



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS

DOUTORADO

**AVALIAÇÃO SÉRICA DA CONCENTRAÇÃO DE ANDROSTENEDIONA E
ESTRONA EM CADELAS COM CARCINOMA MAMÁRIO E INFLUÊNCIA
DE SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE NA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA**

KEIDYLANIA DA COSTA SANTOS

SALVADOR – BAHIA

OUTUBRO/2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

DOUTORADO

**AVALIAÇÃO SÉRICA DA CONCENTRAÇÃO DE ANDROSTENEDIONA E
ESTRONA EM CADELAS COM CARCINOMA MAMÁRIO E INFLUÊNCIA
DE SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE NA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA**

KEIDYLANIA DA COSTA SANTOS

SALVADOR – BAHIA

OUTUBRO/2017

KEIDYLANIA DA COSTA SANTOS

**AVALIAÇÃO SÉRICA DA CONCENTRAÇÃO DE ANDROSTENEDIONA E
ESTRONA EM CADELAS COM CARCINOMA MAMÁRIO E INFLUÊNCIA
DE SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE NA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal dos Trópicos da Universidade Federal da Bahia como pré-requisito para a obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Prof. Dra Alessandra Estrela Lima

Coorientadora: Dra. Karine Damasceno Araújo

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner Portela

SALVADOR- BAHIA

OUTUBRO/2017

Eu sei que a gente se acostuma. Mas não devia. [...] A gente se acostuma para não se ralar na aspereza, para preservar a pele. Se acostuma para evitar feridas, sangramentos, para esquivar-se de faca e baioneta, para poupar o peito. A gente se acostuma para poupar a vida. Que aos poucos se gasta, e que, gasta de tanto acostumar, se perde de si mesma. Eu sei que a gente se acostuma. Mas não devia.

Marina Colasanti

DEDICO

A meu mundo de amor: meus pais, por serem minha raiz. Meus irmãos por serem meu apoio minhas folhas. A Alice por ser minha alegria e leveza, maior riqueza em nossas vidas, o fruto de nossa família. Meus avós, em especial, ao vô Jaime que foi morar com Deus durante o meu doutorado. A Eugenio, meu segundo irmão. A minhas tias e primas, que sempre me acompanharam e torceram por mim. A Altamir, Irani e Dona Dina pelo amor e orações. A todos os meus animais e com especial carinho a Nina (sempre), Bebê, Gatas Pretas e Mané.

AGRADECIMENTO

Eu sem família sou como uma estrada sem rumo! Sou privilegiada por tê-los ao meu lado e tudo que sou ou que tenho devo a eles: meus amores infinitos. Quando busquei compreensão do que era quase incompreensível, encontrei na certeza do amor deles o que eu precisava para seguir adiante. Então, meu primeiro e eterno agradecimento por todos os anos vividos até aqui e aos futuros são para eles.

“Família é um grupo de pessoas, cheios de defeitos, que Deus reúne para que convivam com as diferenças e desenvolvam a tolerância, a benevolência, a caridade, o perdão, o respeito, a gratidão, a paciência, o direito, o dever, limites, enfim, que aprendam a AMAR: fazendo ao outro o que quer que o outro lhe faça. Sem exigir deles a perfeição que ainda não temos. Nós não nascemos onde necessitamos, mas onde necessitamos evoluir. (Papa Francisco)”

Agradeço a Jesus Cristo, pois os ensinamentos bíblicos, sábios e valiosos nortearam os meus passos e por vezes foram luz na minha escuridão.

Agradeço aos residentes, estagiários e técnicos do laboratório de Patologia Veterinária pelos momentos e lições compartilhados. Agradeço às colegas do Projeto Mama pelo ensinamento e ajuda para a conclusão desta pesquisa.

Agradeço aos amigos que fiz ao longo dessa caminhada e fico feliz pela vitória de vocês. Em especial a Ariane Dantas, Adriana Lopes, Cinderela Rodrigues, Estela Brandão, Flávia Araújo, Virgínia Cunha e Viviane Cunha. Aos amigos de sempre que compreenderam a minha ausência e torceram por mim. A Altamir e sua família pelos anos compartilhados.

Agradeço à professora Dr^a. Alessandra Estrela pela orientação. Ao professor Dr. Ricardo Portela que com o jeito tão atencioso me acolheu e sanou minhas dúvidas. Agradeço à Dr^a. Karine Damasceno pela coorientação e a Samantha pelo auxílio essencial. Agradeço ao Emanuel e Prof^a Stefanie pelo auxílio fundamental com a estatística.

Aos guardiões e animais que participaram desta pesquisa. A convivência me trouxe ensinamentos valiosos que vou levar para a minha vida.

À Universidade Federal da Bahia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal dos Trópicos pela oportunidade de cursar o doutorado. À Fapesb pela concessão da bolsa de estudos e aporte financeiro.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Estrutura química do colesterol e hormônios sexuais	12
Figura 2 Fluxograma de desenho experimental desse estudo, e divisão dos animais com carcinoma mamário divididas de acordo com o tipo histológico.....	18
Figura 3 Desenho experimental utilizado neste estudo	20
Figura 4 As medidas morfométricas foram obtidas utilizando fita métrica. Para a estatura, a medida foi desde a articulação atlanto-occipital até a região posterior aos membros posteriores, passando e apoiando a fita sobre a última vértebra sacral. (CC - comprimento da coluna; PA - Perímetro do abdome; PT - Perímetro do tórax; PC - Perímetro da coxa; MP - Comprimento do membro posterior e AC - Altura da cernelha). Adaptado de Burkholder, 2000	24

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Limites para os valores de colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicerídeos em cães	11
Tabela 2	Valores de referência para avaliação da condição corporal canina. Adaptado de Laflamme (1997), Burkholder (2000) e Muller (2008)	23
Tabela 3	Estadiamento clínico (TNM) dos carcinomas mamários da cadela	26
Tabela 4	Critérios utilizados na graduação de tumores mamários de cadela conforme o grau de malignidade	29
Tabela 5	Especificações dos anticorpos utilizados nos ensaios imunohistoquímicos de carcinomas mamários em cadelas	31

LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo 1: Protocolo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	17
Anexo 2: Ficha oncológica específica	21
Anexo 3: Ficha de anamnese dietética.....	21
Anexo 4: ECC de acordo com Laflamme.....	22
Anexo 5: Laudo de análise do ômega 3, Inovet.....	31
Anexo 6: Formulário de autorização de necropsia	60

LISTA DE APÊNDICES

	Página
Apêndice 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	19

LISTA DE ABREVIATURAS

%GC	Porcentagem Gordura Corporal
27 HC	27-Hydroxycholesterol
AL	Ácidos linoléico
AAL	Alfa-linolênico
AC	Altura da cernelha
AG n-3	Ácidos Graxos ômega 3
Akt	Proteína Kinase B
ALT	Alanina aminotransferase
Anti-RE	Anti receptor estrogênio
Anti-RP	Anti receptor de progesterona
APO	Apolipoproteínas
CT	Colesterol Total
Ca	Carcinoma
CC	Comprimento da coluna
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CID	Coagulação Intravascular Disseminada
CIM	Carcinoma Inflamatório Mamário
Cm	Centímetro
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CP	Circunferência pélvica
CPT-11	camptotecina-11 ou Irinotecano
CR	Circunferência longitude membro posterior direito
CTM	Carcinoma em Tumor Misto
DAB	Diamino benzidina
DHA	Ácido Docosahexaenoico
dL	Decilitro
ECC	Escore de Condição Corporal
EGFR	Endothelial Growth Fator Receptor
EPA	Ácido Eicosapentaenóico
EUA	Estados Unidos da América

FA	Fosfatase alcalina
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
FTO	Fat mass and obesity-associated protein
G	Gramma
HDL	High-Density Lipoprotein
HE	Hematoxilina Eosina
HOSPMEV	Hospital de Medicina Veterinária
IDL	Intermediary Density Lipoprotein
IGM	Instituto Gonçalo Muniz - FIOCRUZ
IMCc	Índice De Massa Corporal Canina
Kg	Quilograma
LACEI	Laboratório de Chagas Experimental, Autoimunidade e Imunologia Celular
LAPEX	Laboratório de Patologia Experimental
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Low-Density Lipoprotein
LH	Hormônio Luteinizante
LLD	Látero-Lateral Direita
LLV	Látero-Lateral Esquerda
Lp(a)	Lipoproteína A
LPV	Laboratório de Patologia Veterinária
M	Metro
MC4 R	Melanocortin 4 receptor
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MIP-1 α	Macrophage Inflammatory Proteins
mL	Mililitro
MM	Medição Morfométrica
MP	Membro pélvico
NF κ B	Fator nuclear <i>kappa B</i>
OH	Ovariohisterectomia
OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>P</i>	Valor de p estatístico
PA	Perímetro do abdome

PC	Perímetro da coxa
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPARG	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PT	Perímetro do tórax
RE	Receptor Para Estrógeno
RP	Receptor para Progesterona
SRD	Sem raça definida
TG	Triglicérides
TNF α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TNM	Tumor Nodes Metastasis
U/L	Unidade por litro
UFBA	Universidade Federal da Bahia
VD	Ventro-Dorsal
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
Mm	Micrômetro

RESUMO

Nas últimas décadas uma maior relevância tem sido dada as habilidades do tecido adiposo desde que foi atribuída a ele a função endócrina, sugerindo que provavelmente trate de um componente do metabolismo hormonal no organismo, mais um fator que se soma para relacionar a obesidade ao câncer. Em adição estudos demonstraram que elementos relacionados à obesidade, como exemplo de excesso de colesterol, induzem angiogênese e aceleram o desenvolvimento e o crescimento *in vivo* de tumores mamários. Neste contexto objetivou-se avaliar a existência da conversão de androstenediona em estrona no tecido adiposo de cadelas portadoras de carcinoma mamário e traçar o perfil lipídico e metabólico das fêmeas com neofomações mamárias e comparar os resultados com a condição corporal, malignidade, obesidade e status reprodutivo, além de estudar o efeito da suplementação de omega-3 como um tratamento complementar em cadelas com carcinoma mamário. A amostragem de sangue periférico pré e pós-mastectomia foi colhida para avaliação de androstenediona/estrona (Kits ELISA de competição) e perfil lipídico - colesterol total, HDL-colesterol, VLDL, LDL e triglicédeos, bem como lactato, cálcio, glicose, albumina, proteína total e globulina (Kits bioquímicos). Após 15 dias da cirurgia, 7 fêmeas foram selecionadas para suplementação com ômega 3 a 90%, seguido de ômega 3 a 60% durante 30 dias. O perfil lipídico e metabólico foi avaliado no início, meio (30º dia) e final (60º dia) do período de suplementação, comparando os resultados com a condição corporal, obesidade, status reprodutivo, além de avaliar a expressão dos receptores para estrógeno, progesterona e aromatase P 450 por meio de imunohistoquímica em cadelas com carcinoma mamário. Com isso foi observado que houve maior envolvimento de cães da raça poodle 26,09% (12/46). As fêmeas apresentaram predominantemente escore corporal 4 (45,65%), índice de massa corporal acima do valor de referência (45,65%) e 39,13% das fêmeas apresentaram porcentagem de gordura corporal dentro do padrão. Houve diferença significativa nos valores médios dos níveis de triglicédeos ($p = 0,0363$) e VLDL ($p = 0,0181$). A concentração de albumina e lactato foi maior em cães fêmeas com tipo histológico mais agressivo (CTM pré = 2.685; pós = 2.53, pré-Ca = 2.85; pós = 2,75). Não houve alteração no perfil lipídico após suplementação com óleo de peixe em qualquer concentração. No entanto, observou-se alterações na glicose ($p = 0,0067$), proteína total ($p = 0,0002$) e globulina ($p = 0,0002$) quando o óleo de peixe com 90% de omega-3 foi utilizado como suplementação. Não houve diferença estatística na concentração de androstenediona no que tange o tipo histológico, mas houve diferença com relação a porcentagem de gordura corporal. A avaliação da aromatase P450 indicou maior expressão dessa enzima no tecido adiposo, sugerindo aromatização da androstenediona, com produção de estrógeno no tecido adiposo. Com relação aos receptores, observou-se maior expressão de receptores para progesterona em tecido adiposo peritumoral. Assim é possível afirmar que há aromatização da androstenediona em cadelas com excesso de tecido adiposo, sendo um possível fator envolvido na carcinogênese mamária e as cadelas obesas apresentam perfil lipídico alterado e tumores mais agressivos (Ca), sugerindo uma relação entre agressividade tumoral e perfil lipídico e metabólico.

ABSTRACT

In the last decades a greater relevance has been given as adipose tissue abilities since it has been attributed to an endocrine function, suggesting that it is efficient to be a component of the hormonal metabolism in the body, plus a factor that is added to relate an obesity to cancer. In addition Studies have shown that elements obesity-related, as example of excess of cholesterol, induce angiogenesis and accelerate the development and the *in vivo* growth of mammary tumors. In This context the objective was to evaluate the conversion of androstenedione to estrone on adiposity tissue of female dogs with mammary carcinoma and to trace the lipid and metabolic profile of female dogs with mammary and compare the results with body condition, malignancy, obesity and reproductive status, besides studying the effect of omega-3 supplementation as a supporting treatment in female dogs with mammary carcinoma

Pre- and post-mastectomy peripheral blood sampling was performed to evaluate the concentration of androstenedione and estrone using ELISA kit and lipidic profile - total cholesterol, HDL-cholesterol, VLDL, LDL and triglycerides, as well as lactate, calcium, glucose, albumin, total protein and globulin of female canine (n=46). After 15 days of the surgery, 7 female dogs were selected to supplementation with omega 3 at 90%, followed by omega 3 at 60% for 30 days. The lipid and metabolic profile was evaluated at the beginning, middle (30th day) and end (60th day) of the supplementation period and compare results with body condition, obesity, reproductive status, besides evaluate the expression of estrogen, progesterone and P 450 aromatase receptors in female dogs with mammary carcinoma. It was observed that there was greater involvement of Poodle dogs 26.09% (12/46). The female dogs presented predominantly score 4 (45.65%), body mass index above the reference value (45.65%) and 39.13% of female dogs presented body fat percentage within the standard. There was a significant difference in the mean values of triglyceride levels ($p = 0.0363$) and VLDL ($p = 0.0181$). The concentration of albumin and lactate were higher in female dogs with a more aggressive histological type (CTM pre = 2.685; post = 2.53, pre-Ca = 2.85; post = 2.75). There was no change in the lipidic profile after supplementation with fish oil at any concentration. However, it was observed changes in glucose ($p = 0.0067$), total protein ($p = 0.0002$) and globulin ($p = 0.0002$) when fish oil with 90% of omega-3 was used as supplementation. It was observed that there was no statistical difference in the concentration of androstenedione in relation to the histological type, however there was difference in the percentage of body fat. The evaluation of the P450 aromatase shows greater expression of the enzyme in the adipose tissue, suggesting androstenedione aromatization, with production of estrogen in the adipose tissue. It was observed a greater expression of progesterone receptors in peritumoral adipose tissue, in this way, it is possible to say that there is aromatization of androstenedione in female dogs with adipose tissue excess, being a possible factor involved in mammary carcinogenesis Obese female dogs present altered lipidic profile and more aggressive tumors (Ca), suggesting a relationship between tumor aggressiveness and lipidic and metabolic profile.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Aspectos Gerais das neoplasias mamárias de cadelas.....	3
	Epidemiologia e etiologia das neoplasias mamárias canina	3
	Características clínicas e diagnóstico das neoplasias mamárias canina.....	4
	Tratamento das neoplasias mamárias canina	5
2.2	Tecido adiposo e obesidade	6
	Constituição do tecido adiposo e função.....	6
	Obesidade canina	7
	Obesidade e câncer	9
2.3	Hiperlipidemia e carcinogênese	10
	Definição de lipídios	10
	Ômega 3	14
3.	HIPÓTESES	17
4.	OBJETIVO	18
4.1	Objetivo geral.....	18
4.2	Objetivo específico	18
5.	MATERIAL E MÉTODOS	19
5.1	Aspectos Éticos e financiamento	19
5.2	Infra-estrutura e equipe de trabalho	19
5.3	Desenho experimental.....	19
5.4	Seleção dos animais	23
	Critérios de exclusão.....	23
5.5	Avaliação clínica de cadelas com carcinoma mamário.....	23
	Exame de patologia clínica e imagem.....	23
	Determinação antropométrica.....	24
	Obtenção do sangue periférico.....	27
	Avaliação do perfil lipídico sérico	27
	Avaliação do perfil metabólico	27
	Estadiamento clínico	27
5.6	Cirurgia	28
5.7	Caracterização histopatológica da neoplasia.....	29
	Biópsia excisional e Exame histopatológico.....	29
	Classificação Histológica.....	29

Graduação histopatológica.....	29
5.6 Avaliação da concentração de androstenediona e estrona sérica	32
Estrona e Androstenediona	32
5.9 Imuno-histoquímica (Expressão dos Receptores Hormonais e Aromatase)	32
5.10 Suplementação com óleo de peixe (ômega 3).....	33
5.11 Acompanhamento e sobrevida	33
5.12 Análise estatística.....	34
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
ESCOPO	37
ARTIGO 1	Erro! Indicador não definido.

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias são frequentes em cadelas e 50% das neoformações apresentam características malignas no momento do diagnóstico (DALECK et al., 1998). Cerca de 32% das cadelas com tumores mamários maiores que cinco centímetros morrem um ano após a mastectomia (ESTRELA-LIMA et al., 2010). Por meio destes dados é possível perceber a alta incidência de casos e compreender que a oncologia veterinária precisa avançar em pesquisa, diagnóstico e tratamento.

A etiologia do câncer de mama envolve participação de fatores genéticos, ambientais e principalmente hormonais (SILVA et al., 2004). A maior concentração de hormônios sexuais no tecido adiposo de mulheres tem sido associada à carcinogênese mamária, visto que no tecido subcutâneo de mulheres obesas após a menopausa ocorre a conversão da androstenediona em estrona e o excesso de tecido adiposo acentua esse processo, a partir do aumento da transcrição da aromatase P450 (CLELAND et al., 1985).

Além da produção hormonal a partir do tecido adiposo, as dislipidemias também são associadas ao surgimento e progressão de nódulos mamários em mulheres (ALIKHANI et al., 2013; GONG et al., 2014; JEON, 2015; KIMBUNG et al., 2016). Uma forma de controlar a hiperlipidemia em humanos consiste na suplementação com ácidos graxos poliinsaturados (BORGES, 2013; SELTING et al., 2014). Além dos efeitos sobre as dislipidemias, de acordo com pesquisas *in vitro*, o ômega 3 é capaz de inibir a carcinogênese ao retardar o crescimento de células tumorais de mama, útero, bexiga, neuroblastoma, glioblastoma, além de aumentar a eficácia de diferentes drogas quimioterápicas, tais como doxorrubicina, epirrubicina, paclitaxel, 5-fluorouracil, mitomicina C e trióxido de arsênio (BIONDO et al., 2008; CARMO; CORREIA, 2009).

Deste modo, baseando-se em pesquisas realizadas em mulheres e considerando as semelhanças com a espécie canina no que concerne a neoplasia mamária, surgem os questionamentos se cadelas obesas com carcinoma mamário possuem maior concentração de estrona sérica, decorrente da aromatização da androstenediona no tecido adiposo peritumoral. E também se existe alteração na concentração de colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicerídeos em cadelas com carcinoma mamário, com as dislipidemias estão relacionadas a maior agressividade de neoplasias mamárias em cadelas.

Frente a estes questionamentos, objetivou-se com a realização deste estudo avaliar a influência do tecido adiposo na carcinogênese de cadelas com carcinoma mamário, bem como verificar o efeito da suplementação pós-cirúrgica com óleo de peixe (ômega 3) sobre o perfil lipídico, metabólico e taxa de sobrevida.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos Gerais das neoplasias mamárias de cadelas

Epidemiologia e etiologia das neoplasias mamárias canina

As neoplasias mamárias correspondem a 52% de todos casos de neoplasias que afetam as fêmeas da espécie canina e 50% das pacientes no momento do diagnóstico apresentam lesões multicêntricas devido à rápida progressão tumoral e/ou adiamento na apresentação dos animais à avaliação clínica do médico veterinário (SILVA et al., 2004). Os tumores mamários acometem cadelas de meia idade a idosas, castradas ou inteiras e não há predisposição racial (CASSALI et al., 2014). Relatos recentes constataram um maior envolvimento de cães da raça Poodle (34,2%), seguidos por cães sem raça definida (SRD) (28,6%), provavelmente pelo fato desses animais representarem a maior parcela da população canina (CASSALI et al., 2014; TORÍBIO et al., 2012).

A etiologia dos tumores mamários da cadela é multifatorial, com participação de fatores genéticos, ambientais e hormonais (SILVA et al., 2004). A administração de progestágenos, a exemplo do acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol e acetato de clormadinona pode aumentar o risco de desenvolvimento de tumor mamário em cadelas (MORRIS; DOBSON, 2001). Hormônios, tais como o estrógeno, prolactina (DENG; BRODIE, 2001), andrógenos (KODAMA; KODAMA, 1970) e tireoidianos também estão envolvidos na carcinogênese mamária (NOGUEIRA; BRENTANI, 1996).

Até o momento, sabe-se que cadelas castradas apresentam uma incidência de tumores mamários três a sete vezes menor do que os animais não castrados (MULLIGAN, 1975; PRIESTER, 1979; HAHN et al., 1992). Schneider (1969) constatou que, quando a castração é realizada antes do primeiro estro, reduz-se em 99,95% o risco de desenvolvimento da neoplasia mamária e este risco aumenta, caso a cirurgia seja realizada após o primeiro ciclo estral com o efeito protetor da castração reduzido para 92%, e se a castração ocorre após o segundo ciclo estral o efeito protetor da castração cai para 73%. Entretanto, Cassali et al., (2014) indicam a realização da OH após o primeiro estro, para que haja um completo desenvolvimento musculoesquelético, imunológico e endócrino,

reduzindo as possibilidades de problemas decorrentes da privação dos hormônios ovarianos.

Fatores nutricionais também têm sido apontados como promotores da carcinogênese (PEREZ-ALENZA et al., 1998; FELICIANO, 2012). A correlação entre os fatores nutricionais e neoplasias mamárias está diretamente relacionada com a dieta baseada em comida caseira não balanceada e a obesidade (PEREZ-ALENZA et al., 1998). Queiroga e Lopes (2002) sugerem que cadelas obesas com idade inferior a um ano têm maior risco de desenvolvimento de tumores de mama na idade adulta. Em humanos, a obesidade está associada às alterações hormonais, visto que mulheres obesas após a menopausa apresentam elevadas concentrações de estrógeno sérico proveniente da transformação, no tecido adiposo, da androstenediona em estrona e, posteriormente, em estrógeno, hormônio envolvido na carcinogênese mamária (CLEVELAND et al., 1985; YOO et al., 2001; SILVA et al., 2004).

Características clínicas e diagnóstico das neoplasias mamárias canina

Do ponto de vista clínico, os tumores mamários apresentam-se como nodulações circunscritas, com dimensão, consistência e mobilidade à pele e musculatura variável, podendo estarem associados à ulceração cutânea e reações inflamatórias locais. É comum serem observados múltiplos tumores em uma mesma mama (tumores múltiplos) ou envolvendo simultaneamente diferentes mamas (tumores multicêntricos), os quais podem apresentar diferentes tipos histológicos (CASSALI et al., 2014), e nestes casos a neoformação de pior prognóstico determinará a evolução clínica do paciente (GOLDSCHMIDT et al., 2017).

Cerca de 75% dos tumores mamários caninos envolvem o 4º e o 5º pares de glândulas. Essa maior incidência se deve possivelmente aos maiores estímulos hormonais nessas glândulas e maior quantidade de parênquima mamário (WITHROW, 1975; WITHROW; VAIL, 2007). O exame clínico envolve uma anamnese detalhada, na qual é questionado o tempo de evolução do nódulo mamário, status reprodutivo (castrada ou inteira, cio regular, histórico de pseudociese, aplicação de progestágenos) e idade. Após a anamnese, segue-se o exame físico geral e específico, no qual as duas cadeias mamárias

e linfonodos regionais (forma, tamanho e consistência) são examinados (CASSALI et al., 2014).

O estadiamento clínico da paciente pode ser realizado com base no sistema TNM (Tumor Linfonodo Metástase). Nesse sistema, devem ser avaliados tamanho da lesão primária (T), disseminação para os linfonodos regionais (N) e presença ou ausência de metástases à distância (M) (OWEN, 1980). A distribuição dos animais em estádios auxilia na determinação do prognóstico e permite o planejamento do tratamento e a avaliação dos resultados (QUEIROGA; LOPES, 2002).

A pesquisa de metástases à distância é realizada por meio de radiografia do tórax em três incidências (lâtero-lateral direita - LLD, lâtero-lateral esquerda - LLE e ventrodorsal - VD), na qual podem ser detectadas lesões pulmonares a partir de 6 mm de diâmetro e ultrassonografia do abdômen (SORENMO, 2003). Dentre os sítios mais acometidos por metástases decorrentes das neoplasias mamárias, destacam-se os linfonodos regionais, o pulmão, o fígado e, menos frequentemente, ossos, coração e pele (LANA, et al., 2007; CASSALI et al., 2014; GOLDSCHMIDT et al., 2017).

O exame histopatológico é a forma definitiva para diagnóstico de neoformações mamárias, visto que por meio dele é possível saber informações acerca da natureza, tipo histológico e infiltração microscópica das células tumorais (CASSALI, 2000; CAVALCANTI, 2006). A fim de permitir uma padronização, aconselha-se o uso da classificação histopatológica proposta pela Organização Mundial de Saúde (MISDORP et al., 1999). Dentre os tumores mamários malignos, os mais frequentes são os carcinomas (BRODEY et al., 1983; PELETEIRO, 1994), sendo o carcinoma em tumor misto (CTM) o subtipo predominante (CASSALI, 2000; CAVALCANTI, 2006; DAMASCENO, 2009; RIBEIRO et al., 2009). Por meio da avaliação microscópica das neoformações a graduação histológica é avaliada, sendo considerados como critérios o índice de formação tubular, o pleomorfismo nuclear e a contagem mitótica.

Tratamento das neoplasias mamárias canina

De acordo com Voorwald et al., (2013) a ovariectomia é um procedimento profilático e terapêutico para o tratamento das neoplasias mamárias, visto que é uma afecção mediada por hormônios gonadais. Todavia, é crescente o debate entre os

pesquisadores a respeito do melhor momento para realizar a castração, promovendo prevenção sem alterações sistêmicas observadas com a castração antes do primeiro cio (MORRIS et al., 1998; ESTRELA-LIMA, 2010; KRISTIANSEN et al., 2016).

A mastectomia realizada com ampla margem de segurança constitui a terapia de eleição para cadelas com neoplasia mamária (RUTTEMAN et al., 2001; MISDORP, 2002; DE NARDI et al., 2002; WITHROW; VAIL, 2007), sendo uma exceção o carcinoma inflamatório (CASSALI et al., 2017). O tipo de cirurgia a ser realizada dependerá do tamanho da lesão, da sua localização e da drenagem linfática. Dentre as técnicas empregadas, destacam-se a lumpectomia (remoção do nódulo mamário), mamectomia (remoção da glândula mamária afetada), mastectomia regional e a mastectomia radical (retirada de toda a cadeia mamária) (MORRIS; DOBSON, 2001).

Dependendo da graduação histopatológica e presença de metástase à distância ou em linfonodos regionais, pode ser necessária a adoção de protocolos coadjuvantes à cirurgia. Nesse contexto, a quimioterapia com carboplatina e/ou doxorubicina tem sido utilizada para o controle de micrometástases em potencial, prevenção de recidivas de tumores sólidos e tratamento paliativo de tumores irresssecáveis (RODIGHERI; DE NARDI, 2013).

A eletroquimioterapia, cujo princípio é baseado na administração do agente antineoplásico após a realização da eletroporação tem sido proposta no controle local para neoplasias sólidas e apresenta efeitos colaterais mínimos, redução no número de pacientes mutilados e ausência de resistência das células neoplásicas ao tratamento (RANGEL et al., 2008). Além das técnicas citadas, diferentes substâncias têm sido associadas aos tratamentos convencionais, a exemplo do ácido graxo ômega 3 (AG n-3), visando o aumento de sobrevida (VARA-MESSLER et al., 2015).

2.2 Tecido adiposo e obesidade

Constituição do tecido adiposo e função

O tecido adiposo pode ser dividido em tecido adiposo branco ou tecido adiposo marrom, constituídos respectivamente por adipócitos brancos e castanhos. Além dos adipócitos, que representam 50% de sua constituição, é também formado por tecido

nervoso, fibras de colágenos, nódulos linfáticos, leucócitos, células mesenquimais multipotentes, células endoteliais, fibroblastos e pré adipócitos (CINTI, 1999).

A função do tecido adiposo está relacionada à sua constituição. O tecido adiposo marrom é responsável por produzir calor, enquanto o tecido adiposo branco é conhecido pela proteção mecânica dos órgãos e armazenamento de reservas energéticas na forma de triacilgliceróis (KITAHARA et al., 2004; ZORAN, 2010). Desde a descoberta do hormônio peptídico, constatou-se a função endócrina do tecido adiposo branco (AHIMA, FLIER, 2000; FONSECA-ALANIZ et al., 2007; WOZNIAK et al., 2009).

Os adipócitos produzem peptídeos, hormônios e citocinas denominadas adipocinas que possuem efeito endócrino, autócrino ou parácrino e são responsáveis por modular a inflamação, influenciar no metabolismo lipídico, glicídico, na coagulação sanguínea, pressão sanguínea, modulação hormonal, homeostase, angiogênese e sistema imune (HAMPER, 2016). Existem mais de 50 adipocinas e as mais conhecidas são interleucinas, fator de necrose tumoral (TNF), resistina e adiponectina (ZORAN, 2010).

Obesidade canina

A obesidade é caracterizada pelo excesso de tecido adiposo capaz de prejudicar as funções fisiológicas do organismo (CARCIOFI et al., 2005). Pesquisas realizadas em diferentes países apontam que a incidência de obesidade na população de animais de companhia situa-se entre 22% e 40% (BRUNETTO, 2011). Nos animais de estimação, a obesidade é influenciada por fatores raciais, etários, sexuais, genéticos, ambientais, nutricionais e endócrinos que desencadeiam um desequilíbrio entre o consumo e o gasto calórico, gerando um balanço energético positivo, acumulado na forma de gordura, ganho de peso e mudanças na composição corporal (CASE et al., 1995; ZORAN, 2010).

As raças mais acometidas pela obesidade, segundo Zoran (2010) são Labrador Retriever, Boxer, Scottish Terrier, Sheepdog Shetland, Basset Hound, Cocker Spaniel e Beagle. A faixa etária de maior prevalência está situada entre 5 e 10 anos (DIEZ; NGUYEN, 2006; LAFLAMME, 2006) e quanto mais idosos ficam, maior é a chance de apresentarem ganho de peso em virtude da diminuição da taxa metabólica basal (BMR) que ocorre com o avanço da idade e consequente substituição da massa magra por massa gorda (DIEZ; NGUYEN, 2006). Outro fator que, associado ao sedentarismo, contribui

para a diminuição da BMR, é a gonadectomia, e por isso se apresenta como um importante fator de risco para o desenvolvimento da obesidade, principalmente em fêmeas, que naturalmente já apresentam menor taxa metabólica basal, comparadas aos machos (DIEZ; NGUYEN, 2006; BURKHOLDER; TOLL, 2000; KIL, SWANSON, 2010).

A obesidade também pode ser produto de uma desordem poligenética, com importante influência ambiental. A influência genética como causa de obesidade pode manifestar-se através de alterações no apetite ou no gasto energético (HAMPER, 2016). Em humanos existem mais de 200 genes que, quando modificados, influenciam na obesidade (SWITONSKI et al., 2013; RANKINEN et al., 2016). Após sequenciamento do genoma canino, foram identificados polimorfismos nos genes do receptor 4 da melanocortina (MC4R), cuja ativação reduz o apetite e leva à perda de peso; gene associado à massa de gordura e à obesidade (FTO), o qual tem papel no controle da ingestão alimentar e na queima calórica e no gene dos receptores ativados por proliferador de peroxissoma do tipo γ (PPAR γ), que regulam a homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e inflamação. Entretanto a influência destas alterações em cães ainda não é conhecida (SWITONSKI et al., 2013).

Fatores relacionados às práticas alimentares adotadas pelos guardiões para os animais de estimação também estão envolvidos na obesidade. Nesse contexto se incluem principalmente a alta densidade energética, número de refeições, quantidade de alimento oferecido por refeição e o fornecimento de sobras de alimentos e petiscos (GERMAN, 2006). Aptekmann (2014) observou, em um estudo realizado no Rio Grande do Sul, que 49% dos cães tem petiscos comerciais diariamente adicionados a dieta.

O vínculo entre os animais de estimação e seus guardiões resultou em uma antropomorfização com reflexo na mudança do padrão alimentar dos cães. Diferente de seus ancestrais, que possuíam uma alimentação baseada em proteína e lipídios advindos da caça, os animais de hoje possuem uma grande quantidade de carboidrato e lipídios, além do acesso facilitado à alimentação (VEIGA, 2007).

Dentre os distúrbios hormonais que devem ser levados em consideração neste quadro, destacam-se o hipotireoidismo e hiperadrenocorticismo (BORGES; NUNES, 1998; MORGANTE, 1999). Existem as doenças que desencadeiam a obesidade e existem as enfermidades que surgem como consequência da obesidade, as chamadas comorbidades, que podem resultar em redução da qualidade de vida e da longevidade do

animal. Tais doenças são consequências físicas do excesso de peso ou da desordem metabólica desencadeada pelos adipócitos (FARCAS; MICHEL, 2016). Em cães, a obesidade predispõe às doenças cardiorrespiratórias (HENEGAR, ZHANG, RAMA, 2014), distúrbios do sistema locomotor (discopatias e ruptura de ligamento cruzado), prejuízos à resposta imunológica, endocrinopatias, afecções reprodutivas, dermatopatias (piodermites e seborréia) e maior incidência de dislipidemias (GERMAN, 2006; LAFLAMME, 2006). A obesidade também aumenta o risco para o desenvolvimento de diferentes neoplasias em humanos, a exemplo de câncer de mama, útero, rim, tireóide e fígado (TEOH; DAS, 2016).

Obesidade e câncer

A obesidade foi associada ao aumento do risco de desenvolver tumores mais agressivos na próstata, que provavelmente estão relacionados a uma baixa concentração de andrógenos (SHI et al., 2013). As evidências que sugerem correlação entre câncer de mama e obesidade ainda não estão completamente compreendidas. De acordo com Djuric (2016) os quatro mecanismos citados para explicar a relação obesidade e câncer de mama são o metabolismo dos hormônios sexuais, desregulação da sinalização da insulina, que leva ao desequilíbrio na proliferação celular, diferenciação e apoptose e expressão alterada de adipocinas.

Furukawa et al., (2004) demonstraram, por meio de estudos em roedores e humanos, que a obesidade proporciona o aumento na produção de radicais livres pelo tecido adiposo, induzindo ao estresse oxidativo e aumento na produção de marcadores pró-inflamatórios, que por sua vez mantêm um estado de inflamação crônica discreta. Tabak (2014) relatou que, para cada 5 kg/m² de aumento do Índice de Massa Corpórea (IMC) se observa um aumento de 12% na incidência de câncer de mama pós menopausa em mulheres. Este aumento na incidência pode estar relacionado a uma maior síntese de estradiol, agente promotor de câncer de mama. Além disso, observa-se uma diminuição do tempo de sobrevivência em mulheres obesas com neoplasias mamárias, independente da expressão de receptores para estrogênio ou fase reprodutiva da mulher.

2.3 Hiperlipidemia e carcinogênese

Definição de lipídios

Os lipídios compõem um grupo químico que tem na insolubilidade em água uma característica comum a todos. As gorduras e os óleos, derivados dos ácidos graxos, são as principais formas de armazenamento de energia. O excesso de combustível metabólico das células e organismos é convertido em ácido graxo e armazenado na forma de triacilgliceróis. Estes são os tipos de lipídios mais simples, compostos por três moléculas de ácido graxo unidas a uma molécula de glicerol. Constituem uma das principais formas de armazenamento energético do organismo, depositados nos tecidos adiposo e muscular (LEHNINGER, 2014).

O colesterol é um derivado lipídico precursor de componentes com atividade biológica variada, dentre elas os ácidos biliares, vitamina D e alguns hormônios, a exemplo da testosterona, estradiol, cortisol e aldosterona. É constituinte das membranas plasmáticas e, portanto, essencial ao organismo animal. Diversos receptores de fatores de crescimento estão localizados na *raft lipídica*, porções da membrana plasmática rica em colesterol. Em humanos, o colesterol é produzido por meio de síntese celular no fígado (colesterol endógeno - 70%) e da dieta (colesterol exógeno - 30%). O excesso de colesterol decorre dos maus hábitos alimentares ao longo da vida e resulta em sérias enfermidades (LEHNINGER, 2014).

O colesterol, por ser um lipídeo, não pode ser transportado na corrente sanguínea de forma isolada. As lipoproteínas, compostas por lipídeos e proteínas, são as principais transportadoras de colesterol e ácidos graxos. Existem quatro classes de lipoproteínas divididas em dois grupos: lipoproteínas ricas em triacilglicerol, mais e menos densas, representadas pelos remanescentes de origem intestinal, e pelas lipoproteínas de densidade muito baixa ou “very low density lipoprotein” (VLDL), de origem hepática. O outro grupo é constituído por lipoproteínas ricas em colesterol de densidade baixa (“low density lipoprotein” - LDL) e de densidade alta ou (“high density lipoprotein” - HDL). Existe ainda um grupo de lipoproteínas de densidade intermediária ou (“intermediary density lipoprotein” - IDL) e a lipoproteína a [Lp(a)], resultante da ligação covalente de uma partícula de LDL à apo (a) (SPOSITO et al., 2007; SICCHIERI, 2012).

Alterações nas lipoproteínas são denominadas dislipidemias ou hiperlipidemias (SPOSITO et al., 2007). A dislipidemia ocorre quando o colesterol total (CT) é elevado, quer pelo valor da LDL ou dos triglicerídeos, quer pelo valor HDL baixo ou ainda por uma combinação das alterações (PEREIRA et al., 2013). Perfis anormais de lipoproteína têm sido associados à progressão do câncer de mama (SCHAIRER et al., 2017). Segundo Kaneko (1997), Meyer, Harvey (2004) e Thrall (2007), os valores de colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicerídeos são classificados conforme a **Tabela 1**.

Tabela 1: Limites para os valores de colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicerídeos em cães

Fração lipídica	Valor de referência (mg/dL)
Colesterol total	135 – 270
HDL	60,0 - 140,0
LDL	34,0 - 115,0
VLDL	até 25,0
Triglicérides	20 – 112

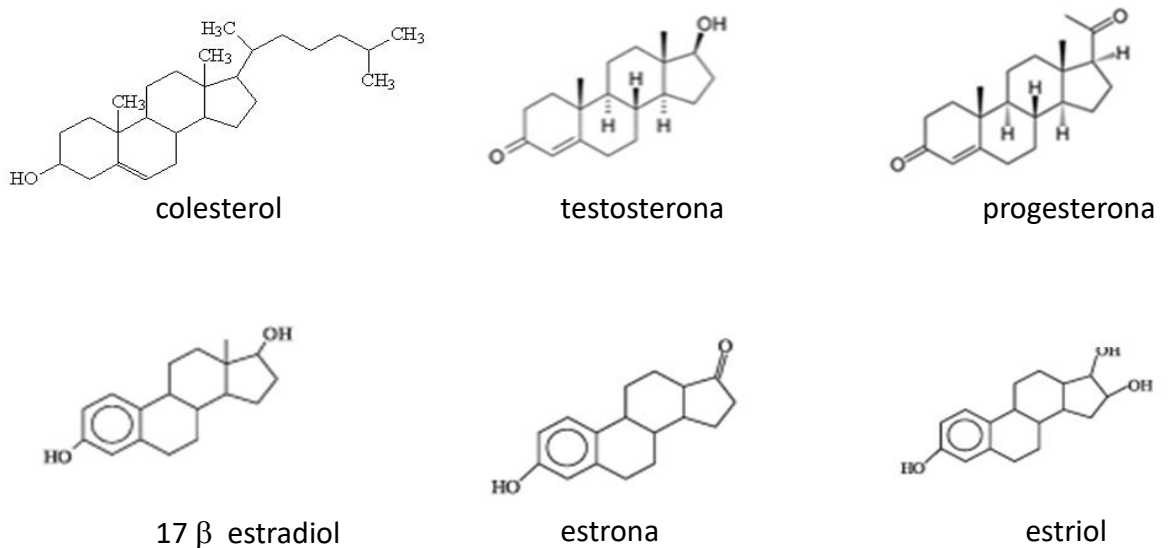
Fonte: Kaneko, 1997; Meyer, Harvey, 2004; Thrall, 2007.

Atualmente, a classe de medicamentos mais indicada para o controle de dislipidemia em humanos é denominada estatina, responsável por regular a concentração de lipoproteínas LDL, HDL e VLDL por meio do controle do colesterol (HEGELE, 2009). O uso de estatina foi associado ao controle do câncer de pâncreas (YU et al., 2017), rim (NAYAN et al., 2017; BERQUIST et al., 2017), próstata (ALFAQIH et al., 2017) e redução dos efeitos após quimioterapia em mulheres com câncer de mama (MICALLEF et al., 2016).

Ao longo de 20 anos de estudo, Roffo (1943) induziu adenocarcinomas estomacais e sarcoma em fígado e peritônio de camundongos, após alimentá-lo com gordura pré-aquecidas ao longo de dois anos. Estabeleceu-se também uma relação entre os níveis de colesterol, a faixa etária e a incidência do câncer, pois a faixa etária com maior nível de colesterol em humanos, entre os 41 e 60 anos de idade, coincidiu com a maior incidência de câncer. Ressaltou-se também a importância da semelhança da estrutura química do

colesterol com os hormônios sexuais (**Figura 1**) e os esteróides, além de explicitar a influência do colesterol em tumores malignos cutâneos, constatando taxas de colesterol sempre maiores nos tecidos neoplásicos.

Figura 1: Estrutura química do colesterol e hormônios sexuais



Fonte: adaptado de Princípios de Bioquímica de Lehninger, 2014.

A incidência de neoplasias mamárias em mulheres é cerca de quatro vezes maior em países ocidentais que em países orientais (GARÓFALLO; PETRILLI, 2006). A maior incidência pode estar relacionada às alterações das lipoproteínas. No entanto, pouco é sabido a respeito do papel dessas lipoproteínas no desenvolvimento do câncer. Em face dessa realidade, muitos estudos e revisões (NELSON et al., 2013; MCDONNELL et al., 2014; GONG et al., 2014; MURAI, 2015; KIMBUNG et al., 2016) têm sido realizados a respeito.

Llaverias (2011) demonstrou que ratos alimentados com uma dieta rica em colesterol desenvolveram tumores de mama mais agressivos e apresentaram taxa significativamente maiores de metástases. Torres et al., (2013) indicaram que nódulos mamários de ratos com hipercolesterolemia apresentaram desenvolvimento mais rápido, menos apoptose e maior atividade angiogênica, quando comparados aos ratos sem

hipercolesterolemia. Os autores concluíram que o excesso de colesterol induz a angiogênese e acelera o desenvolvimento e crescimento de tumores mamários *in vivo*, no entanto o mecanismo envolvido no processo não foi definido.

No mesmo ano, Nelson et al., (2013) afirmaram que a hipercolesterolemia é um fator de risco para o desenvolvimento de tumores de mama positivos para receptor de estrógenos e não responsivo ao tratamento com terapias hormonais. Em busca do mecanismo que medeia tal processo, eles constataram que camundongos tratados com 27-hidroxicolesterol (27 HC), subproduto da síntese do colesterol, apresentaram maior infiltração macrófagica e angiogênese. Além disso, o metabólito acelerou o crescimento do tumor da mama positivo para o receptor de estrogênio *in vivo*.

Outros estudos demonstraram que o colesterol LDL e VLDL são significativamente elevados em mulheres com câncer de mama (RAY; HUSAIN, 2001; KUMAR et al., 2015; WOLFE et al., 2015). Em 2017 Lu et al., afirmaram que, após incubar por 72 horas moléculas de LDL e VLDL a uma cultura de células neoplásicas [MCF-7 (*luminal-like cells*) e MDA-MB-231 (*basal like cells*)], houve aumento da tumorigênese *in vitro* e da concentração de marcadores mesenquimais, como vimentina e β -catenina. O acúmulo de β -catenina citoplasmática livre e/ou sua translocação para o núcleo tem sido associada à progressão tumoral (CONACCI-SORRELL; ZHURINSKY, 2002), enquanto a vimentina tem sido descrita em células epiteliais migratórias envolvidas na invasão tumoral (GILLES et al., 1999).

O VLDL ativa a angiogênese e Akt (um tipo de proteína quinase B envolvida no processo de multiplicação celular, transcrição, migração celular e apoptose), fato que pode justificar o envolvimento da dislipidemia na progressão do câncer de mama. Ainda com relação a associação do VLDL ao câncer, outros estudos demonstraram que o VLDL aumentou a quantidade de proteínas fosforiladas. Proteína quinase B fosforilada tem sido associada ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e demonstra ser importante na resistência ao tratamento por meio de radiação *in vitro* (PREVO et al., 2008; CHOI et al., 2010).

Mesmo diante de tantas evidências da relevância das dislipidemias na medicina veterinária oncológica, são poucas as pesquisas relacionando a obesidade, alterações no perfil lipídico e desenvolvimento do câncer de mama. Deste modo, conhecimentos

adicionais podem contribuir e servir de base para futuros estudos e possíveis alternativas terapêuticas.

Ômega 3

Os fosfolípidios são componentes importantes das membranas e da matriz estrutural de todas as células, modulando a função celular ao agirem como mediadores intracelulares de transdução de sinais ou moduladores de interação entre células. Dentre as funções que os ácidos linoléico (18:2 n-6, AL) e alfa-linolênico (18:3 n-3, AAL) desempenham no organismo, destaca-se a manutenção das membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos. Atuam ainda na transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, síntese da hemoglobina e divisão celular. Dentre os ácidos graxos da família ômega 3, destacam-se o ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA) (CARMO; CORREIA, 2009). São encontrados em algumas sementes, a exemplo da linhaça e alguns peixes de água salgada, como o atum, a sardinha, o salmão e a cavala, que quanto mais ricos em gordura, maior teor de AG n-3 apresentam (HARDMAN, 2004).

Sabe-se que a suplementação da dieta com óleos contendo EPA ou DHA, em ratos ou camundongos portadores de câncer diminuiu o crescimento de tumores do pulmão, do cólon, das mamas e da próstata, além de aumentar a eficácia da quimioterapia com doxorubicina, epirrubicina, 5-fluoruracil, mitomicina C, arabinosilcitosina e tamoxifeno (HARDMAN, 2004). Com relação ao câncer de mama, foi constatado que o ômega 3 induz a diferenciação das células neoplásicas. Ressalta-se que células diferenciadas não se multiplicam e a indução da diferenciação pode parar o crescimento do tumor (CARMO; CORREIA, 2009).

Dentre os mecanismos de ação dos AGs n-3 na carcinogênese, cita-se a diminuição da proliferação celular, estímulo na apoptose e diminuição na disseminação de metástases e angiogênese. A influência do ômega 3 na atividade do fator de transcrição nuclear, na expressão gênica e nas vias de transdução de sinais, levam a mudanças no metabolismo celular, estimulando o crescimento e diferenciação das células e alteração no metabolismo do estrogênio. Com isso, existe um menor estímulo ao crescimento das células hormônio dependentes e diminuição da produção de radicais livres.

Vale ressaltar que uma das funções mais importantes do ômega 3 está relacionada à sua conversão enzimática em eicosanóides, responsáveis por modular a resposta inflamatória, imunológica, além de atuarem na agregação plaquetária e no crescimento e diferenciação celular. A liberação de ácidos graxos poli-insaturados pela ação das fosfolipases estimula a produção de eicosanóides. O ácido graxo liberado serve como substratos para as enzimas cicloxigenases, lipoxigenases e citocromo P450 (HARDMAN, 2004). Cicloxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX) agem nos AGs de 20 carbonos produzindo moléculas de sinalização celular, tais como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. As prostaglandinas da série dois, produzidas a partir do ácido araquidônico, possuem ação pró-inflamatória e proliferativa, ao passo que as prostaglandinas da série três, produzidas a partir do EPA, têm ação inflamatória e proliferativa menor (HARDMAN, 2004).

As neoplasias da glândula mamária são tumores hormônio-dependentes (WITHROW, SUSANECK, 1986; SILVA et al., 2004). Acredita-se que o ômega 3 possa reduzir o crescimento dos tumores de mama a partir da diminuição da estimulação estrogênica nesses tumores, uma vez que inibe a produção de prostaglandina E2. A prostaglandina E2 ativa a aromatase P450 e aumenta a produção de estrogênio (HARDMAN, 2004).

Os eicosanóides gerados pela oxidação do ácido araquidônico (AA), tais como prostaglandina E2, leucotrieno B4, tromboxano A2 e ácido 12-hidroxi-eicosatetraenoico já foram positivamente ligados à carcinogênese. Por exemplo, a prostaglandina E2 promove a sobrevivência das células tumorais e é encontrada em concentrações maiores nas células tumorais do que nas células normais. Se AGs n-3 estão disponíveis, eles serão usados como substrato pela COX-2. Portanto, se os AGs n-3 forem incluídos na dieta e incorporados às membranas celulares, menos prostaglandina E2 será produzida nos tecidos normais e tumorais. Os produtos das COX e LOX derivados do AA estimulam a mitose, enquanto os derivados do EPA diminuem o crescimento do tumor (HARDMAN, 2004).

O ômega 3 também pode influenciar na atividade do fator de transcrição nuclear NFkB. Quando esse fator de transcrição é ativado, a morte celular programada, ou apoptose, é bloqueada. Esse fator nuclear está frequentemente alterado nas células tumorais, resultando em células resistentes às drogas quimioterápicas e à radiação, as

quais não morrem em resposta ao dano genético ocorrido. De modo semelhante, a expressão dos genes da família Bcl-2 e da COX-2 também pode bloquear a apoptose, resultando em células que não sofrem apoptose na hora apropriada. Os AGs n-3 podem restaurar a apoptose fisiológica pela regulação do fator de transcrição nuclear, o qual regula a expressão da COX-2, e pela regulação da expressão dos genes da família Bcl-22 (HARDMAN, 2004).

Os animais que receberam suplementação de ácidos graxos ômega-3 apresentaram baixas concentrações de interleucina pró-inflamatória (interleucina-6) e triglicerídeos. Não apresentaram efeitos adversos. Houve diminuição também na expressão de genes inflamatórios, como MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos-1) e MIP-1alfa (proteína inflamatória derivada de macrófagos-1alfa) no tecido adiposo subcutâneo, maior produção de eicosanóides anti-inflamatórios no tecido adiposo visceral e tecido adiposo subcutâneo e constatou-se que o EPA induziu apoptose celular por ativação da caspase-3, além de diminuir níveis de COX-2 (SHIROTA et al., 2005).

Em adição, mulheres que consumiram ômega 3 ao longo da vida apresentaram remissão total ou parcial de metástase decorrente do câncer de mama em resposta a quimioterapia citotóxica e possuíram maiores níveis de DHA no tecido adiposo da mama. Sabe-se ainda que é possível aumentar a concentração de DHA no parênquima mamário ao consumir AG ao longo de três meses (BOUGNOUX et al., 1999; BAGGA et al., 1997).

3. HIPÓTESES

1. Cadelas obesas com carcinoma mamário possuem maior concentração de estrona sérica, decorrente da aromatização da androstenediona, via enzima aromatase, no tecido adiposo peritumoral;
2. Cadelas obesas portadoras de carcinoma mamário, independentemente do tipo tumoral, possuem maior expressão de receptores para estrógeno e aromatase no tecido adiposo peritumoral;
3. As dislipidemias e alterações na concentração de albumina, proteína total, globulina, cálcio, glicose e lactato estão relacionadas ao status corporal e maior agressividade de neoplasias mamárias em cadelas;
4. Cadelas acima do peso ou obesas, apresentam alteração no perfil lipídico e essa alteração pode contribuir para a progressão e agressividade tumoral ou neoplasias mais agressivas alteram o perfil lipídico das pacientes;
5. A ingestão diária de óleo de peixe com 90% de ômega 3 promove o controle da concentração de colesterol total, HDL, LDL, VLDL, triglicerídeos, albumina, proteína total, globulina, cálcio, glicose e lactato, além de incrementar a taxa de sobrevivência de cadelas com carcinoma mamário.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo geral

Avaliar em cadelas com carcinoma mamário a influência do tecido adiposo, enquanto órgão endócrino, na carcinogênese, bem como, verificar o perfil lipídico e metabólico das cadelas e o efeito da suplementação pós-cirúrgica com óleo de peixe (ômega 3) sobre o perfil lipídico, metabólico e taxa de sobrevivência.

4.2 Objetivo específico

- Determinar as concentrações séricas de androstenediona e estrona, bem como a expressão da enzima aromatase P450 no tecido adiposo peritumoral de cadelas portadoras de carcinomas mamários;
- Avaliar a expressão dos receptores de estrógeno e progesterona no tecido adiposo peritumoral de cadelas portadoras de carcinomas mamários;
- Identificar o perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL, VLDL, triglicerídeos) e metabólico (albumina, proteína total, globulina, cálcio, glicose e lactato) de cadelas com carcinoma mamário antes e após a mastectomia e sua possível associação com a agressividade tumoral;
- Estudar o efeito da suplementação com óleo de peixe com diferentes concentrações de ômega 3 (90% e 60%) sobre o perfil lipídico, metabólico e sobrevivência de cadelas com carcinoma mamário.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Aspectos Éticos e financiamento

Todos os tutores legais foram previamente informados sobre a realização do projeto de pesquisa, mediante assinatura em Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Apêndice 1**). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) com número de protocolo 05/2015 (**Anexo 1**). O projeto obteve financiamento da FAPESB por meio do edital 23/2014, Programa de Apoio a Pesquisas Interdisciplinares – PROINTER.

5.2 Infra-estrutura e equipe de trabalho

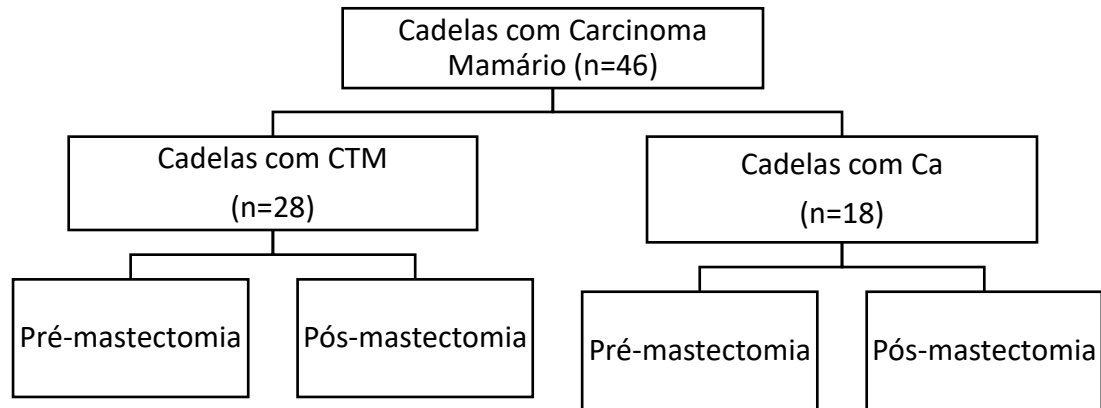
Foi utilizada a infraestrutura do Hospital de Medicina Veterinária Professor Renato Rodenburg de Medeiros Netto (HOSPMEV/UFBA), envolvendo os setores de Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais, Laboratório de Análises Clínicas, Laboratório de Patologia Veterinária. Como unidades parceiras, foram envolvidas nesse trabalho: Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciência da Saúde/UFBA; Laboratório de Patologia Comparada (LPC) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais; Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz - Fundação Oswaldo Cruz (Salvador, Bahia), que disponibilizou o Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX); e o Laboratório de Chagas Experimental, Autoimunidade e Imunologia Celular (LACEI). A pesquisa foi desenvolvida com o apoio do grupo de pesquisa em Patologia Mamária composta por professores, pós-graduandos (mestrandos, doutorandos, residentes e pós doutorandos) e estudantes de graduação.

5.3 Desenho experimental

Os animais foram agrupados de acordo com a classificação histopatológica do tumor mamário em: cadelas com Carcinoma em Tumor Misto (CTM) e cadelas portadoras de outros tipos de carcinomas (Ca) (**Figura 2**). Nos casos de tumores múltiplos

ou multicêntricos, foi considerado o diagnóstico histológico do tumor mais agressivo para compor os grupos.

Figura 2: Fluxograma de desenho experimental desse estudo, e divisão dos animais com carcinoma mamário divididas de acordo com o tipo histológico



Para avaliação do perfil lipídico, metabólico e concentração de androstenediona e estrona foram realizadas colheitas de 4mL de sangue de todos os animais. O sangue colhido foi centrifugado a 3000 rotações por minutos, durante 10 minutos. O soro obtido foi armazenado sob refrigeração. A pesquisa foi realizada conforme ordem descrita pela linha do tempo abaixo descrita e esquematizada na **Figura 3**.

Dia 0: Atendimento clínico, no qual foi realizada a anamnese clínica, exame físico geral e específico das neofomações e realização das medidas morfométricas. Neste momento foram solicitados os exames pré-operatórios, exames de imagem e avaliação cardíaca.

Dia 1: Quarenta e oito horas antes do procedimento cirúrgico. Colheita de sangue para avaliação sérica do perfil lipídico e metabólico pré-operatório.

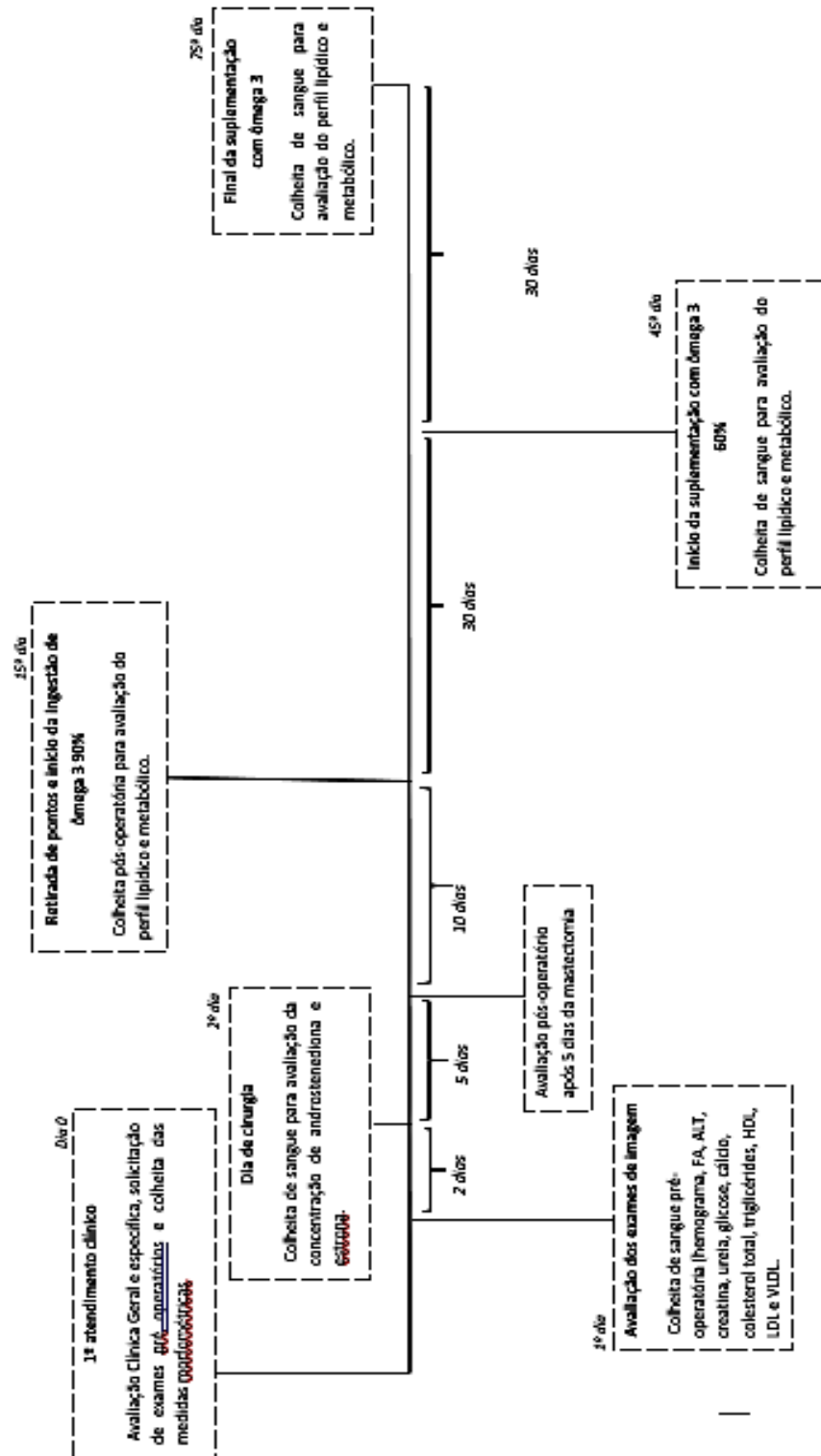
Dia 2: Dia do procedimento cirúrgico. Colheita de sangue para avaliação do perfil sérico de estrona e androstenediona.

Dia 15: Dia da retirada de pontos. Colheita de sangue para avaliação sérica do perfil lipídico e metabólico pós-operatório. Início da ingestão de ômega 3. Os valores de exames pós-operatórios são os mesmos utilizados no momento pré-ômega 3 90%.

Dia 45: Trinta dias após o início da ingestão de ômega 3. Colheita de sangue para avaliação do perfil lipídico e metabólico, visando avaliar o efeito da suplementação com ômega 3 90% após 30 dias de uso. Início de ômega 3 60%.

Dia 75: Sessenta dias após o início da ingestão de ômega 3. Colheita de sangue para avaliação do perfil lipídico e metabólico, visando avaliar o efeito da suplementação com ômega 3 após 60 dias de uso. Em todos os momentos de colheita de sangue os animais se encontravam em jejum de 12 horas.

Figura 3: Desenho experimental utilizado neste estudo



5.4 Seleção dos animais

Foram selecionadas 46 cadelas de diferentes raças com idade variando de 06 a 18 anos e média de 9,7 anos de idade, com diagnóstico de carcinoma mamário, atendidas no Hospital de Medicina Veterinária Professor Renato Rodenburg de Medeiros Netto, no período de abril de 2015 a agosto de 2016. Todos os animais foram acompanhados por um período mínimo de um ano.

Crítérios de exclusão

Nenhum dos animais fez uso prévio (mínimo de trinta dias antes da cirurgia) de fármacos antineoplásicos, suplementação com ômega 3 ou apresentaram histórico de endocrinopatia, sendo estes aspectos critérios de exclusão dos animais na pesquisa.

5.5 Avaliação clínica de cadelas com carcinoma mamário

As cadelas com lesão mamária foram submetidas ao exame físico geral e específico. Os exames consistiram na avaliação da condição clínica geral, coleta de informações sobre o histórico clínico e ciclo reprodutivo (ciclo estral regular, castração, período de desenvolvimento e evolução das lesões, histórico de pseudociese e aplicação de progestágenos), bem como hábitos alimentares (alimenta-se de ração, comida caseira ou petisco com as respectivas frequências e quantidades). Essas informações foram transcritas para uma ficha oncológica específica segundo o protocolo modificado de Ferreira et al., (2003) (**Anexo 2**) e ficha de anamnese dietética (**Anexo 3**), seguindo modelo proposto pelo Manual de Obesidade canina e felina da Nestlé Purina® (JERICÓ et al., 2014).

Exame de patologia clínica e imagem

Com objetivo de avaliar se o animal possuía condição clínica de ser submetido ao tratamento cirúrgico foram realizados hemograma e exames de bioquímica sérica através de kits de bioquímica clínica comerciais [alanina aminotransferase (ALT), fosfatase

alcalina (FA), creatinina, uréia, glicose e cálcio] (LABTEST®), além dos exames de imagem [raio-x simples de tórax em três incidências látero-lateral direita (LLD), látero-lateral esquerda (LLV) e ventro-dorsal (VD)] para pesquisa de metástase pulmonar e ultrassonografia de abdômen total. Também foram realizados eletrocardiograma e ecocardiograma. Após a avaliação do risco cirúrgico, os animais foram encaminhados para a cirurgia.

Determinação antropométrica

Visando agrupar os animais segundo a sua condição corporal em cadelas com peso adequado ou acima do peso, foi realizada a avaliação da condição corporal. A faixa de condição corporal foi baseada em quatro métodos e estes foram comparados entre si:

- a) Escore de Condição Corporal (ECC)
- b) Índice de Massa Corporal Canino (IMCc)
- c) Medição Morfométrica (MM) (**Figura 4**)
- d) Porcentagem de Gordura Corporal (%GC)

O ECC, de acordo como proposto por Laflamme (1997), tem escala de 1 a 9. Sendo assim, os animais com sobrepeso ou obesos são identificados com $ECC \geq 6$, animais com peso normal ($ECC = 4$ ou 5), magros ou $ECC \leq 3$ (**Anexo 4**).

O índice de massa corporal canino (IMCc) seguiu recomendações de Muller et al., (2008):

$$IMCc = \text{peso (kg)} / (\text{estatura em m})^2$$

O IMCc ideal para cães de médio porte compreende valores entre 11,8 e 15 kg/m², conforme determinado por Muller (2008). Para o exame de composição corporal, foi realizada a medição morfométrica proposta por Burkholder (2000) e em seguida a porcentagem de gordura corporal (%GC) que, em animais com peso ideal está entre 16 e 25%. Segundo Burkholder (2000), os valores da medição são inseridos na equação a seguir para determinação da % de gordura corporal:

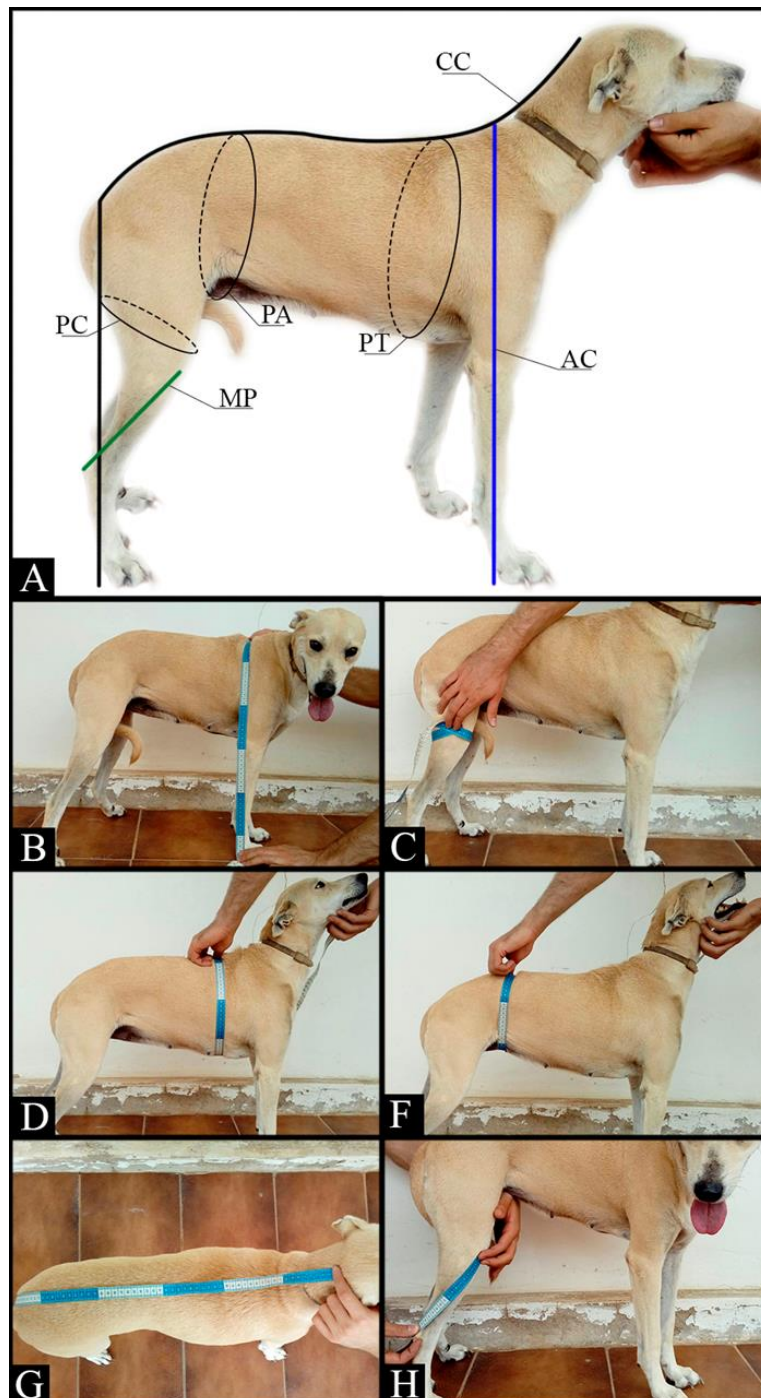
$$\% \text{ GC em cadelas} = - 1,7 (\text{MP cm}) + 0,93 (\text{PA cm}) + 5$$

Na qual % GC significa porcentagem de gordura corporal, MP indica o comprimento do membro posterior direito, mensurado desde a tuberosidade calcânea até a metade do ligamento patelar e PA significa perímetro do abdome (**Tabela 2**).

Tabela 2: Valores de referência para avaliação da condição corporal canina. Adaptado de Laflamme (1997), Burkholder (2000) e Muller (2008)

	ABAIXO DO PESO	PESO IDEAL	ACIMA DO PESO
ECC	<i>1-3</i>	<i>4 e 5</i>	<i>6-9</i>
IMCc	<i>Abaixo de 11,7</i>	<i>11,8 e 15 kg/m²</i>	<i>Acima de 15,1</i>
%GC	<i>Abaixo de 16%</i>	<i>16 a 25%</i>	<i>Acima de 25%</i>

Figura 4: As medidas morfométricas foram obtidas utilizando fita métrica. Para a estatura, a medida foi desde a articulação atlanto-occipital até a região posterior aos membros posteriores, passando e apoiando a fita sobre a última vértebra sacral. (CC - comprimento da coluna; PA - Perímetro do abdome; PT - Perímetro do tórax; PC - Perímetro da coxa; MP - Comprimento do membro posterior e AC - Altura da cernelha). Adaptado de Burkholder, 2000.



Obtenção do sangue periférico

Para a avaliação do perfil lipídico, metabólico e hormonal, o sangue foi colhido em seringas descartáveis estéreis de 5mL por meio da venopunção jugular e transferido para tubos estéreis bioquímicos mantido a temperatura ambiente. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 3000 rotações por minuto por 10 minutos para obtenção do soro, que foi armazenado e refrigerado para posterior processamento.

Avaliação do perfil lipídico sérico

A colheita foi realizada dois dias antes da mastectomia, 15 dias após a mastectomia e 30 e 60 dias da suplementação com óleo de peixe (ômega 3). Foram utilizados kits de bioquímica clínica comerciais para a determinação do colesterol total, triglicérides e colesterol HDL (LABTEST[®]), sendo que todas as colheitas foram realizadas após jejum de 12 horas. Os valores do colesterol VLDL e LDL foram obtidos por meio da Fórmula de Friedwald (1972), sendo os valores expressos em mg/dL (FISCHBACH, 2002; SCHMIDT et al., 2004).

Avaliação do perfil metabólico

Foi considerado para determinação do perfil metabólico a avaliação sérica de glicose, cálcio, albumina, lactato e proteínas totais. A avaliação de patologia clínica foi realizada por meio de kits de bioquímica clínica comerciais, tais como glicose, cálcio, albumina, lactato e proteínas totais (LABTEST[®]). A globulina foi calculada por meio da fórmula: Proteínas totais – albumina = globulinas.

Estadiamento clínico

Foi realizado o estadiamento clínico com base no tamanho do tumor (T), envolvimento neoplásico de linfonodos regionais (N) e presença de metástases à distância (M), de acordo com o sistema TNM para carcinomas de mama em cadelas (CASSALI et al., 2014, modificado de OWEN, 1980) (**Tabela 3**). Os tumores foram mensurados em

pelo menos duas dimensões. Quando o animal apresentou mais de um nódulo, cada um deles foi medido separadamente, sendo considerada para a realização do estadiamento clínico a maior medida do tumor invasivo, conforme critérios adotados pelo sistema TNM. A avaliação macroscópica dos linfonodos inguinais e axilares foi realizada por palpação e a presença ou não de envolvimento neoplásico determinada pelo exame histopatológico, após a exérese cirúrgica da cadeia mamária envolvida.

Tabela 3: Estadiamento clínico (TNM) dos carcinomas mamários da cadela

Tumor Primário (T)	Linfonodos Regionais (N)
T0 Tumor não detectável	N0 Sem evidência de linfonodo regional (axilares ou inguinais)
T1 Tumor < 3 cm a: não fixo b: fixo à Pele c: fixo ao Músculo	N1 Linfonodo Ipsilateral envolvido a: não fixo b: fixo
T2 Tumor de 3 – 5 cm a: não fixo b: fixo à Pele c: fixo ao Músculo	N2 Linfonodos bilaterais envolvidos a: não fixo b: fixo
T3 Tumor > 5 cm a: não fixo b: fixo à Pele c: fixo ao músculo	Metástases à distância (M) M0 Sem evidência de metástase distante M1 Metástase distante incluindo linfonodos não-regionais
T4 Tumor de qualquer tamanho (Carcinoma inflamatório)	

5.6 Cirurgia

A abordagem cirúrgica foi a mastectomia radical unilateral. As cadelas foram monitoradas durante o período pós-cirúrgico com utilização de bandagem compressiva e no décimo quinto dia foi realizada a retirada de pontos e colheita de sangue periférico mediante jejum alimentar de 12 horas para avaliação do perfil lipídico pós-operatório.

5.7 Caracterização histopatológica da neoplasia

Biópsia excisional e Exame histopatológico

Imediatamente após a cirurgia, a cadeia mamária acometida, incluindo pele, tecido subcutâneo e linfonodos regionais, foi encaminhada ao Laboratório de Patologia Veterinária (LPV). Os fragmentos foram fixados em formol neutro e tamponado com fosfato a 10% e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina (PROPHET; MILLS; ARRINGTON, 1992). As secções histológicas de 4µm foram coradas pelas técnicas da Hematoxilina-Eosina (HE) (LUNA, 1968) para posterior classificação e graduação histopatológica.

Classificação Histológica

Todos os exames histopatológicos foram processados no Laboratório de Patologia Veterinária HOSPMEV/UFBA e para todos os casos foram confeccionadas duplicatas das lâminas, visando à análise independente por dois patologistas veterinários (LPV/UFBA e IGM/Fiocruz). A identificação do tipo histológico seguiu a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) (MISDORP et al., 1999) e padronização do *Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors* (CASSALI et al., 2014). O grupo de estudo foi composto por carcinomas em tumores mistos (CMT) e outros carcinomas (Ca).

Graduação histopatológica

Os tumores foram graduados pelo Sistema de Nottingham (ELSTON e ELLIS, 1998) (**Tabela 4**), e os critérios incluíram formação tubular, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica.

Formação tubular

As estruturas tubulares foram definidas como aquelas que apresentaram lúmen claro e visível. O escore 1 foi atribuído aos tumores que apresentaram mais de 75% da área carcinomatosa formada por túbulos, com escore 2 entre 10% - 75% e escore 3 entre 0 - 10% da área do tumor.

Pleomorfismo nuclear

Para análise de pleomorfismo nuclear, foram observados tamanho e forma dos núcleos das células epiteliais normais adjacentes ao tumor, sendo utilizado como parâmetro para avaliação da agressividade tumoral. Escore 1 foi atribuído para núcleos pequenos e regulares e cromatina uniforme. Quando os núcleos que apresentaram tamanho aumentado e com variabilidade foi conferido escore 2. A presença de células com acentuado pleomorfismo, com grande variação no tamanho e forma do núcleo, apresentando ainda núcleos bizarros e vesiculosos, com múltiplos nucléolos caracterizaram o escore 3.

Contagem mitótica

A contagem mitótica foi realizada por dois observadores de forma independente, sendo o resultado final obtido a partir da média dos valores. Foi utilizado o microscópio BX-41 (Olympus Latin America) com ocular de 10x e objetiva de 40x. Este equipamento fornece uma área de 0,237 mm visualizada em campo de maior aumento (CGA). As figuras mitóticas foram contadas em 10 CGA, selecionados preferencialmente na periferia do tumor onde se observa maior atividade de proliferação celular (ELSTON e ELLIS, 1998). O escore foi atribuído de acordo com o número de mitoses detectadas: escore 1 (0-8 mitoses); escore 2 (9-16 mitoses) e escore 3 (acima de 17 mitoses). Núcleos picnóticos ou hiper cromáticos não foram contados uma vez que estas células podem estar relacionadas com processos de necrose ou apoptose.

Tabela 4: Critérios utilizados na graduação de tumores mamários de cadela conforme o grau de malignidade

Características	Pontuação
Formação tubular	
75% do tumor	1
10 a 75% do tumor	2
< 10% do tumor	3
Pleomorfismo nuclear	
Tamanho nuclear semelhante à célula normal (2 a 3 x o tamanho da hemácia)	1
Moderado aumento e variabilidade	2
Grande variação	3
Índice mitótico	
0 a 8 mitoses	1
9 a 16 mitoses	2
17 ou mais mitoses	3

Alocação do grau histopatológico

Para a obtenção do grau histológico combinado do tumor, o escore para cada fator foi somado, resultando em um valor total que varia de 3 a 9. O grau tumoral foi alocado baseado nos valores a seguir:

3 – 5 pontos: grau I – baixo grau;

6 – 7 pontos: grau II – grau intermediário;

8 – 9 pontos: grau III – alto grau.

5.6 Avaliação da concentração de androstenediona e estrona sérica

Estrona e Androstenediona

Para avaliar a concentração sérica dos hormônios estrona e androstenediona foram utilizados kits ELISA de competição multiespécie de competição (Develop[®]), e o procedimento foi realizado de acordo com instruções do fabricante.

5.9 Imuno-histoquímica (Expressão dos Receptores Hormonais e Aromatase)

Foram utilizados os anticorpos anti-aromatase, anti-receptor de estrógeno e anti-receptor de progesterona (**Tabela 5**) em secções histológicas com 4µm, contendo fragmentos de tecido adiposo peritumoral. Foi utilizado kit comercial com sistema de amplificação polimérica (NovoL ink Max Polymer Detection System, LEICA[®]). Os reagentes foram aplicados pela técnica manual, sendo o tempo de incubação do anticorpo primário de 1 hora. Para os demais reagentes, o tempo foi de 30 minutos, com exceção do cromógeno DAB que foi de dois minutos. Como controles positivos foram utilizadas amostras de mama previamente testadas para avaliação do anticorpo e os controles negativos foram obtidos por substituição do anticorpo primário pelo soro normal.

Na avaliação semiquantitativa da imunomarcagem de RE e RP, amostras contendo >1% de adipócitos marcados foram consideradas positivas, segundo os critérios de Hammond et al., 2010. Para avaliação da expressão de aromatase, a porcentagem de adipócitos marcados foi classificada seguindo os cinco respectivos componentes: 0: < 1%, 1: 1–25%, 2: 26–50%, 3: 51–75%, 4: 76–100%. A intensidade de marcação da aromatase foi determinada segundo a graduação: 0: sem marcação; 1: fraca; 2: moderada e 3: intensa. O escore de cada caso foi obtido pela multiplicação do componente da porcentagem de células pela graduação da intensidade de marcação (adaptado de Sasano et al., 2005). Como controles negativos foram utilizadas amostras de parênquima mamário saudáveis.

Tabela 5: Especificações dos anticorpos utilizados nos ensaios imuno-histoquímicos de carcinomas mamários em cadelas

	Clone	Marca	Recuperação Antigênica	Diluição	Tempo de Incubação
Anti-aromatase	M22	Biovision Research Products	Calor úmido EDTA pH 9	1:100	1 hora
Anti-RE	1D5	Dako	Calor úmido Citrato pH 6	1:50	1 hora
Anti-RP	HPRA2	Dako	Calor úmido Citrato pH 6	1:50	1 hora

5.10 Suplementação com óleo de peixe (ômega 3)

Após quinze dias do procedimento cirúrgico, sete cadelas ingeriram junto à refeição uma cápsula de óleo de peixe (Inovet®) (**Anexo 5**) administrada para cada 10 kg de peso vivo. No óleo de peixe 500mg, 90% e 60% da composição era ômega 3, sendo 60% EPA (ácido eicosapentaenóico) e 40% DHA (ácido docosahexaenoico). No primeiro mês, a suplementação foi realizada com óleo de peixe (ômega 3 90%) e no segundo mês a suplementação foi realizada com óleo de peixe (ômega 3 60%), de acordo com recomendação do fabricante, com colheita de sangue no início, 30 dias e 60 dias após início do tratamento. Foi recomendada a conservação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As cadelas foram selecionadas de acordo com o comprometimento e responsabilidade dos tutores e os animais apresentavam os diagnósticos histopatológicos CTM (n=3) e Ca (n= 4).

5.11 Acompanhamento e sobrevida

Recomendou-se a realização de exames radiológicos a cada 60 dias, exames laboratoriais (hemograma, bioquímico – ureia, creatinina, ALT e FA) e clínicos

mensalmente até 12 meses após a cirurgia, período de acompanhamento no qual foram coletados dados a respeito da sobrevivência global. O tempo de sobrevivência global foi definida como sendo o período em dias entre a exérese cirúrgica do tumor primário e a data de óbito pela doença.

Os animais que evoluíram para o óbito foram necropsiados no Laboratório de Patologia Veterinária/HOSPMEV-UFBA para determinação da *causa mortis* e detecção de possíveis metástases. Este procedimento foi realizado após autorização dos proprietários por escrito em formulário específico (**Anexo 6**).

5.12 Análise estatística

As análises do perfil lipídico e metabólico foram realizadas em duas fases. Na primeira fase as análises foram realizadas utilizando o procedimento GLINMIX do SAS (versão 9.2), sendo as variáveis gonadectomia, tipo histológico e a interação entre estes considerados fixos no modelo estatístico. Foram testadas as seguintes distribuições de probabilidade contínua em cada variável: exponencial, log-normal, Gamma, Weibull, distribuição t, inversa gaussiana e normal. Os critérios para obtenção do melhor ajuste relativo à estas distribuições foram o critério de máxima verossimilhança e a relação entre Chi-quadrado e graus liberdade, que foram melhores quanto maior a proximidade de 1. Para comparação entre as médias de máxima verossimilhança o valor de p de cada comparação foi conclusivo. Todas as análises foram conduzidas utilizando 0,05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I.

Para a avaliação do perfil lipídico e metabólico frente a suplementação com óleo de peixe (ômega 3) foi utilizado o procedimento GLINMIX do SAS (versão 9.2), sendo a suplementação considerada efeito fixo no modelo estatístico. Nesta etapa foram realizados dois contrastes ortogonais: 1) Pré x 60: médias de máxima verossimilhança comparadas antes da suplementação e após 30 dias de suplementação com óleo de peixe (ômega 3 60% 3); 2) Pré x 90: médias de máxima verossimilhança comparadas antes da suplementação e após 30 dias de suplementação com óleo de peixe (ômega 3 90%).

Para estrona e androstediona, foram avaliadas as relações das concentrações séricas destes hormônios (variáveis dependentes) com o IMC, peso corporal e o percentual de gordura corporal (variáveis independentes). Estimou-se o coeficiente de

determinação parcial de cada variável independente no modelo e se adotou o procedimento de seleção de equações ajustadas denominado stepwise (DRAPER; SMITH, 1981), utilizado o procedimento REG do SAS (versão 9.1). Apenas as variáveis significativas ($p < 0,05$) foram mantidas na composição do modelo matemático final. A avaliação da aromatase foi realizada pelo teste de qui-quadrado.

As curvas de sobrevida foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox) ou Cox na análise univariada ou multivariada, respectivamente e utilizando o softwares Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Em todos os casos, valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados sob a forma de dois artigos científicos elaborados submetido para publicação.

ESCOPO

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

QUALIS: A2

GUIA PARA A COMPOSIÇÃO DO ARTIGO

Os artigos devem ser submetidos através do Sistema Scholar One, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponíveis no ato de submissão e no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outro periódico. Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob a forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do artigo enviado. Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos artigos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os artigos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review). NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista é cobrada taxa de publicação (paper charge) no valor de R\$ 2.000,00 por artigo editorado, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os artigos devem ser organizados em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

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

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente abreviar seus nomes quando compridos, mas mantendo o primeiro nome e o último sobrenome por extenso, como por exemplo: Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto (inverso, Peixoto P.V.); Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa (inverso, Riet-Correa F.). Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores;

c) o ABSTRACT deve ser uma versão do RESUMO em português, podendo ser mais explicativo, seguido de “INDEX TERMS” que incluem palavras do título;

d) o RESUMO deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos “TERMOS DE INDEXAÇÃO” que incluem palavras do título;

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

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

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

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

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados;

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

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no artigo e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido dos demais autores (todos), em caixa alta e baixa, do ano, do título da publicação citada, e, abreviado (por extenso em casos de dúvida), o nome do periódico ou obra, usando sempre como exemplo os últimos fascículos da revista (www.pvb.com.br).

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

a) A digitação deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das Figuras no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras e os Quadros devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Os nomes científicos devem ser escritos por extenso no início de cada capítulo.

b) a redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo número de chamada, sem o uso do “Inserir nota de fim”, do Word. Todos os Quadros e todas as Figuras têm que ser citados no texto. Estas citações serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, em ordem crescente. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não devem conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores (na língua do país dos autores), o e-mail do autor para correspondência e dos demais autores. Em sua redação deve-se usar vírgulas em vez de traços horizontais;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no artigo, serão colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso;

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

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada em caixa alta e baixa, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos. 3. Os gráficos (=Figuras) devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área do gráfico (=Figura); evitar-se-á o uso de título ao alto do gráfico (=Figura). 4. As legendas explicativas das Figuras devem conter informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, independente do texto). 5. Os Quadros devem ser explicativos por si mesmos. Entre o título (em negrito) e as colunas deve vir o cabeçalho entre dois traços longos, um acima e outro abaixo. Não há traços verticais, nem fundos cinzas. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

8.0 REFERÊNCIAS

- AHIMA, R. S. & FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metabol.* v.11, n.8, p.327-32, 2000.
- ALFAQIH, M. A.; ALLOTT, E. H.; HAMILTON, R. J.; FREEMAN, M. R.; FREEDLAND, S. J. The current evidence on statin use and prostate cancer prevention: are we there yet? *Nat Rev Urol.* v. 14, n.2, p.107-119. 2017.
- ALIKHANI, N.; FERGUSON, R. D.; NOVOSYADLYY, R.; GALLAGHER, E. J.; SCHEINMAN, E. J.; YAKAR, S.; LEROITH, D. Mammary tumor growth and pulmonary metastasis are enhanced in a hyperlipidemic mouse model. *Oncogene*, Basingstoke, v. 32, n. 8, p. 961-967, 2013.
- APTEKMANN, K. P.; SUHETT, W. G.; MENDES JÚNIOR, A. F.; SOUZA, G. B. TRISTÃO, A. P. P. A.; ADAMS, F. K.; AOKI, C. G.; PALACIOS JÚNIOR, R. J. G.; CARCIOFI, A. C; TINUCCI-COSTA, M. Aspectos nutricionais e ambientais da obesidade canina. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.44, n.11, p.2039-2044, 2014.
- BAGGA D, CAPONE S, WANG HJ, HEBER D, LILL M, CHAP L, GLASPY JA. Dietary regulation of omega 3/omega 6 polyunsaturated fatty acids in patients with breast cancer. *J Natl Cancer Inst* v.98, sn, p. 1123-31,1997
- BARROUIN-MELO, S. M.; ANTURANIEMI, J.; SANKARI, S.; GRIINARI, M.; ATROSHI, F.; OUNJAJEAN, S.; HIELM-BJÖRKMAN, A. K. Evaluating oxidative stress, serological- and haematological status of dogs suffering from osteoarthritis, after supplementing their diet with fish or corn oil. *Lipids Health Dis.* v.15, n.1, p.139, 2016: 139.
- BERQUIST, S. W.; LEE, H. J.; HAMILTON, Z.; BAGRODIA, A.; HASSAN, A.; BEKSAÇ, A. T.; DUFOUR, C. A.; WANG, S; MEHRAZIN, R.; PATTERSON, A.; DERWEESH, I. H. Statin utilization improves oncologic and survival outcomes in patients with dyslipidemia and surgically treated Renal Cell Carcinoma. *Curr Med Chem.* 2017 (Ahead of Print).
- BIONDO, P. D.; BRINDLEY, D. N.; SAWYER, M. B.; FIELD, C. J. The potential for treatment with dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids during chemotherapy. *J Nutr Biochem.* v. 19, n.12, p. 787-96, 2008.
- BORGES, F.M. DE O.; NUNES, I. J. Nutrição e manejo alimentar de cães na saúde e na doença. *Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG*, n. 23, p. 5 - 103, 1998.
- BOUGNOUX, P.; CHAJÈS, V.; GERMAIN, E.; HUBERT, B.; LHUILLERY, C.; LE FLOCH, O.; BODY, G.; CALAIS, G. Cytotoxic drug efficacy correlates with adipose tissue docosahexaenoic acid level in locally advanced breast carcinoma. *Lipids* v.34, sn, 1999. Suplemento109.

- BRUNETTO, M. A.; NOGUEIRA, S.; SÁ, F. C.; PEIXOTO, M.; VASCONCELLOS, R. S.; FERRAUDO, A. J.; CARCIOFI, A. C. Correspondência entre obesidade e hiperlipidemia em cães. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.41, n.2, p.266-271, 2011
- BURKHOLDER, W. J. & TOLL, P. W. Obesity. In: HAND, M.S. et al. *Small animal of clinical nutrition*. 4.ed. Kansas: Mark Morris Institute, 2000. p.401-430.
- BURKHOLDER, W. J.; TOLL, P. W. Controle da obesidade. In: HAND, M. S.; TATCHER, C. D.; REMILLARD, R. I.; ROUDEBUSCH, P. *Small animal clinical nutrition*. 4.ed. Topeka: Mark Morris Institute, 1997. p. 1-44.
- CARCIOFI, A. C.; GONÇALVES, K. N. V.; VASCONCELLOS, R. S.; BAZOLLI, R. S.; BRUNETTO, M. A.; PRADA, F. A weight loss protocol and owners participation in the treatment of canine obesity. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1331- 1338. 2005.
- CARMO, M. C. N. S. & CORREIA, M. I. T. D. A Importância dos Ácidos Graxos Ômega-3 no Câncer. 2009.
- CASE, L. P., CAREY, E. P., HIRAKAWA, D. A. *Canine and feline nutrition. A resource for companion animal professionals*. St. Louis: Mosby. 1995. 455p.
- CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; FERREIRA, E.; et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine mammary Tumors – 2014. v.7, n.2, 1
- CAVALCANTI MF & CASSALI GD Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas – revisão. *Revista Clínica Veterinária*, v.61, sn, p.56-63, 2006
- CINTI, S. The Adipose Organ. *Nutrition and Health: Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease*. 1999; p.3-19
- CLELAND, W. H.; MENDELSON, C. R.; SIMPSON, E. R. Effects of aging and obesity on aromatase activity of human adipose cells. *J Clin Endocrinol Metab*. v.60, n.1, p. 174-7, 1985.
- CONACCI-SORRELL, M.; ZHURINSKY, J.; BEN-ZE'EV, A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J. Clin. Investig*. v.109, n.8, p. 987–991, 2002
- DALECK, C. R.; FRANCESCHINI, P. H.; ALESSI, A. C.; SANTANA, A. E.; MARTINS, M. I. M. Aspectos clínico e cirúrgico do tumor mamário canino. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 28, n. 1, p. 95-100, 1998.
- DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; COSTA, T. A.; MACEDO, T. R.; RODIGHIERI, S. M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C. H. 2002. 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, p.15-26, 2002.

DENG, C. & BRODIE, S. G. Knockout mouse models and mammary tumorigenesis. *Cancer Biol*, v.11, p.387-394, 2001.

DIEZ, M. & NGUYEN, P. Obesity: epidemiology, pathophysiology and management of the obese dog. In: PIBOT, P. et al. *Encyclopedia of canine clinical nutrition*. France: Aniwa SAS, 2006. p.2-57.

DRAPER, N.R.; SMITH, H. *Applied regression analysis*. 2.ed. New York: John Wiley, 1981. 709p.

ELSTON, E.W. ELLIS, I.O Method for grading breast cancer. *J Clin Pathol*. v.46, n.2 p. 189–190, 1993.

ESTRELA-LIMA A, ARAÚJO MSS, COSTA-NETO JM, TEIXEIRA-CARVALHO A, BARROUIN-MELO SM, CARDOSO SV, MARTINS-FILHO AO, SERAKIDES R & CASSALI GD Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer*, v.10, sn, p.256-270, 2010.

FARCAS, A. K.; MICHEL, K. E. Confronting the Problem of Obesity in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 46, n. 5, p. xi–xii, set. 2016.

FELICIANO, M. A. R. et al. Estudo clínico, histopatológico e imunoistoquímico de neoplasias mamárias em cadelas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 64, n. 5, p. 1094–1100, out. 2012.

FERREIRA E, BREGUNCI GC, SCHMITT FC & CASSALI GD Protocol for the anatomopathological examination of canine mammary tumors. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria Zootecnia*, v.55, p.105-109, 2003

FISCHBACH, F. Exames bioquímicos. In:_____. *Manual de enfermagem: Exames laboratoriais & diagnósticos*. 6.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2002. p.168-247.

FONSECA, C. S. & DALECK, C. R. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeito da ovário-histerectomia como terapia adjuvante. *Ciência Rural* v.30, n.4, p.731-735, 2000.

FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I. C.; LIMA, F. B. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice O tecido adiposo como órgão endócrino: da teoria à prática. *J. Pediatr*. V.83, n.5, 2007

FURUKAWA, S.; FUJITA, T.; SHIMABUKURO, M.; IWAKI, M.; YAMADA, Y.; NAKAJIMA, Y.; NAKAYAMA, O.; MAKISHIMA, M.; MATSUDA, M.; SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. v.114, n.12, p. 1752-61, 2004.

GERMAN, A. J.; HOLDEN, S. L.; BISSOT, T., HACKETT, R. M.; BIORGE, V. Dietary energy restriction and successful weight loss in obese client-owned dogs. *J Vet Intern Med*. v. 21, n. 6, p. 1174-80, 2007.

- GILLES, C.; POLETTE, M.; ZAHM, J. M.; TOURNIER, J. M.; VOLDERS, L.; FOIDART, J. M.; BIREMBAUT, P. Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration. *Journal of cell science*, v.112, n. 24, p.4615-4625, 1999.
- GONG, Y.; DOU, L. J.; LIANQ, J. Link between obesity and cancer: role of triglyceride/free fatty acid cycling. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. v. 19, n. 19, p.2808-20, 2014.
- HAHN, K. A.; RICHARDSON, R. C.; KNAPP, D. W. Canine malignant mammary neoplasia: biological behavior, diagnosis, and treatment alternatives. *J Am Anim Hosp*, v. 28, p. 251-256, 1992.
- HAMMOND, M. E. H. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Journal of Oncology Practice*, v. 6, n. 4, p. 195–197, jul. 2010.
- HAMPER, B. Current Topics in Canine and Feline Obesity. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 46, n. 5, p. 785-795, 2016.
- HARDMAN, W. E. (n-3) fatty acids and cancer therapy. *The Journal of nutrition*, v. 134, n. 12 Suppl, p. 3427S–3430S, dez. 2004.
- HEGELE, R. Plasma lipoproteins: Genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet*. v.10, p. 109–121, 2009.
- HENEGAR, J.R., ZHANG, Y., DE RAMA, R., HATA, C., HALL, M.E., HALL, J.E. Catheter-based radiofrequency renal denervation lowers blood pressure in obese hypertensive dogs. *Am J Hypertens*. v.27, n.10, p. 285-92, 2014
- JEON, Y. W.; KANG, S. H.; PARK, M. H.; LIM, W.; CHO, S. H.; SUH, Y. J. Relationship between body mass index and the expression of hormone receptors or human epidermal growth factor receptor 2 with respect to breast cancer survival. *BMC Cancer*, v. 15, n. 1, p. 865, 6 dez. 2015.
- KANEKO, J.J. et al. Appendixes. In:_____. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997. p.885-905.
- KIL, D. Y. & SWANSON, K. S. Endocrinology of obesity. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, v.40, p.205-219, 2010.
- KIMBUNG, S.; LETTIERO, B.; FELDT, M.; BOSCH, A.; BORGQUIST, S. High expression of cholesterol biosynthesis genes is associated with resistance to statin treatment and inferior survival in breast cancer. *Oncotarget*, v. 7, n. 37, p. 59640–59651, 13 set. 2016.
- KITAHARA, T.; LI, H.-S.; BALABAN, C. D. Localization of the mitochondrial uncoupling protein family in the rat inner ear. *Hearing research*, v. 196, n. 1–2, p. 39–48, out. 2004.

KODAMA, M.; KODAMA, T. Statistical analysis of hormonal effects on the steroid responsiveness of solid Ehrlich tumors. *Cancer Res*, v.30, p.228-235, 1970

KRISTIANSEN, V. M.; PEÑA, L.; DÍEZ-CÓRDOVA, L.; ILLERA, J. C.; SKJERVE, E.; BREEN, A. M.; COFONE, M. A.; LANGELAND, M.; TEIGE, J.; GOLDSCHIDT, M.; SORENMO, K.U. Effect of Ovariohysterectomy at the Time of Tumor Removal in Dogs with Mammary Carcinomas: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v.30, n.1, p. 230-241, 2016.

KUMAR, V. A Comparitive Study to Evaluate the Role of Serum Lipid Levels in Aetiology of Carcinoma Breast. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 9, n.2, p.1-3, 2015.

LAFLAMME, D. P. Development and validation of a body condition score system for dogs: a clinical tool. *Canine Practice*, Santa Barbara, v. 22, n. 3, p. 10- 15, 1997.

LAFLAMME, D. P. Understanding and managing obesity in dogs and cats. *Veterinary Clinics of the North America*, v.36, p.1283-1295, 2006.

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

LLAVERIAS, G.; DANILO, C.; MERCIER, I.; DAUMER, K.; CAPOZZA, F.; WILLIAMS, T. M.; SOTGIA, F.; LISANTI, M. P.; FRANK, P. G. Role of Cholesterol in the Development and Progression of Breast Cancer. *The American Journal of Pathology*, v. 178, n. 1, p. 402–412, jan. 2011.

LU, C.-W. et al. VLDL and LDL, but not HDL, promote breast cancer cell proliferation, metastasis and angiogenesis. *Cancer Letters*, v. 388, p. 130–138, mar. 2017.

LUNA, L.G. 1968. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3rd ed. McGraw Hill, New York

MCDONNELL, A. et al. An evaluation of the implementation of Advanced Nurse Practitioner (ANP) roles in an acute hospital setting. *Journal of Advanced Nursing*, v. 71, n. 4, p. 789–799, abr. 2015.

MEYER, D. J. & HARVEY, J. W. *Veterinary laboratory medicine: interpretation & diagnosis*. 2.ed. Philadelphia: Sauders, 2004. 351p.

MICALLEF, D.; MICALLEF, S.; SCHEMBRI-WISMAYER, P.; CALLEJA-AGIUS, J. Novel applications of COX-2 inhibitors, metformin, and statins for the primary chemoprevention of breast cancer. *J Turk Ger Gynecol Assoc*. v.17, n.4, p. 214-223, 2016.

MISDORP W. 2002. Tumors of the mammary gland, p.575-606. In: Meuten D. J. (Ed.), *Tumors in Domestic Animals*. 4th ed. Iowa State Press, Ames.

- MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, E. Definitions and explanatory notes. In: _____. Who Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1999. p.18-27.
- MORGANTE, M. Obesità negli animali da compagnia: problema emergente. *Praxis Veterinaria*, v. 20, n. 2, p.18-22, 1999.
- MORRIS, J.; DOBSON, J. Mammary gland. In: _____. Small animal oncology. 1. ed. Iowa: Blackwell Science, 2001. p. 184-185.
- MÜLLER, D. C. M.; SCHOSSLER, J. E.; PINHEIRO, M. Adaptação do índice massa corporal humano para cães. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n.4, p. 1038-1043, 2008.
- MULLIGAN, R. M. Mammary cancer in the dog: a study of 120 cases. *Am J Vet Res* v.36, p.1391-1396. 1975.
- MURAI, T. Cholesterol lowering: role in cancer prevention and treatment. *Biological Chemistry*, v. 396, n. 1, p. 1–11, 1 jan. 2015.
- NAYAN, M.; PUNJANI, N.; JUURLINK, D. N.; FINELLI, A.; AUSTIN, P. C.; KULKARNI, G. S.; ULERYK, E.; HAMILTON, R. J. Statin use and kidney cancer survival outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treatment Reviews*, v. 52, p. 105–116, jan. 2017.
- NELSON, D. L. & COX, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- NELSON, E. R.; WARDELL, S. E.; JASPER, J. S.; PARK, S.; SUCHINDRAN, S.; HOWE, M. K.; CARVER, N. J.; PILLAI, R. V.; SULLIVAN, P. M.; SONDHI, V.; UMETANI, M.; GERADTS, J.; MCDONNELL, D. P. 27-Hydroxycholesterol Links Hypercholesterolemia and Breast Cancer Pathophysiology. *Science*, v. 342, n. 6162, p. 1094–1098, 29 nov. 2013.
- NOGUEIRA, C. R. & BRENTANI, M. M. Triiodothyronine mimics the effects of estrogen in breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v.59, n.3/4, p.271-279, 1996
- OLIVEIRA, L. O.; OLIVEIRA, R. T.; LORETTI, A. P.; RODRIGUES, R.; DRIEMEIER, D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.31, p.105-110, 2003.
- OWEN, L. N. TNM Classification of tumors in domestic animals. World Health Organization, Geneva, p. 26-32, 1980.
- PEREIRA, M. Dislipidemias. Guia de reações adversas a medicamentos. Pg102-104. 2013. Acesso em <<http://www.ff.ul.pt/ufs/files/2015/09/09Dislipidemia.pdf>>
- PÉREZ-ALENZA, M. D.; RUTTEMAN, G. R.; PEÑA, L.; BEYNEN, A. C.; CUESTA, P. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in case-control study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.12, p.132-139, 1997.

PRADO, B. B. F. Influência dos hábitos de vida no desenvolvimento do câncer. *Cienc. Cult.*, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 21-24, 2014.

PREVO, R.; DEUTSCH, E.; SAMPSON, O.; DIPLEXCITO, J.; CENGEL, K.; HARPER, J.; O'NEILL, P.; MCKENNA, W. G.; PATEL, S.; BERNHARD, E. J. Class I PI3 Kinase Inhibition by the Pyridinylfuranopyrimidine Inhibitor PI-103 Enhances Tumor Radiosensitivity. *Cancer Research*, v. 68, n. 14, p. 5915–5923, 15 jul. 2008.

PRIESTER, W. A. Occurrence of mammary neoplasms in bitches in relation to breed, age, tumour type, and geographical region from which reported. *J Small Anim Pract* 20, 1-11, 1979

SCHNEIDER, R.; DORN, C. R.; TAYLOR, D. O. N. Factors Influencing Canine Mammary Cancer Development and Postsurgical Survival. *J Natl Cancer Inst* (1969) 43 (6): 1249-1261. doi: <https://doi.org/10.1093/jnci/43.6.1249>.

PROPHET, E. B., MILLS, B., ARRINGTON, J. B. AND SOBIN, L. H. Laboratory methods in Histotechnology.. (eds.). Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology, Washington DC, p.98–100,1992.

QUEIROGA, F. & LOPES, C. Tumores mamários caninos: novas perspectivas. *Anais In: Congresso de Ciências Veterinárias, 2002. Oeiras, Portugal* p.183-190.

RANKINEN, T.; ZUBERI, A.; CHAGNON, Y. C.; WEISNAGEL, S. J.; ARGYROPOULOS, G.; WALTS, B.; PÉRUSSE, L.; BOUCHARD, C. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity*. v.14, p.529–644, 2006

RAY, G. & HUSAIN, S. A. Role of lipids, lipoproteins and vitamins in women with breast cancer. *Clin Biochem*. v.34, n.1, p.71-6, 2001.

RODIGHERI, S. M. & DE NARDI, A. B. Quimioterapia metronômica em cães e gatos- revisão de literatura. *Clinica Veterinaria*, v.105, p.40-48, 2013

RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. 2001. Tumors of the mammary gland, p.455-477. In: Withrow S.J. & MacEwen E.G. (Eds), *Small Animal Clinical Oncology*. 3rd ed. W.B. Saunders, Philadelphia.

SCHAIRER, C.; GADALLA, S. M.; PFEIFFER, R. M.; MOORE, S. C.; ENGELS, E. A. Diabetes, Abnormal Glucose, Dyslipidemia, Hypertension, and Risk of Inflammatory and Other Breast Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, v. 26, n. 6, p. 862–868, jun. 2017.

SCHMIDT, C.; LOPES, M.D.; SILVA, M.C.; FIGHERA, R.A.; SOUZA, T.M. Perfil lipoprotéico de cadelas submetidas à ovariectomia com e sem reposição estrogênica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, n.4, p.449-456, 2004.

SCHNEIDER, R.; DORN, C. R.; TAYLOR, D. O. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 43, n. 6, p. 1249–61, dez. 1969.

SHI, Y.; HAN, J. J.; TENNAKOON, J. B.; MEHTA, F. F.; MERCHANT, F. A.; BURNS, A. R.; HOWE, M. K.; MCDONNELL, D. P.; FRIGO, D. E. Androgens Promote Prostate Cancer Cell Growth through Induction of Autophagy. *Molecular Endocrinology*. v.27, n.2, p. 280-295, 2013.

SHIROTA, T.; HAJI, S.; YAMASAKI, M.; IWASAKI, T.; HIDAHA, T.; TAKEYAMA, Y.; SHIOZAKI, H.; OHYANAGI, H. Apoptosis in human pancreatic cancer cells induced by eicosapentaenoic acid. *Nutrition*. v.21, n.10, p. 1010-7, 2005.

SICCHIERI, B. L. Caracterização da lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) por Meios Espectroscópicos. *Autarquia Associada á Universidade de São Paulo*. São Paulo. p. 20-30, 2012.

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

SIMPSON, E. R.; CLYNE, C.; RUBIN, G.; BOON, W. C.; ROBERTSON, K.; BRITT, K.; SPEED, C.; JONES, M. Aromatase - A Brief Overview. *Annual Review of Physiology*, v. 64, n. 1, p. 93–127, mar. 2002.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. *Veterinary Clinical Small Animal*, v. 33, p. 573-596, 2003.

SPOSITO, A. