holmberg L., Spangberg I.B., Hansson K., Lindgren A. 1993. Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Veterinary Pathology*. 30, 20-27.
- Instituto Nacional do Câncer (INCA). Programa nacional de controle do câncer de mama. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. (acesso 19.11.13).
- Itoh, T., Uchida K., Ishikawa K., Kushima K., Kushima E., Tamada H., Moritake T., Nakao H., Shii, H. 2005. Clinicopathological Survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. *Journal Veterinary Medical Science*, 67, 345-347.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer Journal Clinical*. 61,134.
- Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T. C., Dessiris, A. 2005. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: Application of a human grading method. *Journal of Comparative Pathology*, 133, 246-252.
- Lima, F.E.L., Latorre, M.R.D.O., Costa, M.J.C., Fisberg, R.M. 2008. Diet and cancer in Northeast Brazil: evaluation of eating habits and food group consumption in relation to breast cancer. *Caderno de Saúde Pública*. 24, 820-828.
- Misdorp, W. 2002. Tumors of the mammary gland. In: Meuten, D, J. (Ed.). *Tumors in Domestic Animals*. 4th ed. Iowa State Press, Ames, pp.575-606.
- Miyamoto, K., Hamada, A., Kawamura, O. 2008. Determination of aflatoxins in corn and peanut by an immunoaffinity column bound AF.2 monoclonal antibody –

- HPLC method. Technical Bulletin of Faculty of Agriculture, Kawaga University, 60, 75-81.
- Morrison, W.B. 1998. Cancers in dogs and cats. Medical and surgical management. Willians& Wilkins, Philadelphia.
- Oliveira Filho, J.C., Kommers, G.D., Masuda E.K., Marques M.F.P.P., Figuera R.A. Irigoyen L.F., Barros C.S.L. 2010. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários de cães. Pesquisa Veterinária Brasileira, 30,177-185.
- Perez, A. D., Rutteman, G.R., Pena, L., Beynen, A.C., Cuesta, P. 1998. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. Veterinary Internal Medicine Journal. 12, 132-139.
- Perez, A.M.D., Pena, L., Nieto, A.I., Castillo, N. 2000. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumors. Journal of Small Animal Practice, 41, 287-291.
- Queiroga, F., Lopes, C. 2002. Tumores mamários caninos - novas perspectivas. Congresso de Ciências Veterinárias, Proceedings of the Veterinary Sciences Congress, SPVC, Oeiras, PI, pp.183-190.
- Russo, J., Santucci-Pereira, J., López de Cicco, R., Sheriff, F., Russo, P.A., Peri, S., Slifker, M., Ross, E., Mello,M.L.S., Vidal, B.C., Belitskaya-Le´vy, I., Arslan, A., Zeleniuch-Jacquotte, A., Bordas, P., Lenner, P., Ahman, J., Afanasyeva, Y., Hallmans, G., Toniolo, P., Russo, I.H. 2012. Pregnancy-induced chromatin remodeling in the breast of post menopausal women. International Journal of Cancer. 131, 1059-1070.
- Rutteman, G.R., Kirpensteijn, J. 2003. Tumours of Mammary Glands. In: Manual of Canine and Feline Oncology. BVA. 2th ed. pp. 234-239.
- Rutteman, G.R., Withrow, S.J., Macewen, E.G. 2001. Tumors of the mammary gland. In: Withrow, S.J., MacEwen, E.G. (Eds.). Small Animal Clinical Oncology. 3rd ed. W.B.Saunders, Philadelphia, pp .455-477.
- Sabater-Vilar, M., Malekinejad, H., Selman, M.H.J., Van Der Doelen, M.A.M., Fink-Gremmels, J. 2007. In vitro assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxicoses. Mycopathologia, 163, 81-90.
- Schneider, R., Dorn, C. R., Taylor, D.O.N. 1969. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. Journal of the National Cancer Institute, 43, 1249-1261.
- Schneider, R. 1970. Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. Cancer, 26, 419-426.
- Sharma, R., Márquez, C. 2001.Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dogs and cats) using immunoaffinity column and HPLC. Animal Feed Science and Technology, v. 93, 109-114.
- Shephard, G.S., Sydenham, E.W., Thiel, P.G., Gelderblom, W.C.A. 1990. Quantitative determination of fumonisins B1 and B2 by hight-performance liquid

chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography* 13, 2077-2087.

