



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CLAUDIA RUSSO

**ESTRESSE OXIDATIVO E HIPERCALCEMIA EM CADELAS
COM NEOPLASIA MALIGNA DE MAMA**

Londrina
2017

CLAUDIA RUSSO

**ESTRESSE OXIDATIVO E HIPERCALCEMIA EM CADELAS
COM NEOPLASIA MAMÁRIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina
como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor.

Orientador: Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro
Bracarense

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Russo, Claudia.

Estresse oxidativo e hipercalcemia em cadelas com neoplasia maligna de mama /
Claudia Russo. - Londrina, 2017.
83 f. : il.

Orientador: Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Cães - Tese. 2. Cálcio ionizado - Tese. 3. Malondialdeído - Tese. 4. Tumor de mama - Tese. I. Bracarense, Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CLAUDIA RUSSO

**ESTRESSE OXIDATIVO E HIPERCALCEMIA EM CADELAS COM
NEOPLASIA MAMÁRIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina
como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Frederico
Rodrigues Loureiro Bracarense
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Giovana Wingeter di Santis
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Maria Isabel Mello Martins
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Alexandre Hataka
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Dra. Neide Mariko Tanaka
Clínica Veterinária Hilst

Londrina, 02 de maio de 2017.

Aos grandes amores de minha vida, meu pai Galaor,
minha mãe Nilce e meu filho David, dedico este
trabalho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, a fonte de origem de toda a vida, pela sua manifestação por meio de nós, permitindo-nos utilizar nossa inteligência para sermos amor.

Agradeço imensamente a minha orientadora, professora Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense, por acreditar neste estudo desde a primeira conversa, pela sua paciência ao me orientar, e por me permitir ver e espelhar-me em alguém que, de fato, prima pela elevação dos níveis de qualidade da pesquisa veterinária na UEL. Professora, você é um exemplo pra mim! Muito obrigada!

Ao meu pai, Galaor Caraíba Russo, e a minha mãe, Nilce Russo, que colocam um brilho no olhar ao me ver crescer. Que mesmo bem distantes da vida acadêmica, entenderam a importância disso tudo na minha vida. Por seu apoio incondicional de todas as formas possíveis, por terem me permitido trilhar esse caminho da medicina veterinária e alcançar um sonho, muito obrigada, amo vocês infinitamente.

Ao meu filho David, o Zé Fofinho, que muitas vezes não entendia a razão de tantas viagens e tantos dias sem mãe, por ter feito brotar em mim um amor que eu não sabia existir, por ser essa criança incrivelmente carinhosa e especial, te amo muito meu filho!

Aos meus irmãos de sangue, Galaor Caraíba Russo Júnior e Priscila Russo, tão diferentes de mim, e tão iguais ao mesmo tempo, obrigada pelo amor e pela amizade, pelas lembranças de uma infância feliz, amo muito vocês!

As minhas irmãs de coração, Claudia Rolim Galerani, Sandra Simonelli, por fazer-me sentir segura nesse mundo, e por me fazerem saber que se tudo der errado, tenho pra onde correr. Sandra Simonelli, mais do que tua amizade, você me emprestou seu enorme conhecimento na estatística, não tenho como agradecer essa ajuda! Muito obrigada, amo vocês!

Ao médico veterinário Danilo Roberto Custódio Marques, na época residente do HV Unicesumar, e Ilan Munhoz Ayer, na época, acadêmico do curso de medicina veterinária Unicesumar, primeiro pela amizade de vocês, e pela ajuda durante o atendimento e realização de um número enorme de mastectomias em tão pouco tempo, com tantas colheitas de sangue, por manterem organizadas e seguras as amostras deste estudo, muito obrigada!

À médica veterinária Alessandra Alvares, do laboratório de patologia clínica do HV Cesumar, pela realização das análises clínicas deste estudo, e por me ajudar a

esclarecer tantas dúvidas técnicas, muito obrigada!

Ao médico veterinário residente em cirurgia de animais de companhia Jurandir Machado, do Hospital Veterinário das Faculdades Integradas de Ourinhos - FIO, pelo imenso auxílio na realização das mastectomias e colheita de amostras durante a realização do estudo, muito obrigada!

Ao professor Alceu Afonso Jordão Júnior e à Paula Payão Ovídio, do laboratório de metabologia e nutrição da Faculdade de Medicina - USP de Ribeirão Preto, pela realização das dosagens de MDA, muito obrigada!

Ao Laboratório São Camilo de Maringá, um agradecimento especial pela realização das dosagens de cálcio.

À Simoni Xisto, então administradora do Hospital Veterinário Unicesumar, por me auxiliar a encontrar a viabilidade financeira para a realização deste estudo, muito obrigada!

Agradeço de coração à Helenice, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UEL, por todo apoio, sempre de forma gentil e atenciosa.

Agradeço à todos os professores do programa pela grandiosa colaboração em minha formação, agradeço também, com um carinho especial à toda Universidade Estadual de Londrina, meu berço, maternidade da minha formação nesse maravilhoso mundo da Medicina Veterinária, pelo meu aprimoramento como profissional durante a residência e agora, contribuindo para a subida de mais um degrau. Obrigada UEL, esse nome eu levo gravado em meu coração com muito orgulho.

Agradeço imensamente aos tutores de todas as cadelas portadoras de neoplasia mamária, atendidas nos Hospitais Veterinários Unicesumar e FIO, por autorizarem e colaborarem com a participação de seus animais nesse estudo.

E por fim, mas com toda a importância que merece, a você Tom, agradeço pelo amor, pelo colorido que trouxe a minha vida, por ser você exatamente do jeito que é.

“Observe as plantas e animais, aprenda com eles a aceitar aquilo que é. Deixe que lhes ensinem o que é Ser, o que é integridade, estar em unidade, ser você mesmo, ser verdadeiro. Aprenda como viver e como morrer, e como não fazer do viver e do morrer um problema”.

Eckhart Tolle

RUSSO, Claudia. **Estresse Oxidativo e Hipercalcemia em Cadelas com Neoplasia Mamária**: 2017. 83f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

A alta casuística das neoplasias mamárias nos animais de companhia, em conjunto com a maior preocupação e cuidados dispensados à saúde dos animais que vivem próximos ao homem, vistos como membro da família, gera a crescente necessidade de estudos que busquem desde métodos diagnósticos mais precisos, novas formas de abordagem terapêutica e fatores preditivos de prognóstico como aspectos que aumentem a morbidade, a presença de síndromes paraneoplásicas e a possível existência de estresse oxidativo também são objeto de estudo. O malondialdeído (MDA), um biomarcador geral de dano oxidativo, considerado um importante parâmetro para avaliação de estresse oxidativo celular, utilizado rotineiramente na medicina humana, foi escolhido para ser utilizado como forma de detecção desta condição no presente trabalho. Dois estudos foram realizados em cadelas portadoras de tumor de mama. No primeiro, com objetivo de identificar a presença de estresse oxidativo, 144 cadelas portadoras de neoplasia mamária, foram submetidas a avaliação clínica para estadiamento da doença, classificação histológica dos tumores, avaliação hematológica, bioquímica sérica, incluindo testes de função renal, hepática, níveis séricos de cálcio total e dosagem de MDA, no momento de sua abordagem e 30 dias após realização de tratamento. De 144 cadelas incluídas no estudo, em 113 (78,47%) foram diagnosticados tumores malignos, sendo o carcinoma em tumor misto, o padrão histológico mais frequente (26,54%), e em 31 cadelas (21,53%) foram detectados apenas neoplasias benignas, sendo o adenoma mamário o padrão mais frequente (45,16%). Os valores séricos de MDA das cadelas com neoplasias malignas e benignas, no momento da abordagem e 30 dias após tratamento foram comparados com os valores obtidos de um grupo de 100 cadelas saudáveis. Houve diferença significativa entre todos os grupos estudados, identificando valores mais altos no grupo de cadelas com tumores malignos, além disso, foi encontrada correlação significativa entre presença de anemia e níveis mais elevados de MDA. No segundo estudo, foram utilizadas 100 cadelas portadoras de neoplasia maligna de mama com o objetivo de realizar a comparação entre níveis de cálcio total e cálcio ionizado e padrão histológico das neoplasias, estadiamento clínico, alterações hematológicas e bioquímicas referentes a função renal e hepática. Em (52%) das cadelas doentes, foi constatada hipercalcemia, por meio da dosagem de cálcio ionizado, o que não foi verificado quando a análise foi feita por meio de dosagem de cálcio total. Além disso, verificou-se correlação positiva entre hipercalcemia e estadiamento clínico da doença, nos estágios mais avançados foram observados maiores concentrações séricas da fração ionizada do cálcio, demonstrando a importância da pesquisa sobre a presença de síndromes paraneoplásicas em cadelas com neoplasias mamárias. Pode ser concluído que as cadelas portadoras de neoplasia maligna de mama estão em estresse oxidativo e podem apresentar hipercalcemia, que deve ser verificada por meio da mensuração de cálcio ionizado, além disso presença de anemia em cadelas portadoras de neoplasia maligna de mama pode estar relacionada ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: Cães. Cálcio ionizado. Malondialdeído. Tumor de mama.

Russo, Claudia. **Oxidative stress and Hypercalcemia in Bitches with Mammary Neoplasms**. 2017. 85 p. Thesis (Doctor's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

The high casuistic of mammary neoplasia in companion animals, with the greater concern and care given to the health of animals that live close to the man, as a family member, generates the growing need for studies that seek from more precise diagnostic methods, new forms of therapeutic approach and predictive factors of prognosis. Other aspects that increase morbidity, such as the presence of paraneoplastic syndromes and the possible existence of oxidative stress are also the object of study. Malondialdehyde (MDA), a general biomarker of oxidative damage, considered an important parameter for evaluation of cellular oxidative stress routinely used in human medicine, was chosen to be used as a means of detecting this condition in the present study. Two studies were performed on female dogs bearing mammary cancer. In the first one, 144 bitches with breast neoplasms were submitted to clinical evaluation for disease staging, histological classification of the tumors, hematological evaluation, serum biochemistry, including renal, hepatic, liver function tests, serum calcium levels and dosage of malondialdehyde (MDA), a biomarker of oxidative damage, at the time of its approach and 30 days after treatment. From 144 bitches included in the study, malignant tumors were diagnosed in 113 (78.47%), being the carcinoma in mixed tumor the most frequent histological pattern (26.54%), and in 31 bitches (21.53%), only benign neoplasms were detected, with mammary adenoma being the most frequent pattern (51.61%). Serum MDA values of bitches with malignant and benign neoplasms at the time of approach and 30 days after treatment were compared with values obtained from a group of 100 healthy bitches. There was a significant difference between all the studied groups, identifying higher values in the group of bitches with malignant tumors, in addition, a significant correlation was found between the presence of anemia and higher levels of MDA. In the second study, 100 bitches with malignant neoplasia of the breast were used in order to compare the levels of total calcium and ionized calcium and histological pattern of neoplasms, clinical staging, hematological and biochemical alterations related to renal and hepatic function. In 52% of the diseased dogs, hypercalcemia was observed by means of ionized calcium dosing, which was not verified when the analysis was done by total calcium dosing. In addition, there was a positive correlation between hypercalcemia and clinical staging of the disease, in the more advanced stages, higher serum concentrations of the ionized calcium fraction were observed, demonstrating the importance of the research on the presence of paraneoplastic syndromes in bitches with mammary neoplasms. It can be concluded that bitches with malignant neoplasia of the breast are in oxidative stress and may present hypercalcemia, which should be verified by measuring ionized calcium. The presence of anemia in female dogs with malignant neoplasia of the mammary may be related to oxidative stress.

Keywords: Breast tumor. Dogs. Ionized calcium. Malondialdehyde.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 –	Classificação TNM para neoplasias mamárias em cadelas	17
Quadro 2 –	Estadiamento Clínico para Neoplasias Mamárias em Cadelas.....	17
ARTIGO A –	ESTRESSE OXIDATIVO EM CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA:	
Quadro 1 -	Frequência de animais com neoplasia mamária maligna e benigna, em pré e pós-tratamento que apresentaram alterações hematológicas e bioquímicas sérica.....	51
ARTIGO B –	HIPERCALCEMIA EM CADELAS COM NEOPLASIA MALÍGNA DE MAMA:	
Quadro 1 -	Valores normais de referência, média, desvio padrão e frequência de alterações hematológicas verificadas nos grupos pré e pós- tratamento	74
Quadro 2 -	Valores normais de referência, média, desvio padrão e frequência de alterações bioquímicas séricas verificadas nos grupos pré e pós-tratamento.	75

LISTA DE TABELAS

ARTIGO A – ESTRESSE OXIDATIVO EM CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA:

- Tabela 1** – Estadiamento clínico verificado nos grupos de tumores malignos e benignos no grupo pré-tratamento..... 49
- Tabela 2** – Médias e desvios padrão de malondialdeído sérico (nmol/mL) nos animais do grupo controle, portadores de neoplasias benignas e malignas, antes e após o tratamento 52
- Tabela 3** – Associação entre anemia e níveis séricos mais elevados de MDA no grupo de neoplasias malignas, em pré-tratamento 53
- Tabela 4** – Correlação entre os valores médios de malondialdeído sérico (\pm desvio padrão) e demais variáveis em cadelas com neoplasias mamárias malignas antes e após o tratamento..... 54

ARTIGO B – HIPERCALCEMIA EM CADELAS COM NEOPLASIA MALÍGNA DE MAMA:

- Tabela 1** - Valores de referência, médias e desvios padrão, valores mínimos e máximos mensurados para cálcio total e cálcio ionizado dos animais em pré e pós-tratamento 69
- Tabela 2** – Frequência de hipercalcemia (Cálcio Total e Cálcio Ionizado) de acordo com padrão histológico dos tumores no grupo pré-tratamento 71
- Tabela 3** – Médias e desvios padrão, para Cálcio Total e Cálcio Ionizado dos animais em pré-tratamento em relação a presença de outras alterações bioquímicas e ao estadiamento clínico. 73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alaninaaminotransferase
iCa	Cálcio Ionizado
Cat	Cálcio Total
CAT	Catalase
CAOT	Capacidade antioxidante total
Cox – 2	Ciclooxigenase 2
ERN	Espécime reativo de nitrogênio
ERO	Espécime reativo de oxigênio
FA	Fosfatase Alcalina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
Ht	Hematócrito
HER-2	Human Epidermal growth factor Receptor-type 2
Ki 67	Antígeno marcador de proliferação celular
MDA	Malondialdeído
O ₂ ⁻	Superóxido
OH	Hidroxila
OSH	Ovariosalpingohisterectomia
p53	Gene de supressão tumoral
PTHrP	Proteína relacionada ao paratormônio
SOD	Superóxido desmutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
VEGF	Fator de crescimento endotelial dos vasos
TNM	Estadiamento de tumores (T-Tumor, N-Linfonodo, M-Metástase)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS	14
2.2	CÁLCIO	18
2.2.1	Hipercalcemia Maligna	20
2.3	ESTRESSE OXIDATIVO	22
2.3.1	Espécimes Reativos De Oxigênio	23
2.3.2	Biomarcadores de Estresse Oxidativo	24
2.3.3	Estresse Oxidativo e Doenças Relacionadas	26
	REFERÊNCIAS - REVISÃO	29
3	OBJETIVOS	41
3.1	OBJETIVO GERAL	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICO	41
4	ARTIGO A – ESTRESSE OXIDATIVO EM CADELAS PORTADORAS DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS	42
	REFERÊNCIAS - ARTIGO A	59
5	ARTIGO B – HIPERCALCEMIA EM CADELAS PORTADORAS DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS MALIGNAS	64
	REFERÊNCIAS - ARTIGO B	79
6	CONCLUSÃO	82
7	CONSIDERAÇÕES	83
ANEXOS:	Parecer Institucional do Comitê de Bioética em Experimentação Animal	85

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias que acometem as glândulas mamárias são as mais frequentes em fêmeas caninas (CASSALI et al., 2014), apresentando uma alta casuística na clínica de animais de companhia (DE NARDI et al., 2008). Constituem cerca de 25% a 52% de todas as neoplasias que afetam as fêmeas caninas (QUEIROGA, 2002). A maioria dos autores concorda ao afirmar que cerca de 50% dos tumores mamários na espécie canina sejam malignos, embora outros autores já tenham publicado estudos mostrando essa porcentagem em valores maiores, acima de 80% (ZUCCARI et al. 2001; De NARDI et al. 2002; MARTINS et al. 2002; OLIVEIRA et al. 2003). Alguns autores citam ainda que as raças de porte grande apresentam maior risco de desenvolvimento de tumores malignos (QUEIROGA, 2002; ITOH et al., 2005;). Além disso, as neoplasias mamárias na cadela são consideradas um modelo de estudo para o tumor de mama na mulher (FELICIANO et al., 2012; MARTINS; FERREIRA, 2003).

As neoplasias mamárias podem estar relacionadas a uma série de alterações sistêmicas denominadas de síndromes paraneoplásicas. Alterações hematológicas como anemia, leucocitose, coagulopatias, trombocitopenias e coagulação intravascular disseminada têm sido mais frequentemente identificadas e estudadas (BERGMAN, 2013). Em um estudo prévio com 25 cadelas portadoras de tumor de mama diversas alterações hematológicas como anemia (24%) e leucocitose (44%), bioquímicas, como hipocalcemia (76%) e hipoalbuminemia (32%) foram detectadas em um número significativo de animais (DUDA, 2014), demonstrando que as neoplasias mamárias podem também ser a causa de outros distúrbios não relacionados à presença local do tumor ou suas metástases. Os mecanismos pelos quais ocorrem as síndromes paraneoplásicas em cadelas portadoras de tumores de mama, bem como a sua frequência e incidência, não são ainda muito bem esclarecidos.

A hipercalcemia maligna na espécie canina tem sido relatada em diversos tipos de tumores, incluindo as neoplasias mamárias, porém, sua frequência tem sido mais observada em linfomas e neoplasias dos sacos anais (BERGMAN, 2013).

Alguns estudos que verificaram alterações no *status* oxidativo de animais portadores de neoplasias, incluindo as mamárias, por meio de dosagens de biomarcadores de dano, como o malondialdeído sérico (MDA), por meio da concentração de substâncias reativas ao ácido barbitúrico (TBARS), óxido nítrico, concentrações de metais como ferro, cobre e zinco, além do ácido ascórbico e outros antioxidantes, vêm demonstrando a existência de estresse oxidativo (ASKAR et al., 2009; MACEDO, 2010). Uma pesquisa utilizando 15 cadelas

portadoras de neoplasias mamárias identificou a presença de estresse oxidativo devido aos níveis elevados de TBARS (incluindo MDA) e diminuição significativa de ácido ascórbico. Os autores sugerem em suas conclusões que os espécimes reativos de oxigênio gerados pela presença de elementos como ferro e cobre, que atuam como catalisadores na sua formação, podem estar relacionados a gênese dos tumores mamários (ASKAR et al., 2009).

O presente estudo teve como principal objetivo verificar a presença de estresse oxidativo por meio da determinação sérica de malondialdeído e comparações entre um grupo de cadelas saudáveis com cadelas portadoras de neoplasias benignas e malignas de mama, além de buscar possíveis associações entre níveis séricos de MDA e alterações hematológicas e bioquímicas, incluindo função renal e hepática, estadiamento clínico e classificação histológica dos tumores. Foi também objeto deste estudo detectar a presença de hipercalcemia por meio das determinações séricas de cálcio total e fração ionizada em cadelas com neoplasia maligna de mama.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS

As neoplasias que acometem tecido mamário são as mais frequentes em fêmeas caninas, apresentando uma alta casuística na clínica de pequenos animais. Constituem cerca de 52% de todas as neoplasias que afetam as cadelas (QUEIROGA, 2002). A maioria dos autores concorda ao afirmar que cerca de 50% dos tumores mamários na espécie canina sejam malignos, embora outros autores já tenham publicado estudos mostrando essa porcentagem em valores maiores, acima de 80% (ZUCCARI et al. 2001; De NARDI et al. 2002; MARTINS et al. 2002; OLIVEIRA et al. 2003). Além disso, as neoplasias mamárias na cadela são consideradas um modelo de estudo para o tumor de mama na mulher (FELICIANO et al., 2012; MARTINS; FERREIRA, 2003). Diversos fatores podem ser utilizados para caracterizar os tumores de mama na cadela, entre eles pode-se citar a idade de surgimento, a morfologia, efeito protetor da ovariectomia, presença de receptores hormonais, órgão alvo de metástase, evolução, hereditariedade e também o genótipo antigênico comparado aos tumores de mama na espécie humana (SILVA et al., 2004). Algumas condições têm sido relacionadas à origem das neoplasias, como fatores hormonais, nutricionais, ambientais e genéticos. O papel dos hormônios esteróides femininos sobre o desenvolvimento dos tumores de mama na cadela, é assunto bastante discutido e aceito pela maioria dos autores. Apesar disso a eficácia da ovariectomia (OSH) realizada como parte do tratamento é ainda tema controverso. Um estudo realizado por Osipov et al. (1972) demonstrou um maior tempo de sobrevivência em cadelas submetidas à OSH no mesmo momento da realização da mastectomia, porém, a grande maioria dos autores é unânime ao afirmar que a OSH não tem influência sobre as taxas de sucesso terapêutico quando realizada juntamente com a mastectomia (ALLEN; MAHAFFEY, 1989; MORRIS et al., 1998). Vale ressaltar que a OSH quando realizada precocemente, pode ser considerada uma forma importante de se evitar ou pelo menos minimizar a ocorrência de neoplasias mamárias. Quando realizada antes do primeiro estro, a OSH reduz o risco de desenvolvimento de tumores mamários para 0,05%. Após o segundo estro o risco aumenta para 26% e após dois anos e meio de idade, a OSH não confere mais proteção contra este tipo de neoplasia (FANTON; WITHROW, 1981). Outro fator hormonal frequentemente relacionado aos tumores de mama nas cadelas e nas gatas, principalmente em países onde a OSH não é realizada de forma maciça, é a administração de

contraceptivos progestágenos. Os progestágenos sintéticos são associados ao desenvolvimento lóbulo-alveolar da glândula mamária, levando a ocorrência hiperplasia de elementos mioepiteliais e secretórios, podendo desta forma, induzir a formação de nódulos, na maioria das vezes benignos, principalmente em animais jovens (SILVA et al., 2004). Na espécie humana, a prolactinemia aumentada também é referida como um fator hormonal indicador de prognóstico desfavorável, relacionada a tumores mais agressivos e que originam metástase precocemente (VONDERHAAR, 1999).

Fatores nutricionais considerados predisponentes ao surgimento de neoplasia mamária estão relacionados principalmente a ingestão de alimentos gordurosos e obesidade. Cadelas obesas na fase jovem, com idade entre 9 e 11 meses de idade, apresentam maior risco de desenvolvimento de neoplasia mamária na fase adulta (QUEIROGA, 2002). Além disso, um estudo, demonstrou que a ingestão crônica de alimentação contaminada por micotoxinas, incluindo aflatoxinas, fumonissinas e zearalenona, está relacionada ao maior risco de desenvolvimento de neoplasia de mama em cadelas (FREHSE et al., 2015)

Na abordagem de uma cadela portadora de tumor de mama devem ser registrados aspectos como consistência dos nódulos, número, localização, tamanho, sinais de aderência aos tecidos circundantes, deformação das mamas e ulceração da pele. Cadelas idosas, com idade entre 10 e 11 anos tem maior probabilidade de apresentar tumor de mama e cães de qualquer raça, ou sem raça definida podem ser acometidos, apesar do Boxer e o Beagle serem citados como raças predispostas (LANA et al., 2007; QUEIROGA, 2002).

Aproximadamente 75% dos tumores ocorrem nas mamas abdominais caudais ou inguinais, provavelmente devido ao maior volume glandular nessa região (LANA et al., 2007). Clinicamente, sugere-se que tumores maiores tenham comportamento mais maligno que tumores menores (FELICIANO et al., 2008). Os linfonodos axilares e inguinais, devem ser examinados quanto à consistência, tamanho e, caso sejam considerados suspeitos, podem ser submetidos à aspiração por agulha fina ou biopsia. Embora não seja possível estabelecer um diagnóstico clínico acerca de malignidade dos tumores, alguns aspectos clínicos podem ser levados em consideração, pois quase sempre se relacionam a malignidade, entre eles a velocidade de crescimento, ou seja, quanto mais rápido, maior a malignidade, margens mal definidas, aderência aos tecidos adjacentes, presença de ulceração e inflamação intensa, linfadenomegalia regional e sinais de dispneia, que pode sugerir a presença de metástase pulmonar. O crescimento do tecido tumoral é facilitado pela formação de novos vasos que suprem o aporte de oxigênio e nutrientes necessários. Estudos permitiram a verificação de que a fase de crescimento acelerado do tumor é precedida por um aumento local na densidade dos

vasos (ALGIRE; CHALKLEY, 1945). O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma proteína produzida pelas células neoplásicas que age como mitógeno específico sobre vasos linfáticos, artérias e veias, além de ter influência sobre a inibição de apoptose (PLATE, 2001).

O exame radiográfico sempre deve ser realizado em três projeções para se avaliar a presença de metástase pulmonar, já que o pulmão é o principal órgão alvo de metástase das neoplasias mamárias (LANA et al., 2007). O diagnóstico definitivo pode ser obtido por meio de citopatologia, e, principalmente por avaliação histopatológica (MISDORP et al., 1999, CASSALI et al., 2014).

De acordo com autores de artigos internacionais, cerca de 54 % dos tumores de mama na cadela são benignos (MISDORP, 2002, ITOH et al. 2005; SORENMO et al., 2013), havendo discrepâncias quando comparados à maioria dos artigos brasileiros, que referem de 68 à 91% de prevalência de tumores malignos (ZUCCARI et al. 2001; De NARDI et al. 2002; MARTINS et al. 2002; OLIVEIRA et al. 2010). Entre os tumores benígnos mais frequentes estão o tumor misto benigno, que, devido ao fato de poder apresentar graus de pleomorfismo e outras atipias, pode dificultar a diferenciação de carcinomas (CASSALI et al., 2014). Devido a existência de variações nas classificações histológicas para as neoplasias mamárias, de acordo com o critério utilizado, há uma certa variabilidade acerca de informações sobre quais os padrões histológicos para tumores malignos mais frequentes no Brasil (CASSALI et al., 2014).

Antes de se definir um protocolo terapêutico, deve se proceder ao estadiamento clínico da doença. Para as neoplasias mamárias se propõem a utilização da classificação TNM modificada, proposta pela Organização Mundial da Saúde (OWEN, 1980), onde T refere-se ao tamanho do tumor, N refere-se a metástase presentes em linfonodos e M refere-se a presença de metástase distante (Quadro 1). Após verificadas as informações necessárias para a classificação TNM, é então realizado o estadiamento segundo Cassali et al., 2014 (Quadro 2).

Quadro 1 – Classificação TNM para neoplasias mamárias em cadelas.

T – TUMOR PRIMÁRIO
T ₁ < 3cm
T ₂ 3 – 5 cm
T ₃ > 5 cm
N – LINFONODOS REGIONAIS
N ₀ Sem evidência de metástase (Citologia ou Histologia)
N ₁ - Com metástase detectada (Citologia ou Histologia)
M – METÁSTASE DISTANTE
M ₀ Metástase distante não detectada
M ₁ Metástase distante detectada

Fonte: CASSALI et al., 2014

Quadro 2 – Estadiamento Clínico para Neoplasias Mamárias em Cadelas.

TNM ESTÁGIO	T – TUMOR	N - LINFONODO	M – METÁSTASE
I	T ₁	N ₀	M ₀
II	T ₂	N ₀	M ₀
III	T ₃	N ₀	M ₀
IV	Qualquer T	N ₁	M ₀
V	Qualquer T	Qualquer N	M ₁

Fonte: CASSALI et al., 2014.

O tratamento para a grande maioria dos tumores de mama baseia-se na remoção cirúrgica com margens de segurança. As técnicas cirúrgicas podem ser desde a retirada de um nódulo por lumpectomia, mastectomia simples, mastectomia regional, mastectomia total unilateral e total bilateral. A decisão pela técnica deve levar em consideração o tamanho do tumor, localização e consistência. A remoção cirúrgica não é indicada quando se trata de carcinoma inflamatório ou quando o animal já apresenta metástases distantes. A quimioterapia pode ser benéfica em alguns casos, sendo que os fármacos antiestrogênicos, antiprogesterina ou antiprolactina podem ser usados (HEDLUND, 2008). Porém, segundo

LANA et al. (2007), tanto os protocolos de quimioterapia como a radioterapia, mostram-se pouco eficientes no tratamento das neoplasias mamárias em cadelas e gatas.

As neoplasias mamárias podem estar relacionadas a uma série de alterações sistêmicas denominadas de síndromes paraneoplásicas. Um estudo realizado por RIBAS, 2009, onde foram avaliadas 36 cadelas portadoras de tumor de mama, foram detectadas diversas alterações hematológicas, hiperglicemia, aumento sérico de fibrinogênio, hiponatremia, hipercalcemia em um número significativo de animais, demonstrando que as neoplasias mamárias podem também ser a causa de outros distúrbios não relacionados à presença local do tumor ou suas metástases. Em um estudo realizado em 15 cadelas com tumor de mama avaliou-se as mudanças no *status* oxidativo por meio de dosagens de biomarcadores de dano oxidativo, concentrações de metais como ferro, cobre e zinco, além do ácido ascórbico, como antioxidante. Observou-se a ocorrência de estresse oxidativo revelado pela presença de níveis elevados de biomarcadores de lipoperoxidação de membranas celulares e diminuição significativa de ácido ascórbico. Os autores sugerem em suas conclusões que os espécimes reativos de oxigênio gerados pela presença de elementos como ferro e cobre que atuam como catalisadores na sua formação podem estar relacionados à gênese dos tumores mamários (ASKAR et al., 2009).

2.2 CÁLCIO

O cálcio, um mineral presente no organismo em concentrações intra e extra-celulares, apresenta funções essenciais relacionadas ao transporte e estabilidade das membranas plasmáticas, coagulação sanguínea, transmissão de impulsos nervosos, reações enzimáticas, secreção hormonal, formação e reabsorção óssea, manutenção do tônus da musculatura lisa dos vasos, atuando ainda no metabolismo do glicogênio hepático, divisão e crescimento celular (KLEIN, 2014; SANTALUCIA et al., 2013). A maior concentração de cálcio no organismo está nos ossos, ou seja, 98 a 99% do cálcio está armazenado na forma de hidroxapatita no esqueleto e o restante está distribuído nos tecidos e no fluido extracelular (DIBARTOLA, 2006). No sangue, o cálcio pode apresentar-se em três formas: quelado a íons (por exemplo ao bicarbonato e fosfato), ligado a proteínas e na forma ionizada. A forma ionizada é considerada a única biologicamente ativa, disponível para funções e atividades extracelulares, desempenhando a função de íon regulador em muitos processos biológicos (HAZEWINKEL, 2012; MANNING, 2001).

A homeostasia do cálcio é um processo complexo, regulado principalmente por controles hormonais que determinam o movimento do íon entre o fluido extracelular e o tecido ósseo, e também entre o sistema digestório e os rins (KLEIN, 2014). A manutenção hormonal dos níveis extracelulares de cálcio de forma constante é essencial para atender as demandas fisiológicas e está diretamente relacionada ao metabolismo nos ossos. Os três hormônios que desempenham papel fundamental na homeostasia do cálcio são o paratormônio, a calcitonina e o calcitriol (HAZEWINKEL, 2012). O paratormônio, produzido nas glândulas paratireoides, tem a função de aumentar a reabsorção óssea de cálcio. Quando os níveis sanguíneos de cálcio ionizado estão diminuídos, a paratireoide é estimulada a secretar este hormônio, com o objetivo de regular as concentrações séricas deste íon. Além disso, o paratormônio age também nos rins, aumentando a reabsorção de cálcio, ativando calcitriol e aumentando a diurese do fosfato (KINI; NANDEESH, 2012). A calcitonina, sintetizada na tireoide, tem o papel de antagonizar os efeitos do paratormônio, ou seja, quando as concentrações de cálcio ionizado estão aumentadas, este hormônio passa a ser secretado, inibindo a reabsorção óssea de cálcio, bem como o aumento na sua excreção renal (DICKSON, 1993). Por fim, o calcitriol, o único metabólito ativo da vitamina D, tem sua função reguladora associada ao paratormônio, que estimula sua síntese nos rins, com o objetivo de aumentar a absorção intestinal do cálcio e diminuir a excreção renal. O hormônio calcitriol também tem a função de sensibilizar as paratireoides ao aumento dos níveis de cálcio ionizado, levando dessa forma, à regulação da secreção do paratormônio (TRYFONIDOU, 2003).

Em algumas situações clínicas específicas podem ser encontradas alterações nos níveis séricos de cálcio. Importante salientar que as alterações podem estar relacionadas a erros laboratoriais, falhas durante a colheita e manutenção das amostras e também devido a erros de interpretação dos resultados, uma vez que as dosagens de cálcio total, por exemplo, são diretamente influenciadas por hiperlipemia, hiperbilirrubinemia, hemólise, idade, jejum e, principalmente, pela concentração de proteínas plasmáticas e albumina (BARAL; LITTLE, 2011; BONCZYNSKI, 2007; GREEN; SCHEW, 2009; SCHENK; SCHEW, 2008). Apesar do fato da fração biologicamente ativa do cálcio ser a fração ionizada, geralmente se faz, pelo menos inicialmente a dosagem de cálcio total, utilizando fórmulas para correção e obtenção dos valores do cálcio ionizado, ajustando a concentração do cálcio total às concentrações de proteínas e albumina (BONCZYNSKI, 2007). Porém, alguns estudos já demonstraram que, como as fórmulas usadas para correção dos valores de cálcio total foram estabelecidas sem confirmação de valores laboratoriais de cálcio ionizado, uma considerável discordância pode

ocorrer (SCHENK; SCHEW, 2005, 2006, 2010). Em um estudo em que foram avaliadas 1633 amostras de soro canino, quando a concentração de cálcio total foi utilizada para prever a fração ionizada, a discordância chegou a 27% (SCHENK; SCHEW, 2005). Segundo Barber (2013), apenas a determinação direta da concentração de cálcio ionizado deve ser considerada, e não a sua previsão através de fórmulas de correção.

2.2.1 Hipercalcemia Maligna

A hipercalcemia é caracterizada pelo aumento dos níveis séricos de cálcio ionizado acima de 1,45 mmol/L ou 2,99 mmol/L para o cálcio total (DELANEY; NELSON; ELLIOT, 2009). A causa mais frequente de hipercalcemia em cães é a presença de neoplasias, sendo nestes casos denominada de hipercalcemia maligna e considerada uma síndrome paraneoplásica. Em aproximadamente dois terços dos cães com hipercalcemia se diagnostica uma neoplasia (ELLIOT, 1991; WITHROW, 2007). O linfoma é a principal causa de hipercalcemia maligna em cães, sobretudo quando na forma mediastinal, porém outras neoplasias como carcinomas de sacos anais, carcinomas de tireoide, mielomas múltiplos, neoplasias ósseas, timomas, carcinomas de células escamosas, carcinomas mamários, melanomas, tumores primários de pulmão, leucemias linfocíticas crônicas e tumores da paratireoide já foram associadas à hipercalcemia (WITHROW, 2007; ELLIOT, 1991; JARK et al., 2011). A incidência da hipercalcemia maligna em cães é desconhecida, porém entre 10 a 35% dos cães com linfoma e 26 a 56% dos cães com carcinoma de saco anal apresentam a condição (GALVÃO, 2011; POLTON, 2007, WITHROW, 2007). Em um estudo retrospectivo em cães com hipercalcemia (n=109) observou-se que 78% dos animais apresentavam linfoma, 11% carcinomas em locais variados e 6% carcinomas de saco anal (MESSINGER, 2009). Em humanos portadores de neoplasias, a frequência de hipercalcemia varia entre 5 a 30% dos pacientes (FARIAS, 2005), e nas neoplasias malignas a ocorrência é de 20 a 30% e acompanhada de uma apresentação clínica rápida e aguda, com prognóstico reservado e sobrevida média de 4 a 8 semanas (FORGA et al., 2005).

A hipercalcemia maligna pode ocorrer devido a três diferentes mecanismos: *i.* produção de fatores humorais pelas células neoplásicas (ou hipercalcemia humoral maligna), *ii.* neoplasias ósseas primárias ou metastáticas, *iii.* neoplasias malignas da medula óssea (MAXIE, 2007). A hipercalcemia maligna associada a neoplasias ósseas ou da medula óssea é decorrente dos efeitos osteolíticos locais, enquanto que a hipercalcemia humoral maligna é

mediada por fatores que exercem o seu efeito num local distante da neoplasia, representando um exemplo clássico de uma síndrome paraneoplásica (VASIPOULOS; MACKIN, 2003).

A hipercalcemia humoral maligna ocorre com maior frequência devido à produção de um polipeptídeo denominado de proteína relacionada ao paratormônio (PTHrP), embora outros fatores celulares possam também estar relacionados, como interleucina – 1, fator de necrose tumoral alfa, fatores transformadores de crescimento alfa e beta, prostaglandinas, fatores ativadores de osteoclastos e calcitriol (SCHENK; SCHEW, 2006; VASIPOULOS; MACKIN, 2003). Em animais saudáveis, a PTHrP pode ser detectada em concentrações muito baixas, menores que 1 pmol/L e está relacionada principalmente a mecanismos de comunicação intercelular parácrina (GAJANAYAKE, 2010) e também ao transporte do cálcio para o leite durante a lactação. A PTHrP também possui um importante papel durante a vida fetal, sendo o principal hormônio regulador da homeostase do cálcio (MAXIE, 2007).

Em humanos a hipercalcemia maligna ocorre devido a produção de PTHrP em 80% dos casos. Os tumores mais relacionados à secreção de PTHrP são os carcinomas de células escamosas (cabeça, pescoço, esôfago, cérvix, pulmões, pâncreas), carcinomas de rim, bexiga, ovário, endométrio, de mama e os linfomas. No entanto, todas as células neoplásicas têm o potencial de produzir PTHrP e portanto, mesmo metástases podem induzir hipercalcemia humoral maligna (ATTIA et al., 2003; FARIAS, 2005; IWAY; OHNO, 2004; MATSEN, 2005). Segundo Farias (2005), além da relação entre secreção de PTHrP e reabsorção óssea esquelética difusa, gerando o quadro de hipercalcemia, este polipeptídeo também está associado à angiogênese em alguns tumores.

Nas neoplasias mamárias malignas que ocorrem na mulher, alguns mecanismos distintos relacionados à ocorrência da hipercalcemia maligna podem ser enfatizados. A produção de PTHrP e outras citocinas pelas células neoplásicas, além de promover a reabsorção óssea de cálcio, também influenciam a liberação de fatores de crescimento presentes na matriz óssea das metástases, que estimulam o crescimento das células malignas, fechando uma espécie de ciclo vicioso (KHOSLA, 2001). As células das neoplasias malignas de mama também podem induzir as plaquetas a produzirem o ácido lisofosfatídico nos locais de ocorrência de metástase, levando ao crescimento tumoral e destruição óssea mediada por citocinas, favorecendo a osteólise e a hipercalcemia (BOUCHARABA et al., 2004).

Outras causas de hipercalcemia não relacionadas às síndromes paraneoplásicas são o hiperparatireoidismo, insuficiência adrenal, insuficiência renal, alguns medicamentos de uso crônico como os diuréticos, entre outras causas menos frequentes (NELSON, 2009).

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO

Radicais livres, estresse oxidativo e seus efeitos sobre tecidos e células, há mais de quarenta anos são protagonistas de um expressivo número de estudos na medicina humana (SALVADOR; HENRIQUES, 2004). Mais recentemente, o tema vem ganhando espaço na medicina veterinária. Muitas são as possibilidades de realização de pesquisas correlacionando o estresse oxidativo às doenças, produção de radicais livres durante a atividade física e seus efeitos sobre o organismo animal (ARAUJO et al., 2010), utilização de antioxidantes, métodos para detecção e quantificação do estresse oxidativo, enfim, um vasto campo a ser desvendado nas ciências veterinárias. Nos processos decorrentes da respiração celular, o oxigênio, elemento imprescindível para a produção de energia para o metabolismo celular e oxidação de compostos orgânicos é consumido e reduzido, gerando uma série de substâncias químicas altamente reativas denominadas espécies reativas de oxigênio (ERO), conhecidos também como radicais livres (DALLAQUA; DAMASCENO, 2011). O termo radical livre é utilizado para designar uma molécula ou átomo altamente reativo, com um ou mais elétrons desemparelhados na última camada eletrônica. Em altas concentrações os ERO podem interagir com biomoléculas componentes de tecidos, membranas celulares e organelas, provocando injúria (VALKO et al., 2007). Em condições normais, o organismo tem condição de neutralizar os efeitos dos radicais livres utilizando suas defesas antioxidantes. Em situações de desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes, a produção de radicais livres excede a capacidade orgânica de neutralização, resultando em estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1996).

Dentre todos os componentes celulares atingidos pelos efeitos nocivos dos ERO, as membranas celulares são as estruturas mais severamente acometidas, devido à peroxidação lipídica, que leva, invariavelmente, a alterações estruturais e também na sua permeabilidade (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A quantificação dos ERO formados durante o estresse oxidativo é questionável, em razão de suas baixíssimas concentrações e alta velocidade com que reagem com outras biomoléculas, por isso, as tentativas de mensuração do estresse oxidativo baseiam-se na aferição indireta dos efeitos dos ERO, ou seja, na mensuração de seus subprodutos após reação com biomoléculas (FLOYD, 1990).

Na peroxidação lipídica da membrana celular, alguns subprodutos podem ser detectados e mensurados nos tecidos, sangue e outros fluidos corpóreos. A dosagem sérica de malondialdeído (MDA) é habitualmente utilizada para quantificar a lipoperoxidação da membrana celular em seres vivos, espécie onde os ERO são tidos como causa ou

consequência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Há anos a medicina humana se dedica ao estudo dos radicais livres, do estresse oxidativo e de suas consequências ao organismo vivo. Estudos na área tiveram um grande crescimento a partir da década de 70. Inicialmente, enfatizou-se a compreensão dos efeitos nocivos das radiações ionizantes. Verificou-se que a energia liberada por este tipo de radiação levava a alterações nas órbitas dos elétrons, tornando os átomos, principalmente o oxigênio, altamente reativo, levando a formação de moléculas como oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, consideradas radicais livres (SALVADOR; HENRIQUES, 2004). Atualmente, a associação entre doenças e estresse oxidativo como o câncer, a aterosclerose, a fibromialgia, as doenças auto-imunes, além de processos relacionados ao envelhecimento está bem estabelecida (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1996; FINKEL; HOLBROOK, 2000; BAGIS et al., 2005). Na espécie canina ou em outros animais domésticos de interesse da medicina veterinária, os estudos sobre essas associações são recentes e ainda escassos (GALVÃO, 2009).

2.3.1 Espécimes Reativos De Oxigênio

Pode-se afirmar que, em todos os sistemas biológicos, estão presentes os ERO. Em condições fisiológicas durante o metabolismo celular aeróbio, o oxigênio sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (H_2O) e outros compostos intermediários reativos como os radicais superóxido (O_2^-), hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (COHEN, 1989). O radical superóxido ocorre em quase todas as células aeróbicas, e é produzido durante a ativação de neutrófilos, monócitos, eosinófilos e macrófagos. É considerado pouco reativo, porém, algumas lesões biológicas secundárias têm sido observadas em sistemas que o geram. O radical superóxido protonado, ou seja, com um radical hidrogênio, pode ser denominado hidroperoxila, e parece ser bem mais reativo que o superóxido, uma vez que demonstra facilmente a indução de lesão em membranas biológicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). O radical hidroxila (OH) é considerada o ERO mais reativo em sistemas biológicos. Pode combinar-se rapidamente com outros radicais ou com metais no próprio local onde foi produzido. Pode levar a desativação ou mutações no DNA, inativação de proteínas e oxidação de ácidos graxos de membranas celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1996). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), apesar de não apresentar um elétron desemparelhado, também é um ERO, bastante deletério por estar diretamente relacionado à produção do radical hidroxila. Este radical é altamente tóxico para a célula, pois

além de ter meia vida longa, tem capacidade de atravessar camadas lipídicas e se ligar a proteínas ligadas ao ferro, como ocorre nas hemácias, ou seja, na presença do ferro, sua toxicidade aumenta (EATON, 1991).

A participação de outros elementos como os metais, principalmente o ferro, existente em abundância no organismo, tem sido referida como catalisadora das lesões oxidativas, a ponto de ser indicado o uso de agentes quelantes de ferro em determinadas doenças, como por exemplo o traumatismo craniano em humanos (HALLIWELL, 1992). Outros produtos derivados do nitrogênio (ERN), do enxofre, cobre e manganês também podem ser considerados como radicais livres em sistemas biológicos, sendo relacionados a lesões celulares por estresse oxidativo (VASCONCELOS et al., 2007).

2.3.2 Biomarcadores de Estresse Oxidativo

O resultado da reação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio com biomoléculas é a formação de substâncias que podem ser utilizadas como marcadores de dano oxidativo. Atualmente, muitas pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de validar os biomarcadores de estresse oxidativo e há certo consenso em se afirmar que, dentre os métodos de detecção de biomarcadores, não se sabe exatamente qual o mais acurado ou mais específico para os diferentes tipos de dano oxidativo, o que torna difícil a obtenção de valores de referência absolutos para marcadores específicos em sistemas vivos (MACOTPET et al., 2013). Além disso, nos seres humanos saudáveis, fatores genéticos, nutricionais, ambientais e até mesmo culturais podem modificar o balanço redox (equilíbrio entre espécies reativas oxidantes e o sistema antioxidante) de uma população (KAADISKA et al., 2005).

Apesar desse fato, alguns biomarcadores já são utilizados rotineiramente. Os subprodutos da ação dos ERO podem ser detectados diretamente por meio de ressonância para-magnética de elétrons, porém o custo e exigências técnicas dificultam a sua utilização rotineira (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Os métodos mais utilizados atualmente detectam indiretamente a ação dos ERO, quer por meio da mensuração de produtos gerados provenientes de sua ação sobre biomoléculas, quer pela aferição da qualidade e quantidade de agentes antioxidantes, avaliando dessa forma, o dano oxidativo (MAK, 2008). Os métodos mais utilizados são os espectrofotométricos e cromatométricos que medem a atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido desmutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase. A SOD catalisa a dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio; a CAT atua decompondo o peróxido de hidrogênio à água e oxigênio e a glutathione peroxidase

atua sobre peróxidos em geral. Estas enzimas são consideradas como componentes do sistema antioxidante enzimático.

Compõe ainda o sistema antioxidante, uma série de substâncias não enzimáticas. No soro e no plasma, ou seja, no meio extracelular, pode-se encontrar diversos agentes antioxidantes não enzimáticos como a vitamina C, vitamina E e β -caroteno. Alguns autores defendem a mensuração de substâncias antioxidantes como forma de avaliar a presença de dano oxidativo, utilizando o método denominado Capacidade Antioxidante Total (CAOT), onde se considera a ação acumulativa de todos os antioxidantes presentes. Alguns autores sugerem que este método não é o melhor, uma vez que um aumento de CAOT não é necessariamente desejável, visto que as enzimas antioxidantes nem sempre estão diminuídas em condições de doença (PRIOR; CAO, 1999). Por outro lado, a detecção da presença de estresse oxidativo pode ser feita pela mensuração de biomarcadores de dano causado por ERO, por ERN e outros, como o malondialdeído (MDA), isoprostanos, lipoperóxidos e outros derivados da peroxidação lipídica das membranas celulares.

O MDA é atualmente considerado um biomarcador geral de dano oxidativo presente no plasma (KADIISKA et al., 2005). Produto da peroxidação lipídica das membranas celulares, sua quantificação em sistemas biológicos é um importante parâmetro para a avaliação do estresse oxidativo celular (PILZ et al., 2000; SIM et al., 2003). Andrade (2005) e Del Rio et al. (2005) referiram que o MDA é altamente citotóxico e genotóxico, devendo ser considerado mais que um biomarcador de dano oxidativo, devido a sua interação com DNA e outras proteínas. Níveis elevados de MDA são rotineiramente utilizados como forma de detecção de estresse oxidativo em diversas doenças em humanos, tais como, lúpus eritematoso sistêmico, diabetes, doenças pulmonares, doença de Alzheimer, câncer, entre outras, o que nos gera subsídio para a pesquisa em animais (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; ANDRADE et al., 2005; PÉREZ et al., 2012). A técnica mais utilizada para mensuração inespecífica de MDA é conhecida como quantificação de substâncias reativas ao ácido barbitúrico ou TBARS. Essa técnica quantifica produtos denominados de substâncias reativas ao ácido barbitúrico, dentre as quais o MDA é o principal componente, porém é uma técnica de baixa sensibilidade e especificidade para a detecção de aldeídos em fluidos biológicos, o que tem justificado a busca por técnicas de maior fidelidade, como a detecção de MDA (ABDALLA; SENA, 2008).

Outros biomarcadores de peroxidação lipídica, como os isoprostanos e acroleína, atualmente também são considerados como importantes fatores de determinação de dano

oxidativo em humanos e, mais recentemente em animais (LIMA; ABDALLA, 2001; MARQUIS et al., 2015).

2.3.4 Estresse Oxidativo e Doenças Relacionadas

Atualmente há evidências científicas que comprovam que muitas doenças estão relacionadas ao estresse oxidativo causado por ERO ou por ERN. Os danos mais graves são aqueles causados ao DNA ou ao RNA da célula. Quando ocorre a quebra da cadeia de DNA, ela pode se reconectar em outra posição, alterando a ordem de suas bases. Este evento é um dos processos desencadeadores de mutação, que pode estar relacionado à oncogênese. A alteração da sequência de aminoácidos de uma proteína que atue como enzima, pode levar a perda ou mudança na sua função (BARREIROS et al., 2006).

A peroxidação lipídica que ocorre nas membranas celulares interfere no transporte ativo e passivo, podendo levar à ruptura das membranas e consequente morte celular. Quando a oxidação de lipídeos ocorre no sangue, gera agressão às paredes dos vasos, favorecendo o acúmulo de lipídios, podendo desencadear aterosclerose, trombose, infarto ou acidente vascular cerebral (BARREIROS et al., 2006). Alguns estudos foram realizados em tipos específicos de neoplasias em humanos em busca de informações sobre o comportamento dos ERO e sua relação com a doença. Em um estudo em pacientes portadores de câncer colorretal, comparou-se a mucosa intestinal de indivíduos saudáveis com a mucosa intestinal de portadores da neoplasia e demonstrou-se que os níveis de dano oxidativo ao DNA foram significativamente maiores nos indivíduos doentes. Curiosamente, também no tecido normal já havia algum nível de dano oxidativo, evidenciando a importância dos ERO nas agressões iniciais à mucosa intestinal (RIBEIRO et al., 2007). Outro estudo comprovou a presença de estresse oxidativo em mulheres portadoras de câncer de mama por meio da avaliação dos níveis de capacidade antioxidante total, que estava diminuída quando comparada aos níveis observados em mulheres saudáveis. Os níveis séricos de MDA também estavam aumentados quando comparado ao grupo controle (SENER et al., 2007).

Na oncologia veterinária, a detecção de estresse oxidativo no linfoma canino também foi objeto de estudo por meio da quantificação de MDA, isoprostanos, além da determinação das concentrações de agentes antioxidantes como a vitamina E e glutathione peroxidase (WINTER et al., 2009). Aumento significativo de MDA e diminuição da capacidade antioxidante total foram constatados em 24 pacientes caninos portadores de linfoma multicêntrico (MACEDO, 2010). Em outro estudo, cães com linfoma multicêntrico apresentaram associação

significativa entre a presença de anemia e estresse oxidativo, detectado pela quantificação da glutathione redutase e peroxidase, e capacidade antioxidante total (UBUKATA, 2010). Recentemente, um estudo comparou os níveis de malondialdeído entre um grupo de 101 cães saudáveis e um grupo de 80 cães portadores de diferentes neoplasias, verificando níveis significativamente maiores de MDA entre os cães com câncer, sugerindo que estes animais se encontram em estresse oxidativo (MACOTPET et al., 2013). Nesse trabalho, a concentração sérica de MDA foi determinada pelo método conhecido por TBARS, ou seja, pela determinação sérica de substâncias reativas ao ácido barbitúrico, onde o MDA é o principal componente. Diversos estudos indicam também a relação entre dano oxidativo e o desenvolvimento de tumores mamários em cadelas, correlacionando, principalmente, valores séricos e teciduais de MDA, por meio da técnica de TBARS, e também de níveis de antioxidantes como a vitamina E e vitamina C. (SZCZUBIAL et al., 2004; FRANCISCO NETO et al., 2005; KUMARAGURUPARAN et al., 2005; ASKAR et al., 2009; GALVÃO, 2009). Askar (2009) demonstrou a existência de concentrações aumentadas de MDA e óxido nítrico (NO) e diminuição das concentrações séricas de vitamina C, considerada primeira linha de defesa antioxidante, em dez cadelas portadoras de neoplasias mamárias malignas. Além do estresse oxidativo detectado, segundo este autor, a diminuição de defesas antioxidantes como a vitamina C, poderia estar relacionada à carcinogênese.

O efeito protetor de substâncias naturais consideradas antioxidantes e citoprotetoras foi avaliado em cultivo de células de endotélio aórtico canino, submetidas à ação oxidativa do ERO peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (RIPOLL et al., 2012). Nesse estudo, os autores tiveram como objetivo averiguar a eficiência dos agentes antioxidantes taurina e L-Carnitina, já utilizados na terapêutica das cardiopatias caninas, e também da isoflavona da soja e extrato de romã, confirmando seus efeitos benéficos. Uma vez que a presença de estresse oxidativo nas cardiopatias caninas já foi estabelecida (FREEMAN et al., 2005), torna-se útil a definição da eficácia de substâncias naturais com capacidade antioxidante como estas, para que sejam incluídas e indicadas como parte do tratamento de cardiopatias caninas. Na medicina veterinária, o estresse oxidativo foi relacionado também com doença renal (GALVÃO, 2009). A capacidade antioxidante total entre cães saudáveis e cães com azotemia pré-renal foi comparada, constatando-se que os cães azotêmicos apresentaram menor capacidade antioxidante. Além disso, nesses animais, houve aceleração da apoptose dos neutrófilos, confirmando a existência de estresse oxidativo em cães azotêmicos (SILVA et al., 2013). Por outro lado, o metabolismo oxidativo, de forma fisiológica, deve ocorrer e faz parte da resposta imunológica frente ao antígeno. Ou seja, espera-se que neutrófilos normais, por exemplo,

após fagocitar microorganismos, estejam aptos a levá-los a morte em razão da ação de enzimas lisossomais e de agentes oxidantes. Um estudo *ex vivo* demonstrou que, os neutrófilos de cães saudáveis, submetidos a ação do soro de cães urêmicos, portadores de insuficiência renal, apresentaram diminuição significativa de seu metabolismo oxidativo, devido a alteração da produção de superóxidos, levando ao comprometimento da imunidade inata, similarmente ao que ocorre em humanos portadores de insuficiência renal crônica, situação onde, a inibição da produção de ERO, é prejudicial ao organismo (BARBOSA et al., 2010).

A associação entre estresse oxidativo e a síndrome de isquemia-reperfusão, é amplamente discutida na medicina humana (KUNZ et al., 2010; SILVA et al., 2002), principalmente com o objetivo de se determinar a efetividade de substâncias com potencial antioxidante e que possam ser incluídas nas condutas terapêuticas. Substâncias naturais que contenham derivados fenólicos, como por exemplo, os flavonoides, minimizam o dano oxidativo devido à sua capacidade de inibir a ação dos radicais livres, impedindo a lipoperoxidação e, desta forma, melhorando a função endotelial e neuroprotetora (MENDES, 2012). Cabe aqui citar também um recente estudo que verificou aumento nas concentrações de isoprostanos e acroleína na medula espinhal de cães portadores de mielomalácia pós-traumática, confirmando a degeneração nervosa relacionada ao estresse oxidativo, semelhante ao que ocorre em humanos portadores de neurodegeneração recorrente da medula espinhal após injúria (MARQUIS et al., 2015)

Outras afecções, inclusive cutâneas, como a demodicose também podem estar relacionadas ao estresse oxidativo (ROMANUCCI, 2011). De acordo com outros autores, que verificaram níveis diminuídos de antioxidantes endógenos, como a glutathione, catalase, cobre e zinco em cães com demodicose localizada e generalizada, a doença está relacionada à ocorrência de estresse oxidativo, sugerindo a indicação de suplementação com antioxidantes como parte da dieta (DIMRI et al., 2008). Em outro estudo, a presença de estresse oxidativo no bulbo do olho de cães portadores de catarata após facoemulsificação foi comparada entre um grupo com implante de lente intraocular e um grupo sem implantação da lente. Verificou-se por meio de determinação quantitativa de proteínas no humor aquoso e por avaliação da atividade antioxidante total, também no humor aquoso, que a presença da lente implantada, contribuiu para a ocorrência de estresse oxidativo no meio intraocular (LIMA, 2003).

Na área da reprodução, diversos estudos têm buscado relacionar estresse oxidativo com fertilidade, identificando e quantificando as substâncias antioxidantes no plasma seminal de cães férteis e sub-férteis, além de verificar os possíveis efeitos benéficos da utilização de

suplementação antioxidante na dieta (LOPES et al., 2011; ANDRADE et al., 2010). Ainda na área da reprodução, foi realizado um estudo comparando a atividade antioxidante e concentrações séricas de biomarcadores de dano oxidativo em cadelas submetidas à cirurgia de ovariectomia. Este estudo verificou um importante aumento nas concentrações de substâncias reativas ao ácido barbitúrico (TBARS) mesmo após vários dias de pós-operatório, sugerindo que estas cadelas estariam mais susceptíveis à ocorrência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (SCZUBIAL et al., 2015).

Há que se considerar ainda condições não patológicas em que pode ocorrer estresse oxidativo. Aumento significativo nos níveis da enzima antioxidante glutatona peroxidase foi observado em cadelas submetidas a exercício físico intenso de curta duração (POLIZEL, 2011). Nesse estudo, o aumento da glutatona peroxidase estaria relacionado ao aumento na produção de radicais livres, secundário ao maior consumo de oxigênio pelo organismo durante o esforço físico (RUSSO; BRACARENSE, 2016).

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, D.S.P; SENA, K.C.M. Biomarcadores de peroxidação lipídica na aterosclerose. *Revista de Nutrição*. Campinas, v.21, n.6, p.749-756, 2008.
- ALLEN, S.W.; MAHAFFEY, E.A. Canine mammary neoplasia: prognostic indicators and response to surgical therapy. *Journal of the American Animal Hospital Association*. n. 25, p. 540-546, 1989.
- ALGIRE, G.H.; CHALKLEY, H.W. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. *Journal of the National Cancer Institute*., v. 6, p.73-85, 1945.
- ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Consequências da produção de espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.34, n.2, p. 79-85, 2010.
- ANDRADE JÚNIOR, D.R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, Brasília, v. 31, n. 1, p. 60-68, 2005.
- ARAÚJO, M.B.; VOLTARELLI, F. A.; MANCHADO-GOBATTO, F.B.; MOURA, L.P.; MELLO, M.A.R.. Treinamento em diferentes intensidades e biomarcadores de estresse oxidativo e do metabolismo glicídico musculoesquelético de ratos. *Revista da Educação Física/UEM Maringá*. Maringá, v. 21, p. 695-707, 2010.

- ASKAR, T.K.; SALMANOGLU, B.; SALMANOGLU, R.; ERKAL, N.; BESKAYA, A. Changes in oxidative status and trace element levels in dogs with mammary tumours. *Acta Veterinaria*. Belgrado, v. 59, n. 4, p. 405-11, 2009.
- ATTIA, P.; PHAN, G.Q.; DURAY, P.H.; ROSENBERG, S.A. Parathyroid hormone-related protein and hypercalcemia in patients with metastatic melanoma: case report and review. *American Journal of Clinical Oncology*. v. 26, p. 42-45, 2003.
- BAGIS, S.; TAMER, L.; BILGIN, G.S.R.; GULER, H.; ERDOGAN, B.E.C. Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorder? *Rheumatology International*. Berlin, v. 25, n. 3, p. 188-190, 2005.
- BARBER, P. Disorders of Calcium Homeostasis. In: *Small Animals Practice*. v. 23: 262–269, 2013.
- BARAL, R.M.; LITTLE, S.E. Endocrinology. IN: *The Cat - Clinical Medicine and Management*. 1ª ed. Elsevier. p. 547 – 642, 2011.
- BARBOSA, T.S.; MORI, C.K.; CIARLINI, P.C. Efeito inibidor do soro urêmico sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. Belo Horizonte, v.62, n.6, p.1352-58, 2010.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. *Química Nova*. São Paulo, v.29, n.1, p.113-23, 2006.
- BERGMAN, P.J. Paraneoplastic syndromes. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. *Small Animal Clinical Oncology*. 5.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, cap.5, p.83-97, 2013.
- BONCZYNSKI, J. Primary Hyperparathyroidism in Dogs and Cats. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. v. 22, p. 70-74, 2007.
- BOUCHARABA, A.; SERRE, C.M.; GRÈS, S.; SAULNIER-BLANCHE, J.S.; BORDET, J.C.; GUGLIELMI, J. Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. *Journal of Clinical Investigation*. v. 114, p. 1714–25, 2004.
- CASSALI, G.D.; LAVALLE, G.E.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A.B.; GHEVER, C.; SOBRAL, R.; AMORIM, R.L.; OLIVEIRA, L.O.; SUEIRO, F. A.; BESERRA, H.E.O.; BERTAGNOLLI, A.C.; GAMBA, C.O.; DAMASCENO, K.A.; CAMPOS, C.B.; ARAUJO, M.R.; CAMPOS, L.C.; MONTEIRO, L.N.; NUNES, F.C.; HORTA, R.S.; REIS, D.C.; LUVIZOTTO, M.C.R.; MAGALHÃES, G.M.; RAPOSO, J.B.; FERREIRA, A.M.R.; TANAKA, N.M.; GRANDI, F.; UBUKATA, R.; BATSCHINSKI, K.; TERRA, E.M.; SALVADOR, R.C.L.; JARK, P.C.; DELECRODI, J.E.R.; NASCIMENTO,

- N.A.; SILVA, D.N.; SILVA, L.P.; FERREIRA, K.C.R.S.; FRESHE, M.S.; DI SANTIS, G.W.; SILVA, E.O.; GUIM, T.N.; KERR, B.; CINTRA, P.P.; SILVA, F.B.F.; LEITE, J.S.; MELLO, M.F.V.; FERREIRA, M.L.G.; FUKUMASU, H.; SLAGADO, B.S.; TORRES, R. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v.7, n.2, p. 38 – 69, 2014.
- COHEN, M.V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? *Annals of Internal Medicine*. Philadelphia, v.111, p.918-31, 1989.
- DALLAQUA, B.; DAMASCENO, D. C. Comprovação do efeito antioxidante de plantas medicinais utilizadas no tratamento do diabetes mellitus em animais: artigo de atualização. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. Botucatu, v.13, n.3, p. 367-37, 2011.
- DELANEY, S. J.; NELSON, R. W.; ELLIOT, D. A. Hipercalcemia. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G.; *Medicina interna de pequenos animais*. 4º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 869-872, 2009.
- DEL RIO, D.; STEWART, D.J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress metabolism and cardiovascular. *Elsevier Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. Nova Iorque, v. 15, n.4, p. 316-28, 2005.
- DE NARDI, A.B.; RODASKI, S.; ROCHA, N.S.; FERNANDES, S.C. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. *Archives of Veterinary Science*, v. 7, n. 2, 2002.
- DE NARDI, A.B.; RODASKI, S.; ROCHA, N.S.; FERNANDES, S.C. Neoplasias mamárias. In: *Oncologia em cães e gatos*. Editora. Roca, São Paulo, p.371-383, 2008.
- DIBARTOLA, S. P. *Fluid therapy in small animal practice*. 3.ed. Philadelphia: Saunders, p.210-228, 2006.
- DICKSON, W. M. Endocrinology, Reproduction and Lactation. In: SWENSON, M.J.; REECE, W. O. *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. 11a. ed. p. 629-664, 1993.
- DIMRI, U.; RANJAN, R.; KUMAR, N.; SHARMA, M.C.; SWARUP, D.; SHARMA, B.; KATARIA, M. Changes in oxidative stress indices, zinc and copper concentrations in blood in canine demodicosis. *Veterinary Parasitology*. Nova Iorque, v. 14, n. 154, p. 98-102, 2008.
- DUDA, N.C.B. Anormalidades hematológicas, bioquímicas e hemostáticas de origem paraneoplásica em fêmeas caninas com neoplasia mamária. *Dissertação (Mestrado)*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. p. 56, 2014.

- EATON, J.W. Catalases, peroxidases, glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. Amsterdam, v.118, n.1, p. 3-4, 1991.
- ELLIOTT, J. Hypercalcaemia in the dog: a study of 40 cases. *Journal of Small Animal Practice*, v. 32, n. 11, p. 564-571, 1991.
- FANTON, J.W.; WITHROW, S.J. Canine mammary neoplasia: An overview. *Califórnia Veterinarian*, v. 7, p. 12-16, 1981.
- FARIAS, M.L.F. A hipercalcemia nas malignidades: aspectos clínicos, diagnósticos e terapêuticos. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*. v. 49, n. 5, p. 816-824, 2005.
- FELICIANO, M.A.R.; JOÃO, C.F.; CARDILLI, D.J.; CRIVELARO, R.M.; VICENTE, W.R.R. Neoplasia Mamária em Cadelas: Revisão de Literatura. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*. 2012; Ano IX (10). Disponível em: www.revista.inf.br/veterinaria18/revisão/RV01.pdf Acessado em 25/09/2012.
- FELICIANO, M.A.R.; VICENTE, W.R.R.; LEITE, C.A.L. Abordagem ultrassonográfica da neoplasia mamária em cadelas: revisão de literatura. *Revista brasileira de reprodução animal*. v.32, n.3, p.197-201, 2008.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: Conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica do Brasil*. São Paulo, v. 43, n.1, p.61-8, 1997.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and biology of ageing. *Nature*. Londres, v. 9, n. 408, p. 239-47, 2000.
- FORGA, L.; ANDA, E.; ESTEBAN, J.P.N. Paraneoplastic Hormonales Syndromes. *Anales del Sistema Sanitário de Navarra, Pamplona*. v. 28, n.2, p.213-26, 2005.
- FLOYD, R.A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *The Journal of the Federation of American Societies of Experimental Biology*. Nova Iorque, v. 4, p. 2587-97, 1990.
- FRANCISCO NETO, A.; SILVA, J.C.C.B.; FAGUNDES, D.J.; PERCÁRIOS, N.F.; JULIANO, Y.; MOREIRA NETO, A.A. Estudo das alterações oxidativas, da capacidade antioxidante total e do óxido nítrico, em ratos submetidos à isquemia e reperfusão de membros posteriores. *Acta Cirúrgica Brasileira*. São Paulo, v. 20, n. 2, p. 48-56, 2005.
- FREEMAN, L.M.; RUSH, J.E.; MILBURY, P.E.; BLUMBERG, J.B. Antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in dogs with congestive heart failure. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. Lakewood, v.19, p. 537-41, 2005.

- FREHSE, M. S.; MARTINS, M. I. M.; ONO, E. Y. S.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; BISSOQUI, L. Y.; TEIXEIRA, E. M. K.; FREIRE, R. L. Aflatoxins ingestion and canine mammary tumors: There is an association? *Food and Chemical Toxicology*, v. 84, n. 7, p. 4e78, 2015.
- GALVÃO, A.L.B. Estresse oxidativo nos estágios finais da doença renal crônica em pequenos animais. *Archives of Veterinary Science*. Curitiba, v. 14, n. 3, p.178-86, 2009.
- GALVÃO, J.B.; CHEW, D.J.; SCHENCK, P.A. Hipercalcemia: Diagnóstico e Opções de Tratamento no Cão e no Gato. *Veterinary Focus*. v. 21, p. 27-34, 2011.
- GAJANAYAKE, I.; PRIESTNALL, S.L.; BENIGNI, L.; ENGLISH, K.; SUMMERS, B.A.; GARDEN, O.A. Paraneoplastic Hypercalcemia in a Dog with Benign Renal Angiomyxoma. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v. 22, p. 775–780, 2010.
- GREEN, T.; CHEW, D.J. Calcium Disorders. In: *Small Animal Critical Care Medicine*. 1^a ed .Elsevier. p. 233 -239, 2009.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*. Oxford, v. 59, p. 1.609-23, 1992.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen free radical and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archives of Biochemistry Biophysics*. Nova Iorque, v. 246. p. 501-14, 1996.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Ezymology*. Nova Iorque, v.186, p.1-85, 1990.
- HAZEWINKEL, H. Nutritional Management of Orthopedic Diseases. In: A. FASCETTI, & S. DELANEY, *Applied Veterinary Clinical Nutrition*. West Sussex, UK: Willey Blackwell, p. 125-156, 2012.
- HEDLUND, C.S. Cirurgias do Sistema Reprodutor. In: *Cirurgia de Pequenos Animais*. 3ed. Mosby Elsevier, p.731-732, 2008.
- ITOH, T.; UCHIDA, K.; ISHIKAWA, K.; KUSHIMA, K.; KUSHIMA, E.; TAMADA, H.; MORITAKE, T.; NAKAO, H.; SHII, H. Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: Differences between small-breed dogs and others. *Journal of Veterinary Medicine Science*. v. 67, n. 3, p. 345-347, 2005.
- IWAI, H.; OHNO, Y.; AOKI, N. Anaplastic thyroid carcinoma with humoral hypercalcemia of malignancy (HHM): an autopsy case report. *Endocrinology Journal*. v. 51, p. 303- 310, 2004.
- JARK, P.C.; MONTEIRO, L.N.; GRANDI, F. ROCHA, N.S.; LOURENÇO, M.L.G.; MACHADO, L.H.A. Hipercalcemia maligna secundária a carcinoma do saco anal em um cão:

a importância da identificação das síndromes paraneoplásicas. *Veterinária e Zootecnia*. v. 18, n. 4, p. 558-562, 2011.

JOHNSTON, S.D. Reproductive systems. In: SLATTER, D. *Textbook of small animal surgery*. 2 ed. Philadelphia: Saunders, v.2, p. 2177-2199, 1993.

KADIISKA, M.B.; GLADEN, B.C.; BAIRD, D.D.; GERMOLEC, D.; GRAHAM, L.B.; PARKER, C.E.; NYSKA, A.; WACHSMAN, J.T.; AMES, B.N.; BASU, S.; BROTH, N.; FITZGERALD, G.A.; FLOYD, R.A.; GEORGE, M.; HEINECKE, J.W.; HATCH, G.E.; HENSLEY, K.; LAWSON, J.A.; MARNETT, L.J.; MORROW, J.D.; MURRAY, D.M.; PLASTARAS, J.; ROBERTS, L.J.; ROKACH, J.; SHIGENAGA, M.K.; SOHAL, R.S.; SUN, J.; TICE, R.R.; VAN THIEL, D.H.; WELLNER, D.; WALTER, P.B.; TOMER, K.B.; MANSON, R.P.; BARRETT J.C. Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation of lipids, proteins and DNA markers of CCl₄ poisoning? *Free Radical Biology and Medicine*. Nova Iorque, v.38, n. 6, p. 698-710, 2005.

KHOSLA, S. Minireview: The OPG / RANKL / RANK system. *Endocrinology*. v.142, p. 5050-5, 2001.

KINI, U.; NANDEESH, B. N. Physiology of Bone Formation, Remodeling and Metabolism. In: I. FOGELMAN, G.; H. WALL, *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*. p. 29-57, 2012.

KLEIN, G.B. *Cunningham: Tratado de Fisiologia Veterinária*. 5a. ed. Elsevier: Rio de Janeiro. 588 p. 2014.

KUMARAGURUPARAN, R.; BALACHANDRAN, C.; MANOHAR, B.M.; NAGINI, S. Altered oxidant-antioxidant profile in canine mammary tumours. *Veterinary Research Communications*. Nova Iorque, v. 29, n. 4, p. 287-96, 2005.

KUNZ, A.; DIRNAGL, U.; MERGENTHALER, P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. *Best Practice & Research: Clinical Anaesthesiology*, Berlin. v. 24, p. 495-509, 2010.

LANA, S.E.; RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J; VAIL, D.M. *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 4a. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, p.619-636, 2007.

LIMA, A.L. Estudo comparativo de estresse oxidativo após facoemulsificação experimental com e sem implante de lentes intra-oculares em cães. *Dissertação de mestrado*, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 134p. 2003.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. São Paulo, v. 37, p. 59-64, 2001.

- LOPES, B.V.; MONTEIRO, G.A.; OVÍDIO, P.P.; JORDÃO JÚNIOR, A.A.; LOPES, M.D. Avaliação do estresse oxidativo no plasma seminal de cães férteis e subférteis após suplementação oral com vitamina C e E. *Veterinária e Zootecnia*. São Paulo, v. 18, n. 3, p.452-61, 2011.
- MACEDO, T.R. Avaliação das concentrações de superóxido dismutase e da fragilidade osmótica eritrocitária em cães com linfoma multicêntrico com e sem anemia. *Dissertação de Mestrado*, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 96p., 2010.
- MACOTPET, A.; SUKSAWAT, F.; PEERAPOL, S.; PIMPAKDEE, K.; PATTARAPANWICCHIEN, E.; TANGRASSAMEEPRASERT, R.; BOONSIRI, P. Oxidative stress in cancer-bearing dogs assessed by measuring serum malondialdehyde. *BMC Veterinary Research*. Nova Iorque, v. 9, p. 101-105, 2013.
- MAK, J.C. Pathogenesis of COPD. Part II. Oxidative-antioxidative imbalance. *International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases*. Paris, v. 12, p.368-74, 2008.
- MANNING, A.M. Electrolytes Disorders. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.31, p.1289-1321, 2001
- MARQUIS, A.; PACKER, R.A.; BORGENS, R.B.; DUERSTOCK, B.S. Increase in oxidative stress biomarkers in dogs with ascending-descending myelomalacia following spinal cord injury. *Journal of Neurological Sciences*. Amsterdam, Available online, Abril, 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022510X15002002>. Acesso em 18/04/2015.
- MARTINS, A.M.C.R.P.; TAMASO, E.; GUERRA, J.L. Retrospective review and systematic study of mammary tumors in dogs and characteristics of the extracellular matrix. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 39, n. 1, p. 38-42, 2002.
- MARTINS, D.C.; FERREIRA, A.M.R. Marcadores prognósticos como um auxílio à conduta clínico-cirúrgica em uma cadela apresentando múltiplos nódulos mamários. *Acta Scientiae Veterinariae*. v. 31, p.189-191, 2003.
- MACEWEN, E.G.; WITHROW, S.J. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. *Small animal clinical oncology*. 2 ed. Philadelphia: Saunders, p.356-372, 1996.
- MATSEN, S.L.; YEO, C.J.; HRUBAN, R.H.; CHOTI, M.A. Hypercalcemia and pancreatic endocrine neoplasia with elevated PTH-rP: report of two new cases and subject review. *J Gastrointestinal Surgery*. v. 9, p. 270-279, 2005.

- MAXIE, G. Calcium-Regulating Hormones. In: *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals*. Elsevier. Elsevier. p.351–378, 2007.
- MENDES, F. F. Efeito neuroprotetor do extrato etanólico da casca de pequi em lesões de isquemia e reperfusão cerebral de ratas submetidas a dieta hipercalórica. *Dissertação de Mestrado*. Pós-graduação em ciência animal. Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás. Goiania, Goiás. 76p., 2012.
- MESSINGER, J.S.; WINDHAM, W.R.; WARD, C.R. Ionized Hypercalcemia in Dogs: A Retrospective Study of 109 Cases (1998-2003). *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 23, p.514–519, 2009.
- MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. In: *World Health Organization international histological classification of tumors of domestic animals*. 2ed. v.VII. Washington, D.C. Armed Forces Institute of Pathology in cooperation with the American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating. Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology, 1999.
- MISDORP W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN D.J. *Tumors in domestic animals*, 4th ed. Ames: Iowa State Press, p. 575–606, 2002.
- MORRIS, J.S.; DOBSON, J.M.; BOSTOCK, M. Effect of ovariohysterectomy in bitches with mammary neoplasms. *The Veterinary Record*. v.142, p.656-658, 1998.
- NELSON, R.W.; COUTO, G.C. Electrolyte Imbalances. In: *Small Animal Internal Medicine*. 4ª ed. Mosby Elsevier. p. 872-876, 2009.
- OLIVEIRA, V. F. Síndromes paraneoplásicas em oncologia veterinária. In: *Seminário apresentado junto à Disciplina Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás*, 2010, Goiânia. Disponível em < http://extras.ufg.br/uploads/67/original_Vilma_Oliveira_1.pdf>. Acesso em 8 ago. 2014.
- OSIPOV, N.E.; LAGOVA, N.D.; PONMARKOV, V.I. Spontaneous mammary gland tumors of dog as a model for experimental tumor therapy. *Bulletain of Experimental Biology and Medicine* v.74, p.948, 1972.
- OWEN, LN. TNM Classification of tumors in domestic animals. Ed. Geneva: *World Health Organization*, 1980.
- PÉREZ, G. Y.; PÉREZ, L.C.G.; NETTO, R.C.M.; LIMA, D.S.N.; LIMA, E.S. Malondialdeído e grupo sulfidrilado como biomarcadores do estresse oxidativo em pacientes com lúpus

- eritematoso sistêmico. *Revista Brasileira de Reumatologia. Campinas*, v. 52, n. 4, p. 656-660, 2012.
- PILZ, J.; MEINECKE, I.; GLEITER, C. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *Journal of Chromatography*. Amsterdam, B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci., v. 742, p.315-325, 2000.
- PLATE, K.H. From angiogenesis to lymphoangiogenesis. *Nature medicine*. v. 2, n. 7, p. 151-52, 2001.
- POLIZEL, A. Avaliação laboratorial do estresse oxidativo e eletrocardiografia de cadelas submetidas a exercício. *Dissertação de Mestrado*. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente, SP. 39p., 2011.
- POLTON, G.A.; BREARLEY, M.J. Clinical stage, therapy, and prognosis in canine anal sac gland carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 21, p.274-80, 2007.
- PRIOR, R.L.; CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*. Elmsford, v. 27, p.1173-81, 1999.
- QUEIROGA, F.L.C. Tumores mamários caninos – novas perspectivas. In: Congresso de Ciências Veterinárias, Oeiras. *Anais do Congresso de Ciências Veterinárias de Oeiras*. p. 183-190, 2002.
- RIBAS, C.R. Ocorrência de Síndromes Paraneoplásicas em cães, com base nas alterações clínicas, laboratoriais e patológicas. *Dissertação (Mestrado)*. Centro de Ciências agrárias e ambientais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. 113 p., 2009.
- RIBEIRO, M.L.; PRIOLLI, D.G.; MIRANDA, D.D.C.; PAIVA, D.A.; PEDRAZZOLI JÚNIOR, J.; MARTINEZ, C.A.R. Avaliação do dano oxidativo ao DNA de células normais e neoplásicas da mucosa cólica de doentes com câncer colorretal. *Revista Brasileira de Coloproctologia*. Rio de Janeiro, v. 27, n.4, p. 391-402, 2007.
- RIPOLL, C.; COUSSAERT, A.; WALDENBERGER, F.R.; VISCHER, C.; GINOUVÉS, A.; MCGAHIE, D.; GATTO, H. Evaluation of natural substances protective effects against oxidative stress in a newly developed canine endothelial cell-based assay and in cell-free radical scavenging assays. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. Apopka, v. 10, n. 2, p.113-24, 2012.
- ROMANUCCI, M. Oxidative stress in the pathogenesis of canine zinc-responsive dermatosis. *Veterinary dermatology*, v. 22, n. 1, p. 31-38, 2011.
- RUSSO, C.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Oxidative Stress in Dogs: Review. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 37, n. 3, p. 1431-1440, 2016.

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J.A.P. *Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo*. Canoas: Ed. Ulbra, Canoas, 204 p., 2004.

SANTALUCIA, S.; SILVA NETO, H.; CRISSIUMA, A.L.; CORRÊA, L.F.D.; CASTRO, J.L.C.; CASTRO, V.S.P; COUTINHO JÚNIOR, A.S.; BRUN, M.V.; RAISER, A.G. Fisiologia dos Líquidos Corporais em Cães e Gatos. *Revista da FZVA, Uruguaiana*. v. 19, n.1, p.61-78. 2013.

SCHENCK, P. Electrolyte Disorders: Ca-P and Mg. In: S. J. ETTINGER; E. C. FELDMAN, *Textbook of Veterinary Internal Medicine. 7a. ed.* Missouri, USA: Saunders Elsevier. p. 299-314, 2010.

SCHENCK, P.A.; CHEW, D.J. Prediction of Serum Ionized Calcium Concentration by Use of Serum Total Calcium Concentration in Dogs. *American Journal of Veterinary Research*. v. 66, p. 1330–1336, 2005.

SCHENCK, P.A.; CHEW, D.J. Diseases of the Parathyroid Gland and Calcium Metabolism. In: *Manual of Small Animal Practice*. 3^a. ed. Saunders Elsevier. p. 343–356, 2006.

SCHENCK, P.A.; CHEW, D.J. Calcium: Total or Ionized?. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. v. 38, p. 497–502, 2008.

SENER, D.E.; GÖNENÇ, A.; AKINCI, M; TORUM, M. Lipide peroxidation and total antioxidant status in patients with breast cancer. *Cell Biochemistry and Function*. Chichester, v. 25, n.4, p. 377-82, 2007.

SILVA, A.C.R.A.; ALMEIDA, B.F.M.; SOEIRO, C.S.; FERREIRA, W.L.; LIMA, V.M.F.; CIARLINI, P.C. Estresse oxidativo e aumento da apoptose em neutrófilos de cães com azotemia pré-renal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. Belo Horizonte, v. 65, n. 1, p. 163-170, 2013.

SILVA JR., O.C.; CENTURION, S.; PACHECO, E.G.; BRISOTTI, J.L.; OLIVEIRA, A.F.; SASSO, K.D. Aspectos Básicos da Lesão de Isquemia e Reperfusão e do Pré-Condicionamento Isquêmico. *Acta Cirurgica Brasileira*. São Paulo, v.17, n. 3, p. 96-100, 2002.

SILVA, A.E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. *Ciencia Rural*. v. 34, n.2, p. 625-33, 2004.

SIM, A.S.; SALONIKAS, C.; NAIDOO, D.; WILCLKEN, D.E.L. Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performance liquid chromatography using methyl malondialdehyde as an internal satandard. *Journal of Chromatography*. Amsterdam, v. 785, p. 337-344, 2003.

- SORENMO, K.U.; WORLEY, D.R.; GOLDSCHIMIDT, M.H. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M.; PAGE, R.L. *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 5a. ed.. St. Louis: Saunders Elsevier. p. 538-556. 2013.
- SZCZUBIAL, M; KANKOFER, R.; BOCHNIARZ, M.; DABROWSKI, R. Effects of ovariectomy on oxidative stress markers in female dogs. *Reproduction in Domestic Animals*. Berlin, v. 50, p. 75-81, 2015.
- SZCZUBIAL, M.; KANKOFER, M.; LOPUSZYNSKI, W.; DABROWSKI, R.; LIPKO, J. Oxidative stress parameters in bitches with mammary gland tumours. *Journal of Veterinary Medicine, A Physiology, Pathology, Clinical Medicine*. Berlin, v.51, n. 7-8, p. 336-40, 2004.
- TRYFONIDOU, M. A.; HOLL, M. S.; VASTENBURG, M.; OOSTERLAKEN-DIJKSTERHUIS, M. A.; BIRKENHÄGERFRENKEL, D. H.; VAN DEN BROM, W. E. Hormonal regulation of calcium homeostasis in two breeds of dogs during growth at different rates. *Journal of Animal Science*. p.1568-1580, 2003.
- UBUKATA, R. Avaliação do Estado Oxidante / Antioxidante Sistêmico e das Defesas Antioxidantes Eritrocitárias em Cães com Linfoma Multicêntrico com e sem Anemia. *Dissertação de Mestrado*. Departamento de Clínica Médica. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 89 p., 2010.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and Cell Biology antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry*. Oxford, v.39, p. 44-84, 2007.
- VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quimica Nova*. São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1323-38, 2007.
- VASILOPULOS, R.J.; MACKIN, A. Humoral Hypercalcemia of Malignancy: Diagnosis and Treatment. *Compendium on continuing education for the practising veterinarian - north american edition*. v. 25, p.129-137, 2003.
- VONDERHAAR, B.K. Prolactin involvement in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*. v. 6, p. 389-404, 1999.
- WINTER, J.L.; BARBER, L.G.; FREEMAN, L.; GRIESSMAYR, P.C.; MILBURY, P.E.; BLUMBERG, J.B. Antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. Philadelphia, v.23, p. 311-16, 2009.
- WITHROW, S.J. In: *Small animal clinical oncology*. 4.Ed. Missouri: Saunders, p. 15-17, 2007.

WITHROW, S.J.; SUSANECK, S.J. Tumors of the canine female reproductive tract. In: MORROW, D. A. *Current therapy in theriogenology*. Philadelphia: Saunders, p.521-523, 1986.

ZUCCARI, D.A.P.C.; SANTANA, A.E.; ROCHA, N.S. Fisiopatologia da neoplasia mamária em cadelas: revisão. *Clínica Veterinária*, v. 32, p. 50-54, 2001.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ocorrência de estresse oxidativo e hipercalcemia em cadelas portadoras de neoplasias mamárias e sua possível utilização como fator prognóstico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar os valores de malondialdeído sérico em cadelas portadoras de neoplasias mamárias malignas e benignas e comparar com os valores séricos de cadelas híginas.

- Comparar os valores de malondialdeído sérico com padrão histológico dos tumores, estadiamento clínico, alterações hematológicas e bioquímicas séricas em cadelas portadoras de neoplasia mamária e correlacioná-los.

- Mensurar os valores de malondialdeído sérico das cadelas portadoras de neoplasia mamária 30 dias após a remoção cirúrgica dos tumores e compará-los aos valores encontrados no período pré-operatório.

- Mensurar os níveis séricos de cálcio total e cálcio ionizado em cadelas portadoras de neoplasias mamárias malignas e correlacioná-los com padrão histológico dos tumores, estadiamento clínico, alterações hematológicas e bioquímicas antes e após o tratamento.

4 ARTIGO A

ESTRESSE OXIDATIVO EM CADELAS PORTADORAS DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS

OXIDATIVE STRESS IN BITCHES WITH MAMMARY NEOPLASMS

RESUMO

O resultado da reação de radicais livres com biomoléculas é a formação de substâncias que podem ser utilizadas como marcadores de dano oxidativo, condição mais conhecida como estresse oxidativo. Evidências científicas comprovam a relação, quer como causa, quer como consequência, entre muitas doenças e o estresse oxidativo. Neste estudo, 144 cadelas portadoras de neoplasia de mama, foram submetidas à avaliação clínica para estadiamento da doença, avaliação hematológica, testes de função renal e hepática e dosagem do biomarcador de dano oxidativo, malondialdeído (MDA), no momento de sua abordagem e 30 dias após realização de tratamento. Um grupo controle de 100 cadelas saudáveis foi submetido também à determinação dos níveis séricos de MDA. A idade média dos animais acometidos por neoplasias mamárias foi de $9,88 \pm 2,95$ (4 a 14) anos, enquanto que nos animais saudáveis foi de $2,31 \pm 1,90$ anos (1 a 6). Dos 144 animais, 113 (78,9%) apresentavam neoplasias malignas, sendo que 15, 21, 46, 17 e 14 animais encontravam-se em estadiamento clínico I, II, III, IV e V respectivamente e o carcinoma em tumor misto foi o padrão histológico mais frequente neste grupo (26%). Trinta e um animais tiveram diagnóstico de neoplasias benignas, sendo que 7 estavam no estadiamento I, 16 no estadiamento II e 8 no estadiamento III e o adenoma mamário foi o padrão histológico mais frequente em 15 animais (51,61%). Alterações hematológicas no período pré-operatório foram observadas em 44 (38,9%) e 12 (38,7%) animais portadores de neoplasias malignas e benignas, respectivamente, sendo que houve correlação positiva entre anemia e níveis mais elevados de MDA ($P=0,0008$), para os animais com tumores malignos. Em relação aos parâmetros bioquímicos séricos, as alterações mais frequentes nos animais com neoplasias malignas foram a elevação dos níveis de ALT em 12 animais (10,6%), de creatinina em 10 animais (8,84%) e de ureia em oito animais (7,07%). Cadelas portadoras de neoplasias benignas apresentaram menor ocorrência de alterações nesses parâmetros. No grupo controle, a média dos valores séricos de MDA foi $12,08 \pm 4,18$, enquanto que no grupo pré-tratamento, a média de MDA foi de $24,80 \pm 5,74$ para as cadelas com neoplasia benigna e $32,27 \pm 10,24$ para as neoplasias malignas. Verificou-se aumento significativo do valor sérico de MDA em cadelas portadoras de neoplasias malignas em comparação com os animais hígidos ou com neoplasias benignas ($P < 0,001$). Ainda, 30 dias após o tratamento observou-se uma diminuição significativa ($P < 0,001$) no valor médio de MDA ($27,37 \pm 7,86$) nos animais com neoplasias malignas. Em conclusão, os resultados deste estudo evidenciam uma associação entre níveis séricos aumentados de MDA e presença de neoplasias mamárias em cadelas. Os resultados sugerem que este fator pode ser utilizado como biomarcador de estresse oxidativo em cães, com provável impacto no prognóstico dos tumores mamários, uma vez que níveis significativamente mais altos de MDA foram detectados especialmente nas cadelas portadoras de tumores malignos e apresentando anemia.

Palavras-chave: Caninos. Malondialdeído. Radicais livres. Tumores de Mama.

ABSTRACT

The result of the reaction of free radicals with biomolecules is the formation of substances with the potential of inducing oxidative damage, a condition known as oxidative stress. There are voluminous literature data reporting the association, both as a cause and as a consequence, between different diseases and oxidative stress. In this study, 144 bitches with mammary neoplasia were analyzed. The animals were submitted to clinical evaluation for disease staging, hematological evaluation, serum biochemistry (renal and hepatic function tests), and dosage of the oxidative damage biomarker, malondialdehyde (MDA), at the time of its approach and 30 days after treatment. A control group of 100 healthy bitches was also submitted to determination of serum MDA levels. The mean age of the animals affected by mammary neoplasms was 9.88 ± 2.95 (4 to 14) years, while in healthy animals it was 2.31 ± 1.90 years (1 to 6). Of the 144 animals, 113 (78.9%) had malignant neoplasms, and 15, 21, 46, 17 and 14 animals were in clinical stage I, II, III, IV and V respectively and the carcinoma in a mixed tumor was the most frequent histological pattern in this group (26%). Thirty-one animals were diagnosed with benign neoplasms, 7 of which were in stage I, 16 in stage II and 8 in stage III, and mammary adenoma was the most frequent histological pattern in 15 animals (51.61%). Hematological changes in the preoperative period were observed in 44 (38.9%) and 12 (38.7%) animals with malignant and benign neoplasias, respectively, and there was a positive correlation between anemia and higher levels of MDA ($P = 0.0008$) for animals with malignant tumors. Regarding serum biochemical parameters, the most frequent alterations in animals with malignant neoplasms were elevated ALT levels in 12 animals (10.6%), creatinine in 10 animals (8.84%) and urea in eight animals (7.07%). Females with benign neoplasms presented less occurrence of changes in these parameters. In the group of healthy animals (control), the mean serum MDA values were 12.08 ± 4.18 , whereas in the pre-treatment group, mean MDA was 24.80 ± 5.74 for bitches with benign neoplasms and 32.27 ± 10.24 for bitches with malignant tumors. A significant increase ($P < 0,001$) in MDA levels was observed in animals with malignant mammary neoplasms when compared to healthy animals and with benign tumors. In addition, a significant reduction ($p < 0.001$) was observed 30 days after treatment in MDA levels (27.37 ± 7.86) in animals with malignant tumors. In conclusion, our results indicate an association between MDA seric levels and mammary neoplasms in dogs. In addition, the results suggest that this factor can be used as a biomarker of oxidative stress with a potential impact in the prognostic of mammary tumors, since significantly higher levels of MDA were detected especially in dogs carrying malignant tumors and presenting anemia.

Keywords: Canine. Free Radicals. Malondialdehyde. Mammary Tumors.

INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo é um tema que há anos vem chamando a atenção de pesquisadores em razão de suas correlações com processos como o envelhecimento e o surgimento de algumas doenças. A formação de compostos denominados espécies reativas de oxigênio (ERO), ocorre fisiologicamente como parte do metabolismo celular, e possui importantes funções, como por exemplo, a destruição de agentes agressores por fagocitose (SCHAFER; BUETTNER, 2001).

Em situações onde haja aumento na produção de ERO, o organismo possui um eficiente sistema de defesa antioxidante capaz de restabelecer o equilíbrio (FINKEL; HOLBROOK, 2000). Quando há perda do equilíbrio com predomínio de agentes oxidantes, se estabelece o estresse oxidativo, que levará a ocorrência de dano à célula. A membrana celular, bem como as membranas de organelas intracitoplasmáticas do núcleo, mitocôndrias e retículo endoplasmático são os principais locais de atuação dos ERO (BARREIROS et al., 2006). O dano celular resulta basicamente do ataque dos ERO às macromoléculas que compõem as membranas, como carboidratos, proteínas e lipídeos. A peroxidação lipídica das membranas celulares decorrente da ação dos ERO culmina com mudanças químicas e físicas, levando a alterações na fluidez e permeabilidade da membrana, com risco de ruptura e consequente morte celular (VASCONCELOS et al, 2007).

Os produtos da oxidação podem reagir entre si e resultar em novos produtos, que podem ser utilizados como biomarcadores de dano oxidativo. O malondialdeído (MDA) é atualmente considerado um biomarcador geral de dano oxidativo presente no plasma (KADIISKA et al., 2005). Produto da peroxidação lipídica das membranas celulares, sua quantificação em sistemas biológicos é um importante parâmetro para a avaliação do estresse oxidativo celular (PILZ et al., 2000; SIM et al., 2003). Andrade (2005) e Del Rio et al. (2005) referem que o MDA é altamente citotóxico e genotóxico, devendo ser considerado mais que um biomarcador de dano oxidativo, devido a sua interação com DNA e outras proteínas. Níveis elevados de MDA são rotineiramente utilizados como forma de detecção de estresse oxidativo em diversas doenças em humanos, tais como, lúpus eritematoso sistêmico, diabetes, doenças pulmonares, doença de Alzheimer, câncer, entre outras, o que nos gera subsídio para a pesquisa em animais (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; ANDRADE et al., 2005; PÉREZ et al., 2012). A técnica mais utilizada para mensuração inespecífica de MDA é conhecida como quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ou TBARS. Essa técnica

quantifica produtos denominados de substâncias reativas ao ácido barbitúrico, dentre as quais o MDA é o principal componente, porém é uma técnica de baixa sensibilidade e especificidade para a detecção de aldeídos em fluidos biológicos, o que tem justificado a busca por técnicas de maior fidelidade, como a detecção de MDA (ABDALLA; SENA, 2008).

Na medicina veterinária, estudos prévios avaliaram a ocorrência de estresse oxidativo em cães portadores de linfoma (WINTER et al., 2009; MACEDO, 2010), insuficiência cardíaca (FREEMAN et al., 2005), neoplasias mamárias (SZCZUBIAL et al., 2004) e doença renal (GALVÃO, 2009). Alterações no *status* oxidativo em animais portadores de neoplasias (incluindo as mamárias) foram evidenciadas por meio da mensuração de biomarcadores de dano, como as substâncias reativas ao ácido barbitúrico (TBARS) e óxido nítrico, concentrações de metais como ferro, cobre e zinco e antioxidantes como o ácido ascórbico (ASKAR et al., 2009). A determinação de fatores prognósticos em neoplasias, inclusive as mamárias, tem sido objeto de interesse crescente na oncologia veterinária, principalmente com a utilização de imunohistoquímica e métodos de diagnóstico molecular que podem detectar a presença de marcadores frequentemente pesquisados nas neoplasias da mama, como Ki-67, E-caderina, HER-2, COX-2, VEGF, p-53, entre outros (LAVALLE et al., 2009; DE LAS MULAS et al., 2003; THURÓCZY, et al., 2007). No entanto, os dados referentes a utilização de biomarcadores de dano oxidativo, bem como sua possível utilização como marcador de prognóstico são escassos na literatura veterinária. O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de estresse oxidativo em cadelas portadoras de neoplasias mamárias antes e após o procedimento cirúrgico por meio da mensuração de malondialdeído sérico, bem como determinar sua possível associação ao prognóstico da doença. Ainda, foi estabelecido o valor médio de MDA em cadelas saudáveis para fins de comparação.

Material e Métodos

Animais

Foram incluídas neste estudo 144 cadelas portadoras de neoplasias mamárias atendidas em dois Hospitais-Escola Veterinários localizados nos municípios de Maringá, Paraná e Ourinhos, São Paulo. O estudo foi aprovado pelos Comitês Institucionais de Uso de Animais em Experimentação (COBAC/CESUMAR 014/2012 e CEUA/FIO 04/2014), e os proprietários esclarecidos sobre o termo de concordância e compromisso. Após o consentimento de seus tutores, os animais incluídos no estudo (grupo pré-tratamento)

passaram por avaliação física para estadiamento clínico da doença de acordo com Cassali et al. (2014).

Foram utilizadas ainda 100 cadelas saudáveis, jovens, com idades variando entre 1 e 6 anos para determinação dos valores séricos de malondialdeído (grupo controle), tendo em vista que não há valores de referência para este biomarcador na espécie canina. Os animais incluídos neste grupo foram encaminhados ao Hospital Veterinário para realização de cirurgia de ovariosalpingohisterectomia eletiva. Os critérios de inclusão no grupo controle foram estado de saúde geral e parâmetros hematológicos avaliados por meio de hemograma completo e bioquímicos, incluindo função renal (uréia e creatinina) e atividade enzimática hepática (ALT e FA) dentro dos valores de referência para a espécie.

Exames hematológicos e bioquímicos

Os animais foram submetidos a colheita de sangue para avaliação hematológica, bioquímica sérica, incluindo perfil renal com dosagem de uréia e creatinina, hepático, com dosagem de alaninaaminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) realizadas nos laboratórios de Patologia Clínica dos respectivos Hospitais-Escola. Amostras de soro de cada animal foram utilizadas para mensuração das concentrações de malondialdeído (MDA), realizadas no laboratório de nutrição e metabologia da USP de Ribeirão Preto. Os exames foram realizados no momento da abordagem clínica inicial e 30 dias após o procedimento terapêutico, levando-se em consideração o período necessário para recuperação pós-operatória.

Para determinação de parâmetros hematológicos foram utilizadas as técnicas de rotina descritas por Jain (1993). As amostras de sangue foram acondicionadas em frasco contendo o anticoagulante ácido etileno-diaminotetracético (3 ml de sangue). As contagens totais de eritrócitos e de leucócitos e a determinação da concentração de hemoglobina foram realizadas com contador automático de células (Celm CC 530/ DA 500®, Brasil). O volume globular foi determinado pelo método do microhematócrito e as concentrações de proteínas plasmáticas pelo método do refratômetro. O volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados seguindo as fórmulas descritas por Wintrobe (1974).

Para realização dos exames bioquímicos foram colhidas amostras de sangue (10 ml) de cada animal por punção da veia jugular. As amostras foram acondicionadas em tubos sem anticoagulante para a determinação das concentrações bioquímicas de ureia e creatinina, e

atividade das enzimas ALT e FA, seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante (kits comerciais específicos Gold Analisa®). Para determinação da ureia e ALT utilizou-se o método cinético-UV e para a determinação da creatinina e FA o método cinético-colorimétrico. A leitura e obtenção dos resultados foram realizadas em analisador fotométrico Bioplus-2000®, Brasil.

Determinação sérica de malondialdeído (MDA)

Para realização da dosagem de MDA, foram colhidas amostras de 5 ml de sangue da veia jugular, em tubos sem anticoagulante, submetidas a centrifugação para separação do soro. O soro foi então acondicionado em tubos plásticos apropriados e congelados a -20°C até o seu processamento. A dosagem sérica de MDA foi realizada de acordo com o método proposto por Gérard-Monnier et al. (1998), com adaptações. Para a dosagem de MDA no soro foram utilizados 100µl da amostra. A este foi adicionado 300µl de solução de 10mM de 1-metil-fenilindol em acetonitrila e metanol (2:1, v/v) e 75µl de HCl (37%). Logo após, os tubos foram agitados em vortex e incubados em banho-maria a 45°C por 40 minutos. Após o banho, houve resfriamento das amostras em gelo e em seguida os tubos foram centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos. Do sobrenadante foi feita a leitura de absorbância em espectrofotômetro com comprimento de onda de 586 nm. A concentração de MDA foi calculada comparando-a a uma curva de 1,1,3,3- tetrametoxipropano (TMP) hidrolisado. Os exames de determinação de MDA foram conduzidos no Laboratório de Nutrição e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, SP.

Abordagem Terapêutica e Diagnóstica

Após o estadiamento clínico e a avaliação dos resultados dos exames laboratoriais, as cadelas foram submetidas à mastectomia total unilateral, bilateral, ou regional, com remoção de linfonodos inguinais e/ou axilares, de acordo com o caso, com objetivo terapêutico e para realização de análise histopatológica dos tecidos neoplásicos e linfonodos. O diagnóstico definitivo foi determinado por meio de avaliação histopatológica e a correção do estadiamento clínico, quando necessária, foi realizada por meio do estadiamento patológico após análise microscópica dos linfonodos. Para as cadelas que apresentaram neoformação mamária, com aspecto clínico eritematoso, doloroso e inflamado, ou seja, quando houve suspeita de que pudesse se tratar de carcinoma inflamatório de mama (primário ou secundário), foi indicada

apenas biopsia incisional, com fim diagnóstico e para possibilitar a escolha de abordagem terapêutica mais apropriada e definição de prognóstico.

Trinta dias após a realização das cirurgias ou biopsias, as cadelas foram submetidas novamente a colheita de sangue para repetição das mesmas avaliações hematológicas e bioquímicas realizadas inicialmente (grupo pós-tratamento). Seis animais, do grupo dos tumores malignos não foram avaliados nesse período, pois foram a óbito ou submetidos à eutanásia em decorrência de complicações. No grupo das cadelas com tumores benignos, dois animais não foram submetidos a tratamento cirúrgico devido a alterações encontradas nos exames bioquímicos que indicavam comprometimento da função renal. As cadelas que tiveram o diagnóstico clínico, posteriormente confirmado por exame histopatológico, de carcinoma inflamatório primário ou secundário foram tratadas de modo paliativo, com protocolo de analgesia multimodal, anti-inflamatório não esteroidal (firocoxibe, 5mg/Kg/SID), quimioterapia e terapia de suporte.

Análise Estatística

Os dados de cada fase foram testados para normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) e para homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett (BARTLETT, 1950). Para comparações dentro de cada grupo e entre grupos foi feita análise de variância e em caso de significância, foi realizado o teste de Tukey (COOLEY; TUKEY, 1965). Os valores de MDA foram testados para associações, nos grupos de animais em pré e pós-tratamento, com tumores benignos e malignos diagnosticados por meio de avaliação histopatológica, com as variáveis idade, estadiamento clínico, padrão histológico dos tumores, parâmetros hematológicos e bioquímicos. Para comparação dos momentos em pré e pós-tratamento foi feito o teste t pareado. Utilizou-se o software R para as análises considerando-se 5% de significância.

Resultados

Animais

No período de realização deste estudo foram examinadas 144 fêmeas caninas portadoras de neoplasias mamárias. A idade média dos animais acometidos foi de $9,88 \pm 2,95$ (4 a 14) anos, enquanto que nos animais saudáveis a idade média foi de $2,31 \pm 1,90$ anos (1 a 6). Em relação à raça, as maiores ocorrências foram de animais sem raça definida (52/144), poodle (17/144) e pit bull (8/144). No grupo controle, o predomínio também foi de animais sem raça definida (89/100), shih tzu (4/100) e poodle (3/100).

Dos 144 animais, 113 (78, 9%) apresentavam neoplasias malignas e 31 animais (21,52%) tiveram diagnóstico de neoplasias benignas, em estadiamentos variados conforme tabela 1.

Tabela 1 – Estadiamento clínico verificado nos grupos de tumores malignos e benignos no momento pré-tratamento

ESTADIAMENTO	MALIGNOS
I	15 (13,27%)
II	21 (18,60%)
III	46 (41,00%)
IV	17 (15,00%)
V	14 (12,40%)
TOTAL	113

Em relação à classificação histológica, as neoplasias mamárias malignas mais frequentes foram os carcinomas em tumor misto (26,5%), os carcinosarcomas (CASA – 15,92%) e os adenoepiteliomas malignos (11,5%). Os tumores benignos mais frequentes foram os adenomas mamários (51,61%) e os tumores mistos benignos (32,2%).

Exames hematológicos e bioquímicos

Nos animais com neoplasias os resultados dos exames hematológicos e bioquímicos foram avaliados na abordagem clínica inicial e 30 dias após o procedimento terapêutico. Os animais do grupo controle não apresentaram alterações nos parâmetros hematológicos ou bioquímicos. Alterações hematológicas no período pré-operatório foram observadas em 44 (38,9%) e 12 (38,7%) animais portadores de neoplasias malignas e benignas, respectivamente. Em ambos os grupos destes animais as alterações mais frequentes foram anemia e trombocitopenia (Quadro 1). Leucocitose neutrofílica foi observada em quatro cadelas com neoplasias malignas no período pré-tratamento, apresentando tumores ulcerados.

Em relação aos parâmetros bioquímicos séricos, as alterações mais frequentes nos animais com neoplasias malignas foram a elevação dos níveis de ALT em 12 animais (10,6%), de creatinina em 10 animais (8,84%) e de ureia em oito animais (7,07%) (Tabela 2). Cadelas portadoras de neoplasias benignas apresentaram menor ocorrência de alterações nesses parâmetros. A alteração mais frequente foi a elevação do nível sérico de creatinina, observada em quatro animais (12,90%) (Quadro 1). Em ambos os grupos, observou-se após o tratamento uma diminuição no número de animais com alterações hematológicas e bioquímicas. Os valores médios obtidos nas avaliações hematológicas e bioquímicas séricas dos animais com alterações nos parâmetros avaliados e portadores de neoplasias mamárias estão demonstrados no quadro 1.

Alteração Laboratorial	Valores Normais de Referência *, ^ψ	Neoplasias Benignas		Neoplasias Malignas	
		Pré N (%)	Pós N (%)	Pré N (%)	Pós N (%)
Anemia		8 (25,8)	n 5 (16,1)	n 37 (27,43)	n 21 (18,58)
Hemoglobina g/dl	12-18 g/dl	9,4 ±1.2 (9.0 – 11.9)	9,7±1.1 (9.2 – 11.9)	8.1 ±0.9 (7.9 – 11.8)	9.9±1.0 (8.3 – 11.6)
Trombocitopenia	2 – 5 x	n 3 (9,6)	n 2 (6,4)	n 10 (8,8)	n 2 (1,7)
nº de células x 10 ⁶ /µL	10 ⁵ /µL	1.2±05 (0.9 – 1.5)	1.0±0.7 (0.9-1.7)	1.3±0.4 (0.6 – 1.6)	1.1±0.5 (0.9-1.6)
Neutrofilia	6.000 – 17.000/µL	n 1 (3,2) 24.700	-	n 4 (3,5) 25.900±1.600 (21.600-38.000)	n 1 (0,8) 28.300
Aumento de Atividade de ALT	0 – 102 U/L	n 1 (3,2) 190	-	n 12 (10,6) 177±45 (150 – 205)	n 4 (3,5) 180±35 (160 – 215)
Aumento de Atividade de FA	0 – 156 U/L	n 1 (3,2) 230	n 1 (3,2) 250	n 2 (1,7) (195 – 245)	-
Azotemia (Creatinina)	0.5 – 1.5 mg/dL	n 4 (12,8) 2.4±1.0 (1.7– 4.1)	n 1 (3,2) 2.1	n 10 (8,8) 2.1±1.2 (1.9 – 4.3)	n 2 (1,7) 2.5±0.9 (2.1 - 3.2)
Azotemia (Uréia)	21 – 60 mg/dL	-	-	n 8 (7,0) 148±45 (82- 199)	n 4 (3,5) 110±25 (95-145)

Quadro 1 – Frequência de animais com neoplasia mamária maligna e benigna, em pré e pós-tratamento que apresentaram alterações hematológicas e bioquímicas sérica. * KANEKO et al., 1997; ^ψJAIN, 1993. n= número de animais.

Determinação sérica de malondialdeído (MDA)

Os valores médios de MDA (nmol/dl) obtidos nos animais controle, com neoplasias benignas e malignas foram de 12,08(\pm 4,18), 24,80(\pm 5,74) e 32,85(\pm 10,24), respectivamente. Verificou-se um aumento significativo nos níveis médios de MDA sérico nos animais com neoplasias em comparação com os animais controle ($P < 0,001$). Ainda, cadelas com neoplasias malignas apresentaram níveis significativamente mais elevados em relação aos animais com tumores benignos ($P < 0,001$). Os níveis médios de MDA sérico em animais com neoplasias benignas e malignas antes e após o procedimento terapêutico estão dispostos na Tabela 2.

Ao avaliar o efeito do procedimento terapêutico sobre os níveis de MDA constatou-se uma diminuição significativa ($P = 0,0001$) no MDA sérico após o procedimento terapêutico em animais com neoplasias malignas. No entanto, em animais com tumores benignos os níveis de MDA não diferiram antes e após o tratamento (Tabela 2).

Tabela 2 – Médias e desvios padrão de malondialdeído sérico (nmol/mL) nos animais do grupo controle, portadores de neoplasias benignas e malignas, antes e após o tratamento.

Grupos	Pré-tratamento	p valor
Controle	12,08 \pm 4,18 <i>c</i>	<0,001
Benignos	24,80 \pm 5,74 <i>b</i>	
Malignos	32,85 \pm 10,24 <i>a</i>	
Benignos		
Pré-tratamento	24,80 \pm 5,75 <i>a</i>	0,7506
Pós-tratamento	24,58 \pm 5,18 <i>a</i>	
Malignos		
Pré-tratamento	32,85 \pm 10,24 <i>a</i>	0,00013
Pós-tratamento	27,37 \pm 7,86 <i>b</i>	

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Avaliou-se a relação entre os níveis de MDA nos animais com neoplasias e os demais parâmetros. Para as cadelas portadoras de tumores benignos, tanto antes quanto após o tratamento não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os níveis de MDA e a idade dos animais, estadiamento clínico, presença de alterações hematológicas ou bioquímicas e classificação histológica dos tumores.

Nos animais com tumores malignos observou-se apenas no período pré-tratamento associação entre os níveis séricos de MDA e alterações hematológicas e classificação histológica. No entanto, quanto a classificação histológica observou-se que cadelas com carcinomas sólidos apresentaram um nível de MDA significativamente menor do que os demais tipos histológicos (Tabela 4). Em relação a presença de alterações hematológicas constatou-se que os animais com anemia apresentaram os níveis mais elevados de MDA ($P=0,0008$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Associação entre anemia e níveis séricos mais elevados de MDA no grupo de neoplasias malignas, em pré-tratamento.

Anemia	MDA (nmol)	p valor
SIM (n=37)	40,88±7,51	0,000844 *
NÃO (n=76)	27,80±8,23	

*significativo ($p<0,05$)

Tabela 4 – Correlação entre os valores médios de malondialdeído sérico (\pm desvio padrão) e demais variáveis em cadelas com neoplasias mamárias malignas antes e após o tratamento.

		Pré-tratamento nmol/mL	Pós-tratamento nmol/ml	
Idade (Anos)	4 (n=02)	22,99 \pm 7,93	29,51 \pm 5,77	
	5 (n=05)	33,58 \pm 9,00	24,89 \pm 9,35	
	6 (n=08)	25,43 \pm 9,82	24,43 \pm 10,25	
	7 (n=10)	33,85 \pm 12,61	27,13 \pm 9,90	
	8 (n=05)	35,66 \pm 11,12	29,55 \pm 9,49	
	9 (n=11)	31,40 \pm 9,29	27,72 \pm 7,21	
	10 (n=19)	28,89 \pm 10,33	26,58 \pm 8,08	
	11 (n=20)	35,70 \pm 6,96	28,29 \pm 7,63	
	12 (n=17)	36,40 \pm 5,00	29,77 \pm 8,44	
	13 (n=04)	37,58 \pm 13,06	29,46 \pm 6,59	
14 (n=02)	33,58 \pm 7,27	22,78 \pm 8,00		
P valor		0,207032	0,5935	
Estadiamento	I (n=15)	33,58 \pm 9,00	28,76 \pm 9,62	
	II (n=21)	25,43 \pm 9,82	24,58 \pm 7,74	
	III (n=46)	33,85 \pm 12,61	27,10 \pm 7,14	
	IV (n=17)	35,66 \pm 11,12	26,66 \pm 9,76	
	V (n=14)	31,40 \pm 9,29	33,74 \pm 5,48	
P valor		0,30968	0,1983	
Anemia	Não	35,70 \pm 6,96	b	27,38 \pm 7,90
	Sim	36,40 \pm 5,00	a	27,29 \pm 9,05
P valor		<0,0001	0,9865	
Alterações Bioquímicas	Não	33,58 \pm 7,27		26,98 \pm 7,64
	Sim	31,87 \pm 7,59		28,79 \pm 9,84
P valor		0,603002	0,8377	
Classificação Histológica	DMEM	36,97 \pm 11,78	a	29,02 \pm 8,50
	CAN	36,69 \pm 6,21	a	31,76 \pm 1,34
	CASA	34,48 \pm 11,70	a	27,68 \pm 10,96
	CIM 1	27,03 \pm 15,61	a	-
	CIM 2	40,00 \pm 2,58	a	-
	CP	31,93 \pm 8,69	a	23,84 \pm 6,18
	CS	28,12 \pm 4,21	a	29,35 \pm 7,56
	CSO	19,32 \pm 8,81	b	23,90 \pm 6,67
	CT	33,80 \pm 11,16	a	29,50 \pm 8,01
	CTM	32,48 \pm 8,18	a	25,56 \pm 6,88
	FSA	30,20 \pm 4,33	a	36,80 \pm 3,60
	OSA	44,73 \pm 5,48	a	35,72 \pm 4,16
P valor		0,000309	0,3071	

Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Nota: CTM = Carcinoma em Tumor Misto, CASA = Carcinosarcoma, DMEM = Adenomioepitelioma Maligno, CT = Carcinoma Tubular, CSO = Carcinoma Sólido, CS = Carcinoma *in Situ*, CP = Carcinoma Papilar, CAN = Carcinoma Anaplásico, CIM 1 = Carcinoma Inflamatório Primário, CIM 2 = Carcinoma Inflamatório Secundário, FSA = Fibrossarcoma, OSA = Osteossarcoma

Das 144 cadelas portadoras de tumor de mama, 136 foram submetidas a tratamento cirúrgico, 6 animais foram submetidos apenas a biopsia incisional e 2 animais não passaram por nenhum tipo de tratamento cirúrgico. Das 136 cirurgias com objetivo terapêutico realizadas durante este estudo, 29 foram mastectomias totais bilaterais, 99 animais foram submetidos à mastectomia total unilateral e 16 animais foram tratados por meio de mastectomia regional. Foi realizada linfadenectomia inguinal ou axilar, uni ou bilateral de acordo com o tipo de cirurgia realizada. Das 144 cadelas, 112 não eram castradas no momento do diagnóstico e foram então submetidas a ovariectomia no mesmo momento das mastectomias.

Discussão

O aumento da ocorrência de neoplasias em animais de companhia tem sido associado ao incremento da longevidade em decorrência da melhoria da nutrição e sanidade animal (RIBAS et al., 2012). Dados internacionais sobre o risco de desenvolvimento de tumores mamários malignos na espécie canina indicam variações entre 2 e 58% (ITOH et al., 2005; MCEWEN; WITHROW, 2007). No Brasil, a ocorrência de neoplasias mamárias malignas é maior que a média internacional, situando-se acima de 80% (ZUCCARI et al. 2001; DE NARDI et al. 2002; MARTINS et al. 2002; OLIVEIRA et al. 2003). No presente estudo, a ocorrência de neoplasias mamárias malignas (78,5%) foi similar aos dados nacionais. Essa ocorrência elevada foi associada a ação de hormônios sexuais principalmente em cadelas não castradas antes do primeiro ou segundo cio (LANA, 2007). Neste estudo, 77,8% dos animais não eram castrados no momento do diagnóstico da neoplasia mamária, apresentando atividade hormonal ovariana. Em relação à idade, os resultados deste estudo (idade média de 9,9 anos) estão de acordo com os dados da literatura que relatam maior incidência de neoplasias mamárias em animais com idade entre 7 e 12 anos de idade (DE NARDI et al., 2016).

Os padrões histológicos mais frequentemente diagnosticados nas neoplasias mamárias apresentam grandes variações de acordo com os autores. A grande variabilidade histogenética das neoplasias mamárias, levou a necessidade de padronização das classificações, destacando-se as classificações de Misdorp et al. (1999) e de Goldschmidt et al. (2011) previamente utilizadas. No Brasil, Cassali et al. (2014) propuseram uma nova classificação que foi a utilizada neste estudo. O padrão histológico de maior frequência observado foi o carcinoma em tumor misto (26,54%). O carcinoma em tumor misto possui como característica a apresentação de um componente de origem epitelial maligna e um componente de origem mesenquimal com características benignas, com presença de microinvasão, ou seja, uma

característica histológica relacionada ao pior prognóstico (CASSALI et al, 2014). Não foi observada correlação estatisticamente significativa entre os níveis mais elevados de MDA e o padrão histológico das neoplasias, porém, foi observada uma correlação estatisticamente significativa entre níveis menores de MDA e os tumores diagnosticados como carcinomas sólidos, que somaram 7,1% (n=8) dos tumores diagnosticados neste estudo. Os carcinomas sólidos são considerados tumores frequentes na espécie canina, geralmente como evolução de grandes tumores em cães que não foram tratados cirurgicamente em fases mais precoces da doença (CASSALI et al., 2014). Nas cadelas com neoplasia maligna com diagnóstico de carcinoma sólido, não foi observada diferença significativa quando comparadas aos demais padrões histológicos com relação ao número de mamas acometidas, estadiamento clínico e alterações hamtológicas ou bioquímicas, porém foi constatada diferença significativa com relação a idade média neste grupo ($7,1\pm 1,4$ anos) quando comparada a idade média de todas as cadelas com neoplasia maligna de mama ($9,88\pm 2,95$), o que pode estar relacionado aos valores menores de MDA sérico encontrado neste grupo ($19,32\pm 8,81$), justificando a necessidade de que sejam estabelecidos valores de referência de MDA de acordo com a faixa etária.

O estadiamento clínico das neoplasias mamárias na cadela, é um momento em que se deve detalhar a extensão da doença e sua gravidade, podendo ser citado como uma fase de extrema importância no diagnóstico, pois, assim como os padrões histológicos dos tumores de mama, o estadiamento clínico da doença está diretamente relacionado à abrangência da abordagem terapêutica e prognóstico. Neste estudo verificou-se que 39% das cadelas estavam em estadiamento clínico III (LANA, 2007). Neste estágio da doença, os tumores apresentam um tamanho maior que 5 cm em seu diâmetro máximo, porém sem evidência de migração para linfonodos ou metástase distante. No entanto, quando se avaliou apenas as cadelas portadoras de neoplasias malignas constatou-se que 68% estavam em estadiamentos clínicos entre III e V. Não há na literatura consultada estudos demonstrando quais seriam os estadiamentos clínicos mais frequentes em cadelas portadoras de neoplasia mamária no momento da abordagem diagnóstica, porém, estadiamentos mais tardios podem estar relacionados aos padrões histológicos mais agressivos (RIBAS et al., 2012). Em pacientes da espécie humana, os diagnósticos tardios estão relacionados a um nível baixo de escolaridade, com baixo índice de realização de auto-exame das mamas (MONTEIRO, 2003; PIRES, 2007). Segundo Toríbio et al. (2012), a procura tardia por assistência médico veterinária por parte dos tutores de cadelas com neoplasias mamárias está diretamente relacionada às

características socioeconômicas da população, salientando em seu estudo a necessidade de programas de orientação que enfatizem a importância do diagnóstico precoce das neoplasias mamárias em cadelas de forma a possibilitar um melhor prognóstico.

Muitas doenças, que acometem o homem e os animais, estão relacionadas ao estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio ou de óxido nítrico. Os danos mais graves são aqueles causados ao DNA ou ao RNA da célula. Quando ocorre a quebra da cadeia de DNA, ela pode se reconectar em outra posição, alterando a ordem de suas bases. Este evento é um dos processos desencadeadores de mutação, que pode estar relacionado a oncogênese. No presente estudo, o marcador de lipoperoxidação lipídica de componentes da membrana celular, o MDA, considerado um biomarcador de dano oxidativo, apresentou aumento sérico significativo (2,0 e 2,7 vezes) nas neoplasias benignas e malignas, respectivamente em relação ao controle. Resultados semelhantes foram relatados em mulheres portadoras de câncer de mama por meio da avaliação dos níveis de capacidade antioxidante e dos níveis séricos de MDA (SENER et al., 2007). Em animais, os estudos sobre a associação entre neoplasias e estresse oxidativo são escassos. Níveis significativamente mais elevados de MDA foram observados em cães com diferentes tipos de neoplasias, incluindo as mamárias em comparação com animais saudáveis (MACOTPET et al., 2013). Nesse trabalho, a concentração sérica de MDA foi determinada pelo método conhecido por TBARS, ou seja, pela determinação sérica de substâncias reativas ao ácido barbitúrico, onde o MDA é o principal componente. Outros estudos indicam também a relação entre dano oxidativo e o desenvolvimento de tumores mamários em cadelas, correlacionando, principalmente, valores séricos e teciduais de MDA, por meio da técnica de TBARS, e também de níveis de antioxidantes como a vitamina E e vitamina C (SZCZUBIAL et al., 2004; FRANCISCO NETO et al., 2005; KUMARAGURUPARAN et al., 2005; ASKAR et al., 2009; GALVÃO, 2009). Ainda, Askar et al.(2009) demonstrou a existência de concentrações aumentadas de MDA e óxido nítrico (NO) e diminuição das concentrações séricas de vitamina C, considerada a primeira linha de defesa antioxidante, em dez cadelas portadoras de neoplasias mamárias malignas. Além do estresse oxidativo detectado, segundo este autor, a diminuição de defesas antioxidantes como a vitamina C, poderia estar relacionada à carcinogênese. No presente estudo, valores bem mais elevados em cadelas portadoras de neoplasia maligna, e valores também mais elevados no grupo de tumores benignos sustentam a afirmação de que a presença de neoplasia mamária está relacionada com estresse oxidativo. Outro aspecto a ser destacado foi a diminuição significativa (0,8 vezes) nos níveis de MDA nos animais com

tumores malignos após o tratamento, o que indica uma redução no estresse oxidativo após a remoção dos tumores.

A anemia é considerada como uma das alterações hematológicas mais frequentes em pacientes com câncer, podendo estar relacionada à infiltração da medula óssea por células neoplásicas, mais comum nas doenças sistêmicas, como o linfoma. Pode ainda estar relacionada aos efeitos citotóxicos de fármacos durante o tratamento, secundária a perdas sanguíneas, hemólise, geralmente imunomediada e também, por citocinas inflamatórias relacionadas à doença crônica (VAIL; THAMM, 2005; KOBUNE; KATO; NIITSU, 2008). No presente estudo verificou-se que cadelas portadoras de neoplasias malignas de mama apresentaram correlação significativa entre a presença de anemia e níveis séricos mais elevados de MDA. No entanto, após o tratamento não se observou mais essa diferença significativa, sugerindo que o estresse oxidativo está relacionado à ocorrência de anemia nos animais com tumores malignos de mama. Em cães portadores de linfoma multicêntrico observou-se aumento da lipoperoxidação lipídica de membranas, por meio de concentrações aumentadas de TBARS, sem correlacionar, no entanto, a condição de estresse oxidativo com anemia (LUCAS et al., 2008; WINTER et al., 2009). Em pacientes humanos com linfoma as concentrações elevadas de TBARS foram associadas ao aumento da peroxidação lipídica na membrana eritrocitária resultando em aumento da fragilidade osmótica e morte de eritrócitos (ABOU-SEIF; RABIA; NASR, 2000). Em crianças portadoras de leucemia linfoblástica aguda, também foi detectada a condição de estresse oxidativo por meio da verificação de elevadas concentrações de TBARS, considerada como uma das causas de anemia nesses pacientes (GOHSH, 2005).

Em conclusão, os resultados deste estudo indicam que o estresse oxidativo está associado às neoplasias mamárias em cadelas de modo similar ao relatado em mulheres. Devido a detecção de concentrações significativamente maiores de MDA sérico nas cadelas portadoras de neoplasia mamária maligna, quando comparadas aos grupos de neoplasias benignas e controle, e também nas cadelas com anemia, pode se afirmar que a identificação do estado de estresse oxidativo nestes animais, pode ser utilizada também como um fator preditivo de prognóstico. Deve-se destacar ainda que neste estudo mensurou-se diretamente os níveis de MDA, ao contrário de outros estudos em que o estresse oxidativo foi verificado de modo indireto, por meio de substâncias reativas aos barbituratos (TBARS). Outro aspecto importante é a necessidade de ampliar os estudos para determinação de parâmetros de referência na espécie canina para MDA e outros biomarcadores de dano oxidativo.

A mensuração de biomarcadores de estresse oxidativo ou mesmo de substâncias antioxidantes a partir do soro ou de tecidos, pode possibilitar uma série de novas informações a partir de pesquisas que mostrem a relação entre os radicais livres e as doenças, quer como causa, quer como efeito de condições patológicas. A importância do uso de antioxidantes como tratamento adjuvante que objetive minimizar o dano oxidativo também pode ser objeto de estudo na medicina de cães. Estudos que busquem a padronização de técnicas laboratoriais e a definição de parâmetros que possam ser utilizados como referência nas diferentes espécies de interesse médico veterinário serão de grande utilidade.

Referências

ABOU-SEIF, M.A.M.; RABIA, A.; NASR, M. Antioxidant Status, erythrocyte membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in malignant lymphoma patients. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. v. 38, n. 8, p. 737 – 42, 2000.

ASKAR, T.K.; SALMANOGLU, B.; SALMANOGLU, R.; ERKAL, N.; BESKAYA, A. Changes in oxidative status and trace element levels in dogs with mammary tumors. *Acta Veterinaria*. Belgrado, v. 59, n. 4, p. 405-11, 2009.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. *Química Nova*. São Paulo, v.29, n.1, p.113-23, 2006.

BARTLETT, M. S. Tests of significance in factor analysis. *British Journal of Mathematical and Statistical Psychology*, v. 3, n. 2, p. 77-85, 1950.

CASSALI, G.D.; LAVALLE, G.E.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A.B.; GHEVER, C.; SOBRAL, R.; AMORIM, R.L.; OLIVEIRA, L.O.; SUEIRO, F. A.; BESERRA, H.E.O.; BERTAGNOLLI, A.C.; GAMBA, C.O.; DAMASCENO, K.A.; CAMPOS, C.B.; ARAUJO, M.R.; CAMPOS, L.C.; MONTEIRO, L.N.; NUNES, F.C.; HORTA, R.S.; REIS, D.C.; LUVIZOTTO, M.C.R.; MAGALHÃES, G.M.; RAPOSO, J.B.; FERREIRA, A.M.R.; TANAKA, N.M.; GRANDI, F.; UBUKATA, R.; BATSCHINSKI, K.; TERRA, E.M.; SALVADOR, R.C.L.; JARK, P.C.; DELECRODI, J.E.R.; NASCIMENTO, N.A.; SILVA, D.N.; SILVA, L.P.; FERREIRA, K.C.R.S.; FRESHE, M.S.; DI SANTIS, G.W.; SILVA, E.O.; GUIM, T.N.; KERR, B.; CINTRA, P.P.; SILVA, F.B.F.; LEITE, J.S.; MELLO, M.F.V.; FERREIRA, M.L.G.; FUKUMASU, H.; SLAGADO, B.S.; TORRES, R.

- Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v.7, n.2, p. 38 – 69, 2014.
- COOLEY, J. W.; TUKEY, J. W. An algorithm for the machine calculation of complex Fourier series. *Mathematics of computation*, v. 19, n. 90, p. 297-301, 1965.
- DE LAS MULAS, J.M.; ORDAS, J.; MILLAN, Y. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: na immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Research And Treatment*. v. 80, p. 363-367, 2003.
- DE NARDI, A. B. et al. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. *Archives of Veterinary Science*, v. 7, n. 2, 2002.
- DE NARDI, A.; FERREIRA, T.M.M.R.; ASSUNÇÃO, K.A. Neoplasias mamárias. In: *Oncologia em cães e gatos*. Editora. Roca, São Paulo, p. 499-516, 2016.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and biology of ageing. *Nature*. Londres, v. 9, n. 408, p. 239-47, 2000.
- FRANCISCO NETO, A.; SILVA, J.C.C.B.; FAGUNDES, D.J.; PERCÁRIOS, N.F.; JULIANO, Y.; MOREIRA NETO, A.A. Estudo das alterações oxidativas, da capacidade antioxidante total e do óxido nítrico, em ratos submetidos à isquemia e reperfusão de membros posteriores. *Acta Cirúrgica Brasileira*. São Paulo, v. 20, n. 2, p. 48-56, 2005.
- FREEMAN, L.M.; RUSH, J.E.; MILBURY, P.E.; BLUMBERG, J.B. Antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in dogs with congestive heart failure. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. Lakewood, v.19, p. 537-41, 2005.
- GALVÃO, A.L.B. Estresse oxidativo nos estágios finais da doença renal crônica em pequenos animais. *Archives of Veterinary Science*. Curitiba, v. 14, n. 3, p.178-86, 2009.
- GÉRARD-MONNIER, D., ERDELMEIER, I., RÉGNARD, K., MOZE-HENRY, N., YADAN, J. C., & CHAUDIERE, J. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chemical research in toxicology*, v. 11, n.10, p. 1176-1183, 1998.
- GHOSH, S.; BANDYOPADHYAY, S.; BHATTACHARYA, D.K.; MANDAL, C. Altered erythrocyte membrane characteristics during anemia in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Annals of Hematology*. v. 84, p. 76-84, 2005.
- GOLDSCHMIDT, M. et al. Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology Online*, v. 48, n. 1, p. 117-131, 2011.
- ITOH, T.; UCHIDA, K.; ISHIKAWA, K.; KUSHIMA, K.; KUSHIMA, E.; TAMADA, H.; MORITAKE, T.; NAKAO, H.; SHII, H. Clinicopathological survey of 101 canine mammary

gland tumors: Differences between small-breed dogs and others. *J. Vet. Med. Sci.* v. 67, n. 3, p. 345-347, 2005.

JAIN, C.N. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea e Febiger, 417 p., 1993.

KADIISKA, M.B.; GLADEN, B.C.; BAIRD, D.D.; GERMOLEC, D.; GRAHAM, L.B.; PARKER, C.E.; NYSKA, A.; WACHSMAN, J.T.; AMES, B.N.; BASU, S.; BROT, N.; FITZGERALD, G.A.; FLOYD, R.A.; GEORGE, M.; HEINECKE, J.W.; HATCH, G.E.; HENSLEY, K.; LAWSON, J.A.; MARNETT, L.J.; MORROW, J.D.; MURRAY, D.M.; PLASTARAS, J.; ROBERTS, L.J.; ROKACH, J.; SHIGENAGA, M.K.; SOHAL, R.S.; SUN, J.; TICE, R.R.; VAN THIEL, D.H.; WELLNER, D.; WALTER, P.B.; TOMER, K.B.; MANSON, R.P.; BARRETT J.C. Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation of lipids, proteins and DNA markers of CCl₄ poisoning? *Free Radical Biology and Medicine*. Nova Iorque, v.38, n. 6, p. 698-710, 2005.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Ed.). *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic press, 2008.

KOBUNE, M.; KATO, J.; NIITSU, Y. Anemia in patients with cancer. *Nippon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*. v. 66, n. 3, p. 524-529, 2008.

KUMARAGURUPARAN, R.; BALACHANDRAN, C.; MANOHAR, B.M.; NAGINI, S. Altered oxidant-antioxidant profile in canine mammary tumours. *Veterinary Research Communications*. Nova Iorque, v. 29, n. 4, p. 287-96, 2005.

LANA, S.E.; RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J; VAIL, D.M. *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 4a. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, p.619-636, 2007.

LAVALLE, G.E.; BERTAGNOLLI, A.C.; TAVARES, W.L. Cox-2 expression in canine mammary carcinoma: correlation with angiogenesis and overall survival. *Veterinary Pathology*, v. 46, p. 1275-1280, 2009.

LUCAS, S.R.R.; GIMENO, M.G.; MORI, C.S.; WIRTHL, V.A.B.F.; Evaluation of oxidant/antioxidante status in dogs with multicentric lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 22, n.3, p. 722, 2008.

MACEDO, T.R. Avaliação das concentrações de superóxido dismutase e da fragilidade osmótica eritrocitária em cães com linfoma multicêntrico com e sem anemia. *Dissertação de Mestrado*, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 96p., 2010.

MACOTPET, A.; SUKSAWAT, F.; PEERAPOL, S.; PIMPAKDEE, K.; PATTARAPANWICCHIEN, E.; TANGRASSAMEEPRASERT, R.; BOONSIRI, P.

- Oxidative stress in cancer-bearing dogs assessed by measuring serum malondialdehyde. *BMC Veterinary Research*. Nova Iorque, v. 9, p. 101-105, 2013.
- MARTINS, A.M.C.R.P.; TAMASO, E.; GUERRA, J.L. Retrospective review and systematic study of mammary tumors in dogs and characteristics of the extracellular matrix. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 39, n. 1, p. 38-42, 2002.
- MACEWEN, E.G.; WITHROW, S.J. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. *Small animal clinical oncology*. 2 ed. Philadelphia: Saunders, p.356-372, 2007.
- MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. In: *World Health Organization international histological classification of tumors of domestic animals*. 2ed. v.VII. Washington, D.C. Armed Forces Institute of Pathology in cooperation with the American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating. Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology, 1999.
- MONTEIRO, A. P. S. Auto-exame das mamas: frequência do conhecimento, prática e fatores associados. *Revista brasileira de ginecologia e obstetrícia*. v. 25, n. 3, p. 201-205, 2003.
- OLIVEIRA, L.O.; OLIVEIRA, R.T.; LORETTI, A.P.; RODRIGUES, R.; DRIEMEIER, D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta Scientiae Veterinariae*. v. 31, n.2, p. 105-110, 2003.
- PIRES, A. M. T. Avaliação das reações agudas da pele e seus fatores de risco em pacientes com câncer de mama submetidas a radioterapia. *Dissertação (Mestrado em Ciências)* - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 52 p., 2007.
- RIBAS, C.R.; DORNBUSCH, P.T.; FARIA, M.R.; WOUK, A.F.P.F.; CIRIO, S.M. Alterações clínicas relevantes em cadelas com neoplasias mamárias estadiadas. *Archives of Veterinary Science*. v.17, n.1, p.60-68, 2012.
- SENER, D.E.; GÖNENÇ, A.; AKINCI, M; TORUM, M. Lipide peroxidation and total antioxidant status in patients with breast cancer. *Cell Biochemistry and Function*. Chichester, v. 25, n.4, p. 377-82, 2007.
- SCHAFER, F.Q.; BUETTNER, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free radical biology and medicine*. v. 30, n.11, p. 1191-212, 2001.
- SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, v. 52, n. 3-4, p. 591-611, 1965.

- SZCZUBIAL, M.; KANKOFER, M.; LOPUSZYNSKI, W.; DABROWSKI, R.; LIPKO, J. Oxidative stress parameters in bitches with mammary gland tumours. *Journal of Veterinary Medicine, A Physiology, Pathology, Clinical Medicine*. Berlim, v.51, n. 7-8, p. 336-40, 2004.
- THURÓCZY, J.; REISVAAG, G.J.; PERGE, E. Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, v. 137, n.2 a 3, p. 122 – 129, 2007.
- TORÍBIO, J. M. D. M. L.; LIMA, A. E.; MARTINS FILHO, E. F.; RIBEIRO, L. G. R.; D'ASSIS, M. J. M. H.; TEIXEIRA, R. G.; & NETO, C. Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de Salvador, Bahia. *Revista Ceres*, p. 427-433, 2012
- VAIL, D.M.; THAMM, D.H. Hematopoietic tumors. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E. C. *Textbook of veterinary internal medicine*. 6. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, cap. 181, p. 732-47, 2005.
- VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quimica Nova*. São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1323-38, 2007.
- WINTER, J.L.; BARBER, L.G.; FREEMAN, L.; GRIESSMAYR, P.C.; MILBURY, P.E.; BLUMBERG, J.B. Antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. Philadelphia, v.23, p. 311-16, 2009.
- WINTROBE, M. M. *Clinical Hematology* (7th edn.) Lea and Febiger. Philadelphia 1976 pp1000, v. 1001, 1974.
- ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Fisiopatologia da neoplasia mamária em cadelas–revisão. *Clínica Veterinária*, São Paulo, v. 32, p. 50-54, 2001.

5 ARTIGO B

HIPERCALCEMIA EM CADELAS PORTADORAS DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS MALIGNAS

HYPERCALCEMIA IN BITCHES WITH MALIGNANT MAMMARY NEOPLASMS

RESUMO

A hipercalcemia maligna, ou seja, aquela que ocorre como um processo mórbido conhecido por síndrome paraneoplásica, tem sido detectada em diversos tipos de tumores malignos na espécie canina, como os linfomas, neoplasias dos sacos anais e também nas neoplasias mamárias, nestas últimas porém, sem a determinação exata de quais os mecanismos envolvidos em sua ocorrência bem como sua incidência. Neste estudo, 100 cadelas com câncer de mama, com diagnóstico histopatológico confirmado, foram submetidas a avaliação clínica para estadiamento da doença, avaliação hematológica, bioquímica sérica, incluindo testes de função renal, hepática e níveis séricos de cálcio total e a fração ionizada, no momento de sua abordagem e 30 dias após realização de tratamento. O carcinoma em tumor misto foi o padrão histológico mais frequente (26%). Em 52 (52%) das cadelas doentes, foi constatada a hipercalcemia, por meio da dosagem de cálcio ionizado, o que não foi verificado quando a análise foi feita por meio de dosagem de cálcio total, onde apenas 4 (4%) apresentaram hipercalcemia. Não foi verificada associação entre hipercalcemia e o padrão histológico das neoplasias, porém a correlação foi verificada entre hipercalcemia e estadiamentos mais avançados da doença, principalmente à partir do estágio III, sugerindo que a detecção de hipercalcemia possa estar correlacionada ao pior prognóstico, demonstrando a importância da pesquisa referente a presença de síndromes paraneoplásicas em cadelas com neoplasias mamárias.

Palavras-chave: Cálcio ionizado. Caninos. Tumores de mama. Síndromes Paraneoplásicas.

ABSTRACT

Malignant hypercalcemia is a morbid process known as paraneoplastic syndrome. It has been detected in several types of malignant tumors in the canine species, such as lymphomas, neoplasms of anal sacs and also in mammary neoplasms, without the exact determination of the mechanisms involved in its occurrence as well as its incidence. In this study, 100 bitches with mammary malignant neoplasia, diagnosed by histopathological analysis, were submitted to clinical evaluation for disease staging, hematological evaluation, serum biochemistry, including renal function tests, hepatic and total calcium serum levels and ionized fraction. These parameters were analyzed at the time of the initial attendance and 30 days after the treatment. The most frequent histological pattern was carcinoma in mixed tumors (26%). In 52 (52%) of the diseased dogs, hypercalcemia was observed by means of ionized calcium dosing, which was not verified when the analysis was done by means of total calcium dosing, where only 4 (4%) presented hypercalcemia. No correlation was found between hypercalcemia and the histological pattern of the neoplasms. However, the correlation was verified between hypercalcemia and more advanced stages of the disease, mainly from stage III, suggesting that the detection of hypercalcemia may be correlated with worse prognosis, showing the importance of the research concerning the presence of paraneoplastic syndromes in bitches with mammary neoplasms.

Key words: Ionized Calcium. Canine. Mammary Neoplasms. Paraneoplastic Syndromes.

Introdução

As neoplasias mamárias na cadela correspondem a aproximadamente 52 % de todos os tumores caninos, sendo considerada uma alteração de grande interesse na oncologia veterinária, pois devido a sua elevada incidência, representam um amplo tema de pesquisas acerca de métodos diagnósticos, tratamentos e fatores prognósticos (QUEIROGA; LOPES, 2002; CASSALI et al., 2014).

As neoplasias mamárias podem estar relacionadas a uma série de alterações sistêmicas denominadas de síndromes paraneoplásicas. Alterações hematológicas como anemia, leucocitose, coagulopatias, trombocitopenias e coagulação intravascular disseminada têm sido mais frequentemente identificadas e estudadas (BERGMAN, 2007). Em um estudo prévio com 25 cadelas portadoras de tumor de mama, diversas alterações hematológicas como anemia (24%) e leucocitose (44%) e bioquímicas, como hipocalcemia (76%) e hipoalbuminemia (32%) foram detectadas em um número significativo de animais (DUDA, 2014). Estes dados indicam que as neoplasias mamárias podem também ser a causa de outros distúrbios não relacionados à presença local do tumor ou suas metástases. Os mecanismos pelos quais ocorrem as síndromes paraneoplásicas em cadelas portadoras de tumores de mama, bem como a sua frequência e incidência, não são bem esclarecidos.

A hipercalcemia na espécie canina tem sido relatada em diversos tipos de tumores, incluindo as neoplasias mamárias, porém, sua frequência tem sido associada com maior frequência a linfomas e neoplasias dos sacos anais (BERGMAN, 2013). Em mulheres, a hipercalcemia associada às neoplasias mamárias malignas foi relacionada à produção de um polipeptídeo denominado proteína relacionada ao paratormônio (PTHrP) e outras citocinas pelas células neoplásicas. Esses fatores, além de promover a reabsorção óssea de cálcio, também influenciam a liberação de fatores de crescimento presentes na matriz óssea, estimulando o crescimento das células malignas (KHOSLA, 2001). Embora a hipercalcemia seja frequentemente citada em artigos sobre neoplasias mamárias na cadela, seu mecanismo não é ainda bem elucidado.

Considerando que os dados disponíveis na literatura sobre ocorrência de hipercalcemia em cadelas portadoras de neoplasias de mama são escassos, o presente estudo teve como principal objetivo verificar a frequência de hipercalcemia em cadelas portadoras de neoplasia mamária maligna, por meio da mensuração dos valores séricos de cálcio total e cálcio ionizado, bem como averiguar possíveis correlações entre hipercalcemia, estadiamento clínico e classificação histológica dos tumores, alterações bioquímicas e hematológicas.

Material e Métodos

Para a realização deste estudo foram selecionadas 119 cadelas com câncer mamário atendidas no período de outubro de 2012 a dezembro de 2013, no Hospital Veterinário do Centro Universitário de Maringá – Unicesumar, localizado no município de Maringá, no Paraná, após aprovação pelo comitê de bioética em experimentação animal institucional (COBAC/CESUMAR 014/2012). Os animais incluídos no estudo, após autorização de seus tutores, passaram por avaliação clínica, estadiamento clínico da doença, colheita de sangue para realização de avaliação hematológica, bioquímica sérica e dosagem de cálcio total (Ca^t) e fração ionizada (iCa). Para determinação de parâmetros hematológicos foram utilizadas as técnicas de rotina descritas por Jain (1993). As amostras de sangue foram acondicionadas em frasco contendo o anticoagulante ácido etileno-diaminotetracético (3 ml de sangue). As contagens totais de eritrócitos e de leucócitos e a determinação da concentração de hemoglobina foram realizadas com auxílio do contador automático de células (Celm CC 530/ DA 500®, Brasil). O volume globular (VG) foi determinado pelo método do microhematócrito e as concentrações de proteínas plasmáticas pelo método do refratômetro. O volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados seguindo as fórmulas descritas por Wintrobe (1974). A contagem diferencial de leucócitos e estimativa da concentração de plaquetas foi realizada em esfregaços sanguíneos corados com corante rápido Instant-Prov® contadas em 10 campos com média de 200 eritrócitos.

Para realização dos exames bioquímicos foram colhidas amostras de sangue (10 ml) de cada animal por punção da veia jugular. As amostras foram acondicionadas em tubos sem anticoagulante para a determinação das concentrações bioquímicas de ALT, FA, ureia e creatinina, seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante (kits comerciais específicos Gold Analisa®). Para determinação da ureia e ALT utilizou-se o método cinético-UV e para a determinação da creatinina e FA o método cinético-colorimétrico. A leitura e obtenção dos resultados foram realizadas em analisador fotométrico Bioplus-2000®, Brasil. As dosagens séricas de cálcio total e fração ionizada foram realizadas no Laboratório São Camilo, no município de Maringá – PR. A determinação da concentração de cálcio ionizado foi feita pelo método do eletrodo seletivo com correção automática para variação de pH e a concentração de cálcio total por espectrofotometria com o uso de kit comercial Labtest®.

Para a realização de estadiamento clínico foram também incluídos exames de imagem para pesquisa de metástase distante por meio de ultrassonografia abdominal e avaliação radiográfica do tórax, de acordo com Cassali et al., 2014.

Após avaliação clínica inicial e obtenção dos resultados das análises clínicas, os animais foram submetidos ao tratamento cirúrgico, conforme indicação para cada caso. Nos casos onde houve suspeita de diagnóstico de neoplasias mamárias sem indicação para tratamento cirúrgico, como os carcinomas inflamatórios, foi realizada apenas biopsia incisional. Após realização dos procedimentos cirúrgicos, os fragmentos de tecidos neoplásicos e linfonodos inguinais e axilares foram encaminhados para análise histopatológica, permitindo desta forma a obtenção de todas as informações necessárias para estadiamento e confirmação do diagnóstico de neoplasia maligna de mama. Trinta dias após a realização das cirurgias ou biopsias, as cadelas foram submetidas novamente a colheita de sangue para repetição das mesmas avaliações laboratoriais realizadas inicialmente (grupo pós-tratamento). Quatro animais não foram avaliados nesse período pois foram a óbito ou submetidos à eutanásia em decorrência de complicações. As cadelas que tiveram o diagnóstico clínico e histopatológico de carcinoma inflamatório primário ou secundário foram tratadas de modo paliativo, com protocolo de analgesia multimodal, anti-inflamatórios não esteroidais, quimioterapia e terapia de suporte.

Análise Estatística

Os dados foram testados para normalidade pelo teste de Shapiro Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) e para homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett (BARTLETT, 1950). Valores normais de referência e em pré-tratamento foram comparados pelo teste t para amostras independentes e os grupos em pré-tratamento e em pós-tratamento foram comparados pelo teste t pareado. Para verificar associações entre os níveis séricos de cálcio e alterações nos exames hematológicos, bioquímicos e o efeito do estadiamento dos tumores foi realizada análise de variância e análise de regressão.

Resultados

Mensuração de cálcio total e ionizado

Os animais com câncer de mama apresentaram valores séricos de cálcio total dentro dos parâmetros de normalidade tanto antes quanto após o tratamento. Em relação ao cálcio ionizado foram observados níveis superiores aos parâmetros de normalidade antes do tratamento. No entanto, após o tratamento os valores apresentaram diminuição para os parâmetros de normalidade. Os valores médios de cálcio total e ionizado mensurados nos animais antes e após o tratamento estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores de referência, médias e desvios padrão, valores mínimos e máximos mensurados para cálcio total e cálcio ionizado dos animais em pré e pós-tratamento.

Variável	Valores Normais de Referência**	Pré-tratamento (n=100)	Pós-tratamento (n=94)	P
Cat (mmol/L)	2,25 – 2,99	2,56±0,70 a (2,02- 3,79)	2,57±0,90 a (2,22-3,54)	0,9691
iCa (mmol/L)	1,00 – 1,45	1,68±0,55 a (1,19-4,11)	1,46±0,31 b (1,12-2,88)	<0,001

CAT: Cálcio Total; CAI: Cálcio Ionizado

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem pelo teste t pareado ($p < 0,001$). ** SCHENK; CHEW, 2005

Foram analisados também os coeficientes de correlações entre as variáveis *Cat* e *iCa* para os dois grupos estudados. Verificaram-se correlações baixas, embora seja verificada correlação significativa e positiva entre *Cat* e *iCa* em pré-tratamento (0,39, $P < 0,01$), enquanto que no pós-tratamento não há correlação entre essas variáveis (0,18, $P > 0,01$).

Foram incluídas neste estudo apenas cadelas portadoras de neoplasias malignas de mama. Dentre as 119 cadelas incluídas inicialmente no estudo, 100 cadelas (84,1%) foram diagnosticadas neoplasias malignas, sendo as mais frequentes o carcinoma em tumor misto (CTM - 26%), os carcinossarcomas (CASA - 14%) e os adenomioepiteliomas malignos (CACO - 13%). A frequência dos demais padrões histológicos das neoplasias mamárias malignas observadas neste estudo está disposta na Tabela 2. Observou-se que na maioria dos

casos de tumores malignos houve hipercalcemia detectada pela dosagem sérica de cálcio ionizado, o mesmo não ocorrendo para o cálcio total.

Dentro do grupo de 100 cadelas portadoras de neoplasia maligna de mama, em 24 animais (24%) também foram detectados tumores benignos em diferentes mamas acometidas. Vinte e nove (29%) animais apresentaram tumores em apenas uma mama e 71 (71%) apresentaram mais de uma mama acometida. As cadelas portadoras de neoplasias malignas apresentaram média de idade de $9,24 \pm 2,89$ anos, sendo a mais jovem com dois anos e a mais idosa com 15 anos de idade. As mamas mais acometidas por tumores malignos foram as inguinais (31%), seguidas pelas abdominais caudais (27%), abdominais craniais (20%), torácicas caudais (13%) e torácicas craniais (9%).

Com relação às raças de cadelas acometidas por neoplasia maligna de mama neste estudo, 41 (41%) animais eram sem raça definida, 15 (15%) animais eram da raça poodle e 5 (5%) cadelas da raça rottweiler, sendo os demais animais distribuídos em baixa frequência nas outras raças.

Tabela 2 – Frequência de hipercalcemia (Cálcio Total e Cálcio Ionizado) de acordo com padrão histológico* dos tumores no grupo pré-tratamento.

Padrão Histológico*	Frequência (%)	Hipercalcemia	
		iCa (%)	Cat (%)
Carcinoma em Tumor Misto	26	10	-
Carcinossarcoma	14	11	1
Adenomioepitelioma Malígnio	14	9	1
Carcinoma Tubular	12	5	-
Carcinoma Sólido	8	6	1
Carcinoma <i>in Situ</i>	7	-	-
Carcinoma Papilar	5	4	-
Carcinoma Anaplásico	4	-	-
Osteossarcoma	4	3	1
Fibrossarcoma	2	2	-
Sarcoma em tumor misto	2	-	-
Carcinoma de Células Escamosas			
Mamário	1	1	-
Carcinoma Micropapilar	1	1	-
Total	n=100	n=52	n=4

*CASSALI, 2014

Quanto ao estadiamento, verificou-se que a maioria dos animais estava em estadiamento clínico III, com 38 animais, sendo que nos demais estadiamentos houve um número similar de animais (Tabela 3). Das 38 cadelas em estágio III (tumores com mais de 5 cm), 16 cadelas (50%) apresentavam tumores de grandes dimensões e ulcerados. Nas 15 cadelas em estágio IV, 10 animais também apresentaram tumores de grandes dimensões e ulcerados, além da presença de metástase em linfonodos inguinais ou axilares. Nas 14 cadelas em estágio V, foram observadas a presença de metástases em pulmão em oito cadelas (57% das metástases), em linfonodos distantes em três animais (21%), em tecido ósseo em dois animais (14%), sendo um em costela e outro no esterno, e um animal (7%) apresentou metástase no fígado.

Após a realização de abordagem clínica inicial, estadiamento clínico e realização de exames complementares, as cadelas foram submetidas ao tratamento apropriado para cada caso. Foram realizadas 23 mastectomias totais bilaterais, mastectomia total unilateral em 60

animais, mastectomia regional em 10 animais, quimioterapia em três animais e quatro animais receberam apenas cuidados paliativos. Em 89 (89%) das cadelas submetidas a procedimento cirúrgico foi também realizada a ovariosalpingohisterectomia.

As complicações observadas no grupo das 100 cadelas portadoras de neoplasia maligna de mama foram a morte de quatro animais antes dos 30 dias de acompanhamento da evolução (4%), deiscência parcial de sutura da ferida cirúrgica (5%), insuficiência renal aguda (5%) e um caso (1%) de comorbidade, onde o animal teve também o diagnóstico de leucemia.

Em 43 (43%) animais constatou-se alteração nos parâmetros hematológicos e em 25 (25%) animais nos parâmetros bioquímicos. Os resultados das avaliações hematológicas e bioquímicas estão dispostos no quadro 1 e 2, respectivamente.

Para os animais em pré e pós-tratamento não foi observado o efeito da idade sobre nenhuma das variáveis ($p > 0,05$). Quanto aos exames bioquímicos (ALT, FA, ureia e creatinina) verificou-se que 77% das cadelas em pré-tratamento e 81% das cadelas em pós-tratamento apresentaram valores dentro da normalidade. Entre os animais em pré-tratamento e pós-tratamento, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre presença (SIM) ou ausência (NÃO) de alterações bioquímicas séricas, e também não houve efeito significativo ($p > 0,05$) do estadiamento sobre o *Cat*. Para *iCa* houve efeito quadrático do estadiamento ($p = 0,026$), mostrando que do estadiamento I para o II o nível de *iCa* diminuiu e depois esses níveis tiveram acréscimo até o estadio V (Tabela 3).

Tabela 3 – Médias e desvios padrão, para Cálcio Total e Cálcio Ionizado dos animais em pré-tratamento em relação a presença de outras alterações bioquímicas e ao estadiamento clínico.

Variáveis		Cat (mmol/L)	iCa (mmol/L)
Alterações bioquímicas	Sim (n=23)	2,58±1,27	1.88±0,64
	Não (n=77)	2,57±1,01	1.65±0,53
P valor		NS	NS
Estadiamento	I (n=15)	2,62±0,5	1,5±0,4 <i>a</i>
	II (n=18)	2,54±0,7	1,4±0,2 <i>a</i>
	III (n=38)	2,57±0,5	1,6±0,4 <i>a</i>
	IV (n=15)	2,59±0,4	1,9±0,6 <i>b</i>
	V (n=14)	2,59±0,5	2,1±0,7 <i>b</i>
P valor		NS	< 0,001*

NS: Não Significativo; *: significativo ($p < 0,05$); R^2 : Coeficiente de Determinação. Equação de regressão para CAI em função do estadiamento: $Y = 1,65 - 0,187x + 0,066x^2$ · $R^2 = 0,27$

Alterações Hematológicas	Valores Normais de Referência *	Pré-Tratamento (n=100)	Pós-Tratamento (n=96)
Anemia (Hb)	12-18 g/dl	31% 9,2 ±1.4 (8.9 – 11.6)	23% 9,3±1.1 (9.0 – 11.8)
Trombocitopenia	2 – 5 x 10 ⁵ /μL	11% 1.2±0.3 x 10 ⁵ /μL (0.8 – 1.7)	4% 1.0±0.4 x 10 ⁵ /μL (0.7-1.6)
Neutrofilia	6.000 – 17.000/μL	6% 25.300±1.400/μL (21.200-32.000)	9% 22.000±1.900/μL (19.300 – 25.500)
Trombocitose	2 – 5 x 10 ⁵ /μL	4% 9.5±2.1 x 10 ⁵ /μL (7.8 – 10.3)	1% 9.8 x 10 ⁵ /μL
Leucopenia	6.000 – 17.000/μL	1% 3.100/μL	-
Eritrocitose	5.5 – 8.5 x 10 ⁶ /μL	1% 10.25 x 10 ⁶ /μL	-

Quadro 1 - Valores normais de referência, média, desvio padrão e frequência de alterações hematológicas verificadas nos grupos pré e pós-tratamento. *JAIN, 1993.

Parâmetros Bioquímicos Alterados/ Elevados	Valores Normais de Referência *	Pré-Tratamento (n=100)	Pós-Tratamento (n=96)
ALT	0 – 102 U/L	9 % 235±20 U/L (210 – 420)	7 % (190±35) U/L (170-280)
Creatinina	0.5 – 1.5 mg/dL	8 % 1.8±1.3 mg/dL (1.6 – 3.3)	6 % 2.0±1.5 mg/dL (1.7- 3.6)
Ureia	21 – 60 mg/dL	5 % 155±35 mg/dL (82- 230)	4 % 130±15 mg/dL (90-155)
FA	0 – 156 U/L	4 % 200±30 U/L (170-230)	1 % 250 U/L

Quadro 2 - Valores normais de referência, média, desvio padrão e frequência de alterações bioquímicas séricas verificadas nos grupos pré e pós-tratamento. * KANEKO et al., 1997

Discussão

De acordo com a maioria dos autores consultados, o risco de desenvolvimento de tumores mamários malignos na espécie canina pode variar. De acordo com a maioria dos autores de artigos internacionais, cerca de 54 % dos tumores de mama na cadela são benignos (RUTTEMAN et al. 2003; MISDORP, 2002, ITOH et al. 2005; SORENMO et al., 2013), havendo discrepâncias quando comparados à maioria dos artigos brasileiros, que referem de 68 à 91% de prevalência de tumores malignos (ZUCCARI et al. 2001; De NARDI et al. 2002; MARTINS et al. 2002; OLIVEIRA et al. 2003). No presente estudo, das 119 cadelas abordadas portando neoplasia mamária, 100 (84,1%) animais apresentaram neoplasias malignas, ou seja, uma alta incidência de tumores malignos quando comparados a grande maioria dos estudos epidemiológicos. Alguns fatores de risco podem ser citados, principalmente o fato de que as cadelas participantes deste estudo eram em sua maioria idosas, com média de idade superior a nove anos (9,24±2,89) e não ovariectomizadas precocemente. Segundo um estudo retrospectivo de prevalência de neoplasias mamárias em

cães, onde foram avaliados os formulários de avaliação histopatológica de 1.465 cães, com diagnóstico de neoplasias mamárias, 390 (26,6%) eram neoplasias benignas e 1.075 (73,3%) eram malignos, apresentando uma relação próxima, com a grande maioria de tumores malignos, quando comparado a este estudo (OLIVEIRA FILHO et al., 2010).

Em relação ao padrão histológico, estudos prévios com frequência são baseados na classificação histológica de tumores de mama sugerida por Goldschmidt et al., 2011 ou a classificação de Moulton, da Organização Mundial da Saúde *apud* Misdorp et al., 1999, relatando maior frequência de carcinomas túbulo-papilares e carcinomas complexos. Um artigo publicado recentemente sobre a existência de hipercalcemia em cadelas com neoplasia mamária, onde a classificação histológica utilizada foi a proposta por Cassali et al., 2014, demonstrou a ocorrência de carcinoma em tumor misto ocupando a segunda posição dentre os tumores diagnosticados em 33% dos casos (RAPOSO-FERREIRA et al., 2016). No presente estudo, o padrão histológico de maior ocorrência foi o carcinoma em tumor misto (26%), segundo a classificação proposta por Cassali et al., 2014. O carcinoma em tumor misto possui como característica a apresentação de um componente de origem epitelial maligna e um componente de origem mesenquimal com características benignas. Não foi observada correlação estatisticamente significativa entre os níveis aumentados de cálcio e o padrão histológico das neoplasias.

O principal resultado obtido neste estudo foi a constatação da presença do estado de hipercalcemia em 52 (52%) das cadelas portadoras de neoplasia maligna de mama, no grupo pré-tratamento, quando a avaliação foi realizada por meio da dosagem sérica de cálcio ionizado (CAI), ou seja, nestes animais, a dosagem sérica de cálcio ionizado estava acima de 1,45 nmol/L. Em contrapartida, em apenas 4 animais (4%), a dosagem sérica de cálcio total (CAT) estava aumentada, demonstrando a importância de utilizar a dosagem de cálcio ionizado, e não cálcio total, para detecção de estados de hipercalcemia. No grupo pós-tratamento, esse evento também foi constatado. Além disso, para CAI houve efeito quadrático do estadiamento ($p=0,026$), mostrando que do estadiamento I para o II o nível de CAI diminuiu e depois esses níveis tiveram acréscimo até o nível V. Esses resultados demonstram que mesmo quando os animais apresentaram alterações nos exames bioquímicos ou com o aumento da gravidade do estadiamento, CAT não sofreu modificações importantes. Ou seja, foi observado aumento nos níveis do CAI à medida em que o estágio clínico da doença estava mais avançado, principalmente no estágio III.

Assim como estágios avançados das neoplasias mamárias estão correlacionados ao pior prognóstico, poderíamos sugerir que os níveis séricos de cálcio ionizado, também possam ser incluídos como um fator relacionado a piores prognósticos para pacientes com neoplasia maligna de mama. Neste estudo foram observadas 39% das cadelas em estadiamento clínico III (LANA, 2007; CASSALI, 2014). Neste estágio da doença, os tumores apresentam um tamanho maior que 5 cm em seu diâmetro máximo, porém sem evidência de migração para linfonodos ou metástase distante. No presente estudo, 67% das cadelas estavam entre estadiamento clínico III e V, estágios da doença onde os níveis de cálcio ionizado estavam significativamente mais elevados ($p < 0,05$).

A hipercalcemia maligna em animais portadores de neoplasias têm sido frequente tema de estudo em cães portadores de carcinomas de sacos anais e linfoma, relacionada principalmente à produção de um peptídeo semelhante ao paratormônio (JARK et al., 2011; SILVA, 2012). Nas neoplasias mamárias de cadelas, a ocorrência de hipercalcemia é referida com frequência, porém a sua prevalência e mecanismos são pouco elucidados. Um estudo que incluiu a pesquisa de níveis de cálcio sérico em 20 cadelas portadores de tumores de mama, por meio de dosagem de cálcio total e cálcio ionizado, detectou a presença da alteração em apenas dois animais que apresentavam neoplasias malignas, mas que foram posteriormente diagnosticadas com hiperparatireoidismo primário, concluindo que a hipercalcemia relacionada ao câncer de mama nas cadelas é de baixa ocorrência, sugerindo porém, a realização de estudos com um número maior de animais (RIBEIRO, 2010). Em outro estudo, onde pesquisou-se a ocorrência de hipercalcemia por meio da dosagem de cálcio total em 51 cadelas portadoras de tumores malignos de mama, a condição foi confirmada em 35% dos animais estudados (RAPOSO-FERREIRA et al., 2016), discordando deste estudo, pois quando a dosagem de cálcio total foi utilizada, apenas 4% dos animais apresentaram hipercalcemia. No presente estudo, verificou-se a presença de hipercalcemia em mais da metade do grupo de animais estudados (52%), quando o método utilizado foi a dosagem de cálcio ionizado.

No estudo realizado por Schenk e Chew (2005) quando a concentração de cálcio total foi utilizada para prever a fração ionizada, a discordância chegou a 27%. Segundo Barber (2013) apenas a determinação direta da concentração de cálcio ionizado deve ser considerada, e não a sua previsão através de fórmulas de correção. No presente estudo, verificou-se a presença de hipercalcemia em apenas 4% dos animais portadores de neoplasia maligna de mama quando a

concentração de cálcio foi obtida por meio da dosagem sérica de cálcio total, contra 52% quando o método utilizado foi a dosagem de cálcio ionizado, mostrando discordância de 48%.

A hipercalcemia maligna pode ocorrer devido a mecanismos diferentes em pacientes humanos portadores de neoplasia, por osteólise em neoplasias ósseas primárias ou metastáticas, por hiperparatireoidismo ectópico, pela secreção do peptídeo relacionado ao paratormônio (PTHrP) ou pela produção de 1,25 (OH) 2 D pelo tumor (FARIAS, 2005). No presente estudo, foram verificadas as concentrações de creatinina, que poderia correlacionar a presença de hipercalcemia em pacientes apresentando a condição não relacionada à malignidade, mas devido a alteração de função renal, presente em oito animais do grupo pré-tratamento e seis do grupo pós-tratamento, levando-se em consideração a possibilidade de ocorrência de hipercalcemia em quadros de insuficiência renal crônica ou, ainda, o quadro de hipercalcemia crônico como fator desencadeante de insuficiência renal (COUTO, 2009). Porém, associações entre níveis aumentados de cálcio e creatinina não foram observadas. Dosagens aumentadas de FA também poderiam estar relacionadas à atividade osteoclástica quando da presença de metástase óssea, o que não foi confirmado. Estudos que verifiquem a frequência de ocorrência de hipercalcemia como síndrome paraneoplásica em animais, bem como os seus mecanismos, devem ser realizados, pois a condição está relacionada a um pior prognóstico em humanos e, além disso, a hipercalcemia pode ser considerada como um fator agravante de condições mórbidas, pois pode levar a alterações renais, cardiovasculares, gastrointestinais e neurológicas (DE MORAES; BIONDO, 2012).

Devido à observação dos resultados obtidos neste estudo pode se inferir que as cadelas portadoras de neoplasia maligna de mama apresentam hipercalcemia maligna e que a condição pode estar relacionada aos estágios mais avançados da doença, sugerindo a realização de novos estudos que busquem definir os mecanismos relacionados a ocorrência de hipercalcemia.

REFERÊNCIAS

- BARBER, P. Disorders of Calcium Homeostasis. In: *Small Animals Practice*. v. 23: 262–269, 2013.
- BARTLETT, M. S. Tests of significance in factor analysis. *British Journal of Mathematical and Statistical Psychology*, v. 3, n. 2, p. 77-85, 1950.
- BERGMAN, P.J. Paraneoplastic syndromes. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. *Small Animal Clinical Oncology*. 4^a. Ed. Sant Louis: Saunders Elsevier. p. 77-94, 2007.
- BERGMAN, P.J. Paraneoplastics syndromes. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. *Small Animal Clinical Oncology*. 5.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, cap.5, p.83-97, 2013.
- CASSALI, G.D.; LAVALLE, G.E.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A.B.; GHEVER, C.; SOBRAL, R.; AMORIM, R.L.; OLIVEIRA, L.O.; SUEIRO, F. A.; BESERRA, H.E.O.; BERTAGNOLLI, A.C.; GAMBA, C.O.; DAMASCENO, K.A.; CAMPOS, C.B.; ARAUJO, M.R.; CAMPOS, L.C.; MONTEIRO, L.N.; NUNES, F.C.; HORTA, R.S.; REIS, D.C.; LUVIZOTTO, M.C.R.; MAGALHÃES, G.M.; RAPOSO, J.B.; FERREIRA, A.M.R.; TANAKA, N.M.; GRANDI, F.; UBUKATA, R.; BATSCHINSKI, K.; TERRA, E.M.; SALVADOR, R.C.L.; JARK, P.C.; DELECRODI, J.E.R.; NASCIMENTO, N.A.; SILVA, D.N.; SILVA, L.P.; FERREIRA, K.C.R.S.; FRESHE, M.S.; DI SANTIS, G.W.; SILVA, E.O.; GUIM, T.N.; KERR, B.; CINTRA, P.P.; SILVA, F.B.F.; LEITE, J.S.; MELLO, M.F.V.; FERREIRA, M.L.G.; FUKUMASU, H.; SLAGADO, B.S.; TORRES, R. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v.7, n.2, p. 38 – 69, 2014.
- COUTO, C. G.; *Medicina interna de pequenos animais*. 4^o ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 869-872, 2009.
- DE MORAIS, H.A.; BIONDO, A.W.; Electrolyte Disorders. In: DIBARTOLA, S.P. *Fluid, Electrolyte and Acid-Base Disorders in Small Animal Practice*. 4.ed. Elsevier: Saunders, p.80-91, 2012.
- DE NARDI, A. B. et al. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. *Archives of Veterinary Science*, v. 7, n. 2, 2002.
- DUDA, N.C.B. Anormalidades hematológicas, bioquímicas e hemostáticas de origem paraneoplásica em fêmeas caninas com neoplasia mamária. *Dissertação (Mestrado)*.

- Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. p. 56, 2014.
- FARIAS, M.L.F. A hipercalcemia nas malignidades: aspectos clínicos, diagnósticos e terapêuticos. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*. v. 49, n. 5, p. 816-824, 2005.
- GOLDSCHMIDT, M. et al. Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology Online*, v. 48, n. 1, p. 117-131, 2011.
- ITOH, T.; UCHIDA, K.; ISHIKAWA, K.; KUSHIMA, K.; KUSHIMA, E.; TAMADA, H.; MORITAKE, T.; NAKAO, H.; SHII, H. Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: Differences between small-breed dogs and others. *Journal of Veterinary Medicine and Science*. v. 67, n. 3, p. 345-347, 2005.
- JAIN, C.N. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea e Febiger, 417 p., 1993.
- JARK, P.C.; MONTEIRO, L.N.; GRANDI, F. ROCHA, N.S.; LOURENÇO, M.L.G.; MACHADO, L.H.A. Hipercalcemia maligna secundária a carcinoma do saco anal em um cão: a importância da identificação das síndromes paraneoplásicas. *Veterinária e Zootecnia*. v. 18, n. 4, p. 558-562, 2011.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Ed.). *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic press, 2008.
- KHOSLA, S. Minireview: The OPG / RANKL / RANK system. *Endocrinology*. v.142, p. 5050-5, 2001.
- LANA, S.E.; RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J; VAIL, D.M. *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 4a. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, p.619-636, 2007.
- MARTINS, A.M.C.R.P.; TAMASO, E.; GUERRA, J.L. Retrospective review and systematic study of mammary tumors in dogs and characteristics of the extracellular matrix. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 39, n. 1, p. 38-42, 2002.
- MISDORP W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN D.J. *Tumors in domestic animals*, 4th ed. Ames: Iowa State Press, p. 575–606, 2002.
- OLIVEIRA FILHO, J. C.; KOMMERS, G. D.; MASUDA, E. K.; MARQUES, B. M.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30, n. 2, p. 177-185, 2010.
- OLIVEIRA, L.O.; OLIVEIRA, R.T.; LORETTI, A.P.; RODRIGUES, R.; DRIEMEIER, D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta Scientiae Veterinariae*. v. 31, n.2, p. 105-110, 2003.

- QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.97, p.119-127, 2002.
- RAPOSO-FERREIRA, T. M. M.; VARALLO, G. R.; CALAZANS, S. G.; JARK, P. C.; SALVADOR, R. D. C. L.; TINUCCI-COSTA, M.; LAUFER-AMORIM, R. Paraneoplastic hypercalcemia secondary to canine mammary tumors. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 44, p. 01-07, 2016.
- RIBEIRO, R. C. Hipercalcemia maligna em diferentes tipos de neoplasia mamária canina. 2010. 49 f. *Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)* - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.
- RUTTEMAN, G. R.; KIRPENSTEIJN, J. Tumours of the mammary glands. In: J. M. DOBSON; B. D. X. LASCELLES, BSAVA. *Manual of Canine and Feline Oncology*, 2nd ed., Gloucester: British Small Animal Veterinary Association, p. 234-242, 2003.
- SCHENCK, P.A.; CHEW, D.J. Prediction of Serum Ionized Calcium Concentration by Use of Serum Total Calcium Concentration in Dogs. *American Journal of Veterinary Research*. v. 66, p. 1330–1336, 2005.
- SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, v. 52, n. 3-4, p. 591-611, 1965.
- SILVA, M. O. D. D. Ocorrência de síndromes paraneoplásicas em cães com linfoma. *Salão de Iniciação Científica*, UFRGS, Porto Alegre, RS, 2012.
- SORENMO, K.U.; WORLEY, D.R.; GOLDSCHIMIDT, M.H. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M.; PAGE, R.L. *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 5a. ed.. St. Louis: Saunders Elsevier. p. 538-556. 2013.
- WINTROBE, M. M. *Clinical Hematology (7th edn.)* Lea and Febiger. Philadelphia 1976 pp1000, v. 1001, 1974.
- ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Fisiopatologia da neoplasia mamária em cadelas: revisão. *Clínica Veterinária*, São Paulo, v. 32, p. 50-54, 2001.

6 CONCLUSÃO

1. As cadelas com neoplasias mamárias, estudadas nesta pesquisa, estão em estresse oxidativo, devido aos níveis elevados de MDA quando comparadas as cadelas saudáveis do grupo controle, sendo esta condição mais exacerbada nos animais portadores de neoplasias malignas de mama.
2. As cadelas com neoplasia maligna de mama apresentaram anemia associada a condição de estresse oxidativo,
3. As cadelas portadoras de neoplasia mamária maligna apresentam hipercalcemia maligna.
4. O estado de hipercalcemia deve ser verificado por meio da mensuração de cálcio ionizado e não por meio da dosagem de cálcio total.
5. O estado de hiperclacemia está relacionado ao estadiamento clínico mais avançado da doença.

7 CONSIDERAÇÕES

A alta incidência das neoplasias mamárias na espécie canina em países como o Brasil, onde a ovariosalpingohisterectomia precoce ainda não é amplamente realizada, proporciona a existência de um grande número de animais acometidos, favorecendo desta forma, a realização de inúmeras pesquisas que contribuem para uma melhor compreensão de fatores envolvidos, que vão desde o comportamento biológico dos tumores, alterações metabólicas presentes, métodos diagnósticos que proporcionem informações mais abrangentes sobre a doença e utilização de novos protocolos terapêuticos, até a possibilidade de predição de prognósticos mais acurados.

A detecção de alterações causadas pela doença, como as síndromes paraneoplásicas nas cadelas com neoplasia maligna de mama, não são ainda muito bem estabelecidas com relação a frequência de ocorrência e mecanismos envolvidos, mas são, certamente acontecimentos importantes a se levar em conta na evolução da doença, não apenas com relação ao transtorno local devido a presença de um tumor, mas a toda uma série de alterações metabólicas que devem ser detectadas e tratadas, ou minimizadas, como por exemplo a hipercalcemia verificada em um grande número de animais neste estudo.

Informações sobre a condição de estresse oxidativo em animais portadores de neoplasias malignas vem sendo cada vez mais estudados, não havendo, atualmente, a padronização de testes clínicos mais indicados para cada situação, ou seja, não existe ainda a definição de quais biomarcadores de dano oxidativo seriam mais apropriados, bem como valores de referência, que possam ser utilizados de forma padronizada na espécie canina. O presente estudo demonstrou que, nas cadelas portadoras de neoplasia maligna de mama, a condição de hipercalcemia existe e deve ser verificada, de forma mais eficiente pela dosagem da fração ionizada do cálcio e pode estar relacionada aos estadiamentos mais avançados da doença, bem como demonstrou de forma significativa que, estes animais encontram-se em desequilíbrio oxidativo quando comparados a uma população de animais saudáveis, demonstrando a importância de novos estudos que possam estabelecer valores de referência e definição de quais biomarcadores de dano oxidativo seriam mais eficientes para detecção de tal condição, já que na medicina humana, esta condição, quando presente, está relacionada a maior morbidade e piores prognósticos. Uma vez que as neoplasias mamárias nas cadelas e nas mulheres apresentam grande semelhança sob vários aspectos, é provável que as informações

sobre a presença de estresse oxidativo na espécie humana, brevemente, também poderá ser utilizada na rotina oncológica de animais de companhia.

ANEXOS