Sorenmo, K.U., Shofer, F. S., Goldschimid, T. 2000. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 14, 266-270.

Stoloff, L., 1987. Carcinogenicity of aflatoxins. *Science*, 237: 1283-4.

Tamada, H., Kawate, N., Inaba, T., Sawada, T. 2003. Long – term prevention of estrus in the bitch and queen using chlormadinoneacetate. *Canadian Veterinary Journal*. 44, 416-417.

Twomey, L.N., Pethick, D.W., Rowe, J.B., Choct, M., Pluske, J.R., Brown, W., Laviste, M.C. 2002. The use of sorghum and corn as alternative to rice in dog foods. *Journal of Nutrition* 132, 1704-1705.

Ueno, Y., Aoyama, S., Sugiura, Y., Wang, D-S., Lee, U-S., Hirooka, E.Y., Hara, S., Karki, T., Chen, G., Yu, S-Z. 1993. A limited survey of fumonisins in corn and corn based products in Asian countries. *Mycotoxin Research* 9, 27-34.

Zuccari, D.A.P.C., Santana, A.E., Rocha, N.S. 2001. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*. 38, 38-41.

Zuccari, D.A.P.C., Berton, C.R., Terzian, A.C.B., Ruiz, A.M. 2008. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias- importância dos marcadores imuno – histoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo. *Arquivo Ciência Saúde* 15, 189-98.

1 **4 CONCLUSÃO**

- 2 • O diagnóstico histológico é uma ferramenta importante para se traçar o
3 prognóstico do paciente;
- 4 • Tumores múltiplos foram associados à neoplasia maligna e a presença de
5 neoplasia maligna foi associada à metástase em linfonodo;
- 6 • As características epidemiológicas dos animais com neoplasia mamária,
7 relatadas neste estudo, são semelhantes aos citados na literatura;
- 8 • O tempo de sobrevivência do carcinoma simples tubular grau III foi menor em
9 relação aos demais tumores malignos;
- 10 • A OSH é um fator protetor para neoplasia mamária na cadela;
- 11 • Em todos os tipos de ração detectou-se a presença de micotoxinas,
12 ressaltando a importância do monitoramento no controle de qualidade.
- 13 • Houve significância estatística para as aflatoxinas B₁, G₁ e G₂ em relação à
14 presença de neoplasia mamária.
- 15

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Estudo de Caso-Controle em cadelas com neoplasia mamária e detecção de micotoxinas em ração pela técnica de HPLC

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____,
 RG. _____, após devidamente esclarecido, estou consciente da minha participação no projeto de pesquisa intitulado “Estudo de caso-controle em cadelas com neoplasia mamária e detecção de micotoxinas em ração pela técnica de HPLC” que será realizado no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (DMVP/UEL), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Roberta Lemos Freire e a aluna de doutorado Michele Salmon Frehse. Este projeto tem por objetivo principal avaliar os fatores associados à neoplasia mamária em cadelas e detectar micotoxinas na ração consumida, por meio de um estudo de caso-controle.

Sei também que tenho a liberdade de me recusar a participar da pesquisa, ou de retirar o meu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem nenhuma implicação moral à minha pessoa ou meus familiares. Estou ciente que, juntamente com a coleta das amostras, será realizado um questionário epidemiológico com o objetivo de auxiliar na pesquisa. Entendo que as informações geradas nesta pesquisa serão divulgadas exclusivamente em publicações científicas e que o anonimato será garantido. Minha participação é voluntária e não remunerada e estou informado que não haverá nenhuma despesa de minha parte e serei informado sobre os resultados dos exames.

Por estar de pleno acordo com os termos mencionados assino o presente documento.

AUTORIZAÇÃO: _____

LONDRINA, ____/____/____

Pesquisadores Responsáveis:

Profa. Dra. Roberta Lemos Freire

MSc. Michele Salmon Frehse

Universidade Estadual de Londrina

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

Rodovia Celso Garcia Cid CEP: 86051-990 Fones: 3371-5871; 3371-4709

e-mail: rlfreire@uel.br

Paciente: Grupo Caso () Grupo Controle ()

APÊNDICE B – Questionário Epidemiológico

ESTUDO DE CASO-CONTROLE EM CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA E DETECÇÃO DE MICOTOXINAS EM RAÇÃO PELA TÉCNICA DE HPLC

RG/HV: _____

Entrevistador: _____ Data _____

Nome do proprietário _____ Fone: () _____

Endereço _____ Bairro: _____ Municí-
pio: _____ Estado: _____

1 Nome do paciente _____

2 Idade (1) ≤1ano (2) > 1 a ≤ 8 anos (3) > 8 anos

3 Raça: (1) SRD (2) Com Raça 3.1 Qual? _____

4 Peso: _____

5 Tumor de mama: (1) sim (2) não

I. AMBIENTE:

6. Quantas pessoas moram na casa? _____

7. Há algum fumante na casa? (1) sim (2) não

8. Tem mais algum animal em casa? (1) sim (2) não
Qual? _____

9. Qual a área que habita? (1) Urbana (2) Rural

10. Vive em área agrícola? (1) sim (2) não

11. Vive em local próximo a fábrica ou indústria? (1) sim (2) não Qual
a distancia? _____

12. O animal fica solto na rua sem a presença do dono?(1) sim (2) não

13. O animal sai para a rua com o dono? (1) sim (2) não

13.1 Qual a frequência? _____

14. Qual o destino do lixo na residência? (1) Coleta publica (2) Enterra (3) queima

15. Faz separação dos recicláveis? (1) sim (2) não

16. Já teve algum caso de tumor de mama na família? (1) sim (2)
não

II. CLÍNICA

17. Teve alguma doença anteriormente? (1) sim (2) não
Qual? _____

18. Toma algum medicamento de uso contínuo? (1) sim (2) não Qual?

III. ALIMENTAÇÃO

19. Qual a alimentação de seu cão? (1) Comida caseira (2) Ração (3) Comida caseira+ ração

19.1 Há quanto tempo o animal se alimenta de ração? _____

19.2 Qual a marca da ração? _____

19.3 Onde compra a ração? (1) Supermercado (2) Casa Agropecuária (3) Pet Shop (4) Outro _____

19.4 Compra de pacote aberto? (1) sim (2) não

19.5 Qual a frequência da compra da ração? (1) Semanal (2) Quinzenal (3) Mensal (4) Outro _____

19.6 Onde armazena a ração? (1) em balde fechado (2) em prateleira (3) no chão (4) Outro _____

19.7 O saco de ração fica aberto? (1) sim (2) não

19.8 O local de armazenagem é coberto? (1) sim (2) não

19.9 O local é úmido? (1) sim (2) não

IV. REPRODUTIVO

20. Quando foi o 1º cio do animal? _____

21. Seu animal é castrado? (1) sim (2) não

21.1 Quando castrou? (1) antes do 1º cio (2) entre o 1º e o 2º cio (3) após o 3º cio (4) não lembra

22. Seu animal já teve cria? (1) sim (2) não Quantas vezes? (1) ≤ 3 (2) ≥ 4

22.1 Com que idade teve a 1ª cria? _____

23. Foi parto normal? (1) sim (2) não

24. Já aplicou contraceptivos em seu animal? (1) sim (2) não

24.1 Com que frequência? (1) 1 vez (2) 2 vezes (3) ≥ 3 vezes

25. Há quanto tempo apareceu o aumento de volume em mama? _____ meses ou _____ anos

APÊNDICE C – Cálculo de sobrevida realizado no programa R 2.15.3

Programa para estimar Kaplan Meier -

```
> rm(list=ls())
> require(survival)
Carregando pacotes exigidos: survival
Carregando pacotes exigidos: splines
> tempos =
c(12,31,0.5,4,20,22,1,26,13,5,23,20,8,22,25,25,12,15,10,21,4,10,17,28,17,3,21,4,9,56,31,15,
6,26,21,12,30,20,13,6,11,21,12,24,1,7,17,24,23,15,26)
> censura =
c(1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,0,
0,0,0)
> grupos =
factor(c(1,4,5,1,5,5,2,1,2,1,2,4,5,1,2,5,4,7,5,4,2,6,5,2,3,3,2,4,1,4,2,1,3,4,4,5,4,4,4,5,1,5,5,5,4,
6,2,5,5,5,1))
> dados = data.frame(tempos, censura, grupos)
> head(dados)
  tempos censura grupos
1  12.0      1      1
2  31.0      0      4
3   0.5      1      5
4   4.0      1      1
5  20.0      0      5
6  22.0      1      5
> tail(dados)
  tempos censura grupos
46     7      1      6
47    17      1      2
48    24      0      5
49    23      0      5
50    15      0      5
51    26      0      1
> str(dados)
'data.frame':  51 obs. of  3 variables:
 $ tempos : num  12 31 0.5 4 20 22 1 26 13 5 ...
 $ censura: num  1 0 1 1 0 1 1 0 1 1 ...
 $ grupos : Factor w/ 7 levels "1","2","3","4",...: 1 4 5 1 5 5 2 1 2 1 ...
>
> kme = survfit(Surv(tempos, censura) ~ grupos)
> summary(kme)
Call: survfit(formula = Surv(tempos, censura) ~ grupos)


```

grupos=1

time	n.risk	n.event	survival	std.err	lower 95% CI	upper 95% CI
4	9	1	0.889	0.105	0.706	1.000
5	8	1	0.778	0.139	0.549	1.000
9	7	1	0.667	0.157	0.420	1.000
11	6	1	0.556	0.166	0.310	0.997
12	5	1	0.444	0.166	0.214	0.923
15	4	1	0.333	0.157	0.132	0.840

grupos=2

time	n.risk	n.event	survival	std.err	lower 95% CI	upper 95% CI
1	9	1	0.889	0.105	0.706	1.000
4	8	1	0.778	0.139	0.549	1.000

13	7	1	0.667	0.157	0.420	1.000
17	6	1	0.556	0.166	0.310	0.997
21	5	1	0.444	0.166	0.214	0.923
25	3	1	0.296	0.164	0.100	0.875

grupos=3

time	n.risk	n.event	survival	std.err	lower 95% CI	upper 95% CI
3	3	1	0.667	0.272	0.2995	1
6	2	1	0.333	0.272	0.0673	1
17	1	1	0.000	NaN	NA	NA

grupos=4

time	n.risk	n.event	survival	std.err	lower 95% CI	upper 95% CI
1	12	1	0.917	0.0798	0.773	1
4	11	1	0.833	0.1076	0.647	1
20	8	1	0.729	0.1355	0.507	1

grupos=5

time	n.risk	n.event	survival	std.err	lower 95% CI	upper 95% CI
0.5	15	1	0.933	0.0644	0.815	1.000
6.0	14	1	0.867	0.0878	0.711	1.000
8.0	13	1	0.800	0.1033	0.621	1.000
10.0	12	1	0.733	0.1142	0.540	0.995
22.0	5	1	0.587	0.1599	0.344	1.000

grupos=6

time	n.risk	n.event	survival	std.err	lower 95% CI	upper 95% CI
7.000	2.000	1.000	0.500	0.354	0.125	1.000

grupos=7

```

time n.risk n.event survival std.err lower 95% CI upper 95% CI
> plot(kme, lty=1:7, col=1:7, xlab="Tempo (semanas)", ylab="S(t) estimada")
> legend(46, .25, c("Grupo 1", "Grupo 2", 'Grupo3', 'Grupo 4', 'Grupo 5', 'Grupo 6', 'Grupo 7'),
+       col=1:7, lty = 1:7)
> # Lendo os dados do arquivo CSV -
> rm(list=ls())
> sobrev = read.csv2('C:/Assessoria/A2013/Michele/sobrevida.csv')
> # grupo 1c. simples tubular grau I
> # grupo 2c. simples tubular grau II
> # grupo 3 c. simples tubular grau III
> # grupo 4 c. complexo grau I
> # grupo 5 c. complexo grau II
> # grupo 6 c. simpes Tubulo papilífero grau I
> # grupo 7 c. simples tubulo papilifero grau II
> require(survival)
> mod = survfit(Surv(meses, resp) ~ grupo)
Erro em Surv(meses, resp) : objeto 'meses' não encontrado
> summary(mod)
Erro em summary(mod) : objeto 'mod' não encontrado
>
> plot(mod, las=1, lty=1:7, col=1:7, xlab="Tempo (meses)", ylab="S(t) estimada",
+     lwd=2)
Erro em plot(mod, las = 1, lty = 1:7, col = 1:7, xlab = "Tempo (meses)", :
objeto 'mod' não encontrado
> legend('bottomright', c("Grupo 1", "Grupo 2", 'Grupo3', 'Grupo 4', 'Grupo 5', 'Grupo 6',
'Grupo 7'),
+       col=1:7, lty = 1:7)
> # Retirando os grupos 6 e 7 -

```

```
> sobrev_sem = sobrev[!sobrev[, 'grupo'] %in% c(6,7), ]
Erro: objeto 'sobrev' não encontrado
> sobrev_sem$grupo = factor(sobrev_sem$grupo)
Erro em factor(sobrev_sem$grupo) : objeto 'sobrev_sem' não encontrado
> head(sobrev_sem)
> require(survival)
> mod2 = survfit(Surv(meses, resp) ~ grupo, data=sobrev_sem)
Erro em is.data.frame(data) : objeto 'sobrev_sem' não encontrado
> summary(mod2)
Erro em summary(mod2) : objeto 'mod2' não encontrado
> par(mai=c(1, 1, .2, .2))
> plot(mod2, las=1, lty=1:5, col=1:5, xlab="Time (months)", ylab="S(t) Estimate", lwd=2)
Erro em plot(mod2, las = 1, lty = 1:5, col = 1:5, xlab = "Time (months)", :
objeto 'mod2' não encontrado
> legend('bottomright', c("Tubular simple carcinoma grade I", "Tubular simple carcinoma
grade II",
+   'Tubular simple carcinoma grade III', 'Complex carcinoma grade I', 'Complex
carcinoma grade II'),
+   cex=.9, col=1:5, lty = 1:5)
> # par(mfrow=c(1,1))
```

ANEXOS

ANEXO A

Carta de aceite Comitê de ética em pesquisa animal



COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

OF. CIRC. CEEA Nº 35/2010

Londrina, 24 de abril de 2010.

Prezada Pesquisadora

O CEEA/UEL, reunido em 13 de abril do ano corrente, avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Estudo de caso-controle em neoplasia mamária canina e a associação com a micotoxina Zearalenona em tecido mamário neoplásico e ração comercial**", registrado no CEEA sob o nº 13/10, pesquisa do centro de Ciências Agrárias, desenvolvido sob sua responsabilidade, julgando-o *aprovado* para execução por entender que os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal estão respeitados.

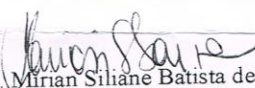
Serão utilizadas fêmeas caninas adultas e idosas, sendo colhidas amostras de 88 com tumor de mama e 176 que serão o controle, porém atendidas por outros motivos no Hospital Veterinário da UEL. Será realizado um questionário epidemiológico com variáveis, contendo dados como nome do paciente, nome do proprietário, idade do paciente, raça, se aplicou contraceptivo alguma vez, histórico de ovariectomia, idade do primeiro cio, idade do primeiro parto e número de gestações, aplicado aos proprietários dos animais em estudo. Todos os animais que fizerem parte do estudo e se alimentarem de ração, terão amostras colhidas para análise e pesquisa de zearalenona, aflatoxina B1 e M1. Dos animais com câncer serão coletadas amostras dos nódulos mamários para realização de exames citológico, histopatológico e imunohistoquímicas. O projeto está previsto para ser desenvolvido entre junho de 2010 e maio de 2012. Este comitê sugere a avaliação de micotoxina no tecido mamário.

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Roberta Lemos Freire
Coordenadora do Projeto
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Centro de Ciências Agrárias

Cumpre orientar que caso se pretendam quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação do CEEA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Sem mais para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,



Prof.ª Dra. Mirian Siliâne Batista de Souza
Coordenadora do CEEA/UEL

ANEXO B

BISSOQUI, L. Y. **Avaliação do risco de exposição de cães à contaminação natural por micotoxinas**. 2012. 93f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2012.

RESUMO

O Brasil possui a segunda maior população de cães (34,3 milhões) e gatos (18,3 milhões) do mundo, sendo que em 2010 o consumo de ração para animais de companhia foi de aproximadamente 1,83 milhões de toneladas, movimentando um total de R\$ 7,26 bilhões de reais. Portanto, é necessário avaliar não apenas a composição nutricional da ração, mas a sua inocuidade com o monitoramento, entre outros contaminantes, das micotoxinas. Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos que podem contaminar naturalmente os cereais utilizados como matéria prima na fabricação de ração destinada a cães. Além de prejuízos financeiros, a contaminação natural da ração por uma ou mais micotoxina pode gerar efeitos tóxicos sinérgicos ou aditivos. No Brasil e no mundo são poucos os trabalhos que relatam a ocorrência de micotoxinas em ração destinada a cães e a avaliação do nível de exposição desses animais. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi analisar a ocorrência de fumonisinas, zearalenona e aflatoxinas em 100 amostras de ração destinada a cães coletadas na residência do proprietário do animal na região norte do Estado do Paraná, no período de dezembro 2010 a dezembro 2011, assim como avaliar o risco de exposição desses animais a essas micotoxinas. As concentrações de fumonisinas, zearalenona e aflatoxinas foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) sistema isocrático de fase reversa. A exposição de cães a micotoxinas foi avaliada por meio da estimativa de parâmetros como a ingestão diária aceitável (ADI) e o nível seguro na dieta animal (SPDL) de fumonisinas, zearalenona e aflatoxinas. Fumonisinas, zearalenona e aflatoxinas foram detectadas em 68, 95 e 68% do total de amostras, com níveis que variaram de 0,03 a 0,38 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (média = 0,12 $\mu\text{g.g}^{-1}$), 5,45 a 442,24 ng.g^{-1} (média = 49,20 ng.g^{-1}) e 0,34 a 3,88 ng.g^{-1} (média = 1,54 ng.g^{-1}), respectivamente. Em 80, 86 e 90% das amostras os níveis de fumonisinas, zearalenona e aflatoxinas foram inferiores a 0,2 $\mu\text{g.g}^{-1}$, 80 ng.g^{-1} e 2,0 ng.g^{-1} , respectivamente, entretanto a co-contaminação por diferentes micotoxinas, e a possibilidade de efeitos sinérgicos e aditivos, deve ser levada em consideração. Neste estudo a co-contaminação por duas ou três micotoxinas foi detectada em 50 a 68% do total de amostras. A frequência de contaminação por fumonisinas, zearalenona e aflatoxinas foi alta, porém os níveis médios detectados são considerados baixos, uma vez que, a provável ingestão diária (1,823 μg fumonisinas/Kg peso animal/dia, 0,936 μg zearalenona/Kg peso animal/dia e 0,024 μg aflatoxinas/Kg peso animal/dia) em comparação com os níveis de ingestão diária aceitável (ADI) e o nível seguro na dieta animal (SPDL) foram baixos. Assim sendo, o risco de exposição de cães alimentados com as rações analisadas pode ser considerado baixo e a ração segura quanto à presença dessas micotoxinas. No entanto, considerando que as micotoxinas constituem um problema difícil de evitar e que a co-contaminação pode produzir uma potencialização dos efeitos tóxicos, o monitoramento da cadeia de produção é essencial para avaliar os riscos de exposição animal. Os resultados indicam a necessidade de uma legislação específica de micotoxinas que atenda os critérios de segurança para animais de companhia, assim como, a adoção de medidas de prevenção e monitoramento da contaminação natural no processo de fabricação da ração.

Palavras-chave: Micotoxinas. Ração. Canine. Co-contaminação. Risco de exposição.

ANEXO C – Instrução para autores
Revista Pesquisa Veterinária Brasileira - ARTIGO A

Estudo retrospectivo de neoplasias mamárias em cadelas de população hospitalar.
Pesq. Vet. Bras. 33(7), julho 2013

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@pvb.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponível no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (*page charge*) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos **seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br)**. A digitalização deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso)**;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”**; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exememplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em itálico (grifo), e **sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica.** Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse **caso**, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho.**

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto.** Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se possível, com “a” em cada Quadro;** as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

ANEXO D - Instruções para autores
Brazilian Journal of Veterinary Pathology - Artigo B

Epidemiological and histological aspects of canine mammary gland tumors diagnosed at veterinary hospital/UEL.

The BJVP publishes original full papers, invited review articles, short communications, case reports, letters to the Editor, and Editors viewpoint. Authors should submit manuscripts exclusively to the journal. With the exception of letters to the Editor and Editors viewpoint, all manuscripts will be peer reviewed by two more referees. The journal may publish also abstracts of scientific meetings in the field of Veterinary Pathology.

Letter to the Editor: should not exceed two printed pages*. The subject should be comments and information about ongoing research published papers, and it may contain figures and tables.

Original full paper: It is suggested to be four to ten pages long. Should contain title, authors names and affiliations, abstract, key words, introduction, material and methods, results, discussion, acknowledgements and references**. Results and discussion may be combined.

Short communication: Should be three pages long and include title, authors names and affiliations, abstract, key words, text, acknowledgements and references.

Case report: Should be three to six pages long and include title, authors names and affiliations, abstract, key words, description, acknowledgements and references.

Review article: Should be nine to twelve pages long and include title, authors names and affiliations, abstract, key words, text, acknowledgements and references.

Notes:

- * The manuscripts should be saved as a Word file with 20 mm margins on all sides (letter paper), font Times New Roman 10 pt, justified, and single line spacing. Tables should be included in the Word file; figures in high-quality (at least 300 dpi), *tif*, *bmp*, *jpg*, should be sent in individual separate files. Use of figure layout as panels is discouraged.
- Manuscripts should be written in English and attached to an e-mail message addressed to submission@bjvp.org.br. Authors are strongly encouraged to seek help from a native English speaker to review the manuscript prior to submission.
- Corresponding author and address must be indicated at the end of the first page of the manuscript.
- Experimental studies involving animals should have the approval from the appropriate institutional committee, and the ethics guidelines must be followed by the authors.
- Authors must agree with the transfer of the copyright to the BJVP.

** References and citation in the text

The citation within the text must contain only the number on the line (not above) and within parentheses, e.g. (4, 17).

References must be listed in ALPHABETICAL ORDER as follows:

1. BASER GM., YANGER PA. A mouse model for post exposure rabies prophylaxis: The comparative efficacy of two vaccines and of antiserum administration. *J. Gen. Virol.*, 1977, 36, m51-8.
2. BALOZET L. Scorpionism in the Old World. BICHERL W., BUCKLEY EE. Eds. *Venomous animals and their venoms. v.3 Venomous invertebrates.* New York: Academic Press, 1971: 349-71
3. BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Profilaxia da Raiva. Casos de raiva humana notificados e percentual de casos transmitidos segundo a espécie animal. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.
4. DAWSON B., TRAPP RG. *Bioestatística básica e clínica.* 3.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003
5. PUBMED, National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>)
6. VIGAR ND., CABRERA WH., ARAUJO LMM., RIBEIRO OG., OGATA TRP., SIQUEIRA M., IBAEZ OM., FRANCO M. Pristane-induced arthritis in mice fed for maximal and minimal acute inflammatory reaction. *Eur. J. Immunol.*, 2000, 30, 431-7.
7. XAVIER FG., RIGHI DA., SPINOSA HS., *Toxicologia do praguicida aldicarb (chumbinho): aspectos gerais, clínicos e terapêuticos em cães e gatos.* *Cienc. Rural*, 2007, 37, 1206-11.

Publication charges

In Brazil R\$ 120,00 per article (original full papers, short communications, case reports)

Dados bancários da ABPV: Banco do Brasil, Ag. 3559-9, CC 34121-5

ABPV members Free of charges

Outside Brazil US\$ 50,00

ANEXO E - Instrução para autores

Research and Veterinary Science – Artigo C

Estudo de Caso – Controle em cadelas com neoplasia mamária e detecção de micotoxinas em ração.

Research in Veterinary Science publishes original contributions and review articles on research concerning the health and disease of animals, including studies in comparative medicine.

Types of contribution

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Short Communications
3. Review articles

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Short Communications should not exceed 1600 words and include no more than two tables or figures. They should have an abstract but no other divisions. Typescripts should be clearly marked Short Communication.

Review articles on veterinary topics are invited for publication. They should give an update on recent advances in a particular field and be targeted at research veterinarians who are not necessarily working in the same field. The length should not exceed 4000 words.

Submission of manuscripts

Submission to Research in Veterinary Science now proceeds online via Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/rvsc>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Language Editing: Elsevier's Authors Home provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance before they submit their article or before it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. For more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com.

Ethics

Before papers describing animal studies are accepted for publication in Research in Veterinary Science, the authors must satisfy the editors that the work conformed to appropriate ethical standards. Whether or not a particular piece of work is accepted for publication will be decided by the editors whose decision will be final.

The authors should provide written assurances that: (i) The project underwent ethical review and was given approval by an institutional animal care and use committee or by appropriately qualified scientific and lay colleagues. (ii) The care and use of experimental animals complied with local animal welfare laws, guidelines and policies.

The editors expect authors to have adhered to the following general principles: (i) Alternative procedures that replace the use of animals should be used if possible. Where this is not possible, the animals used should be carefully selected to be the least sentient species possible and of an appropriate strain. (ii) The minimum number of animals should be used consistent with achieving the scientific objectives of the study. (iii) Pain and distress should be

minimised by the use of humane endpoints, sedation, anaesthesia, analgesia and post-operative care. (iv) Access to veterinary care must be available at all times. (v) Investigators and personnel that care for and use animals must be trained and possess relevant expertise and training that should be updated regularly. (vi) If animals have to be killed, this should be done humanely according to local euthanasia regulations, such as the Home Office guidelines in the UK or guidelines of the American Veterinary Association Panel on Euthanasia.

Title

Papers should be headed with the full title, the initials and surnames of the authors, and the name and address of the institution where the work was carried out. The full telephone number, Fax number and e-mail address of the corresponding author should also be provided.

Form of Papers

a) Abstract (not more than 150 words), self-contained and embodying the main conclusions. It should note the relevance to veterinary science as well as the aims and objectives of the work. Sentences such as 'the results are discussed', which merely describe the paper, are not allowed.

b) Keywords. Please supply a list of up to six keywords that describe the paper. c) Introduction.

d) Materials and methods employed.

e) Results, as concise as possible. Text, tables and figures illustrating the same data will rarely be permitted.

f) Discussion and conclusions.

g) Acknowledgements.

h) References.

i) Manuscripts should have numbered lines, with wide margins and double spacing, throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscripts, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Abbreviation and symbols: Authors are asked to explain each scientific abbreviation at its first occurrence in their papers; for example, complement fixation test (CFT). The policy of the journal with respect to units and symbols is that SI (System International) symbols should be used.

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed - if necessary - by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12-16)".

3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al." This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on author's names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates - publications of the same author with one co-author - publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.

5. Use the following system for arranging your references:

a. For periodicals

Minamoto, T., Honjo, M.N., Yamanaka, H., Tanaka, N., Itayama, T., Kawabata, Z., 2011. Detection of cyprinid herpesvirus-3 DNA in lake plankton. *Research in Veterinary Science* 90, 530-532.

Castillo, V.A., Gomez, N.V., Lalia, J.C., Cabrera Blatter, M.F., Garcia, J.D., 2008a. Cushing's disease in dogs: Cabergoline treatment. *Research in Veterinary Science* 85, 26-34.

b. For books

Blaha, T. (Ed.), 1989. *Applied Veterinary Epidemiology*. Elsevier, Amsterdam, 344 pp.

c. For multi-author books

Wilson, M.B., Nakane, P.K., 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp, W., Holubar, K., Wick, G. (Eds.), *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. North Holland, Amsterdam, pp. 215-2246.

6. Please do not abbreviate the journal title names e.g. *Research in Veterinary Science* and not *Res Vet Sci*.

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.

11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.

2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.

3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.

4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. Any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.

5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.

6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.

7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.

8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.

9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.

Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.

10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.

2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.

3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.

4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.

5. Each table should have a brief and self-explanatory title.

6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.

7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.

8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has

preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, fax +44(0)1865 853333, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage <http://www.elsevier.com/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>).

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are

given at the Adobe site:
<http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Author Enquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit the journal's homepage at <http://www.elsevier.com/locate/rvsc>. This also provides the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

Research in Veterinary Science has no page charges

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an Audio Slides presentation after acceptance of their paper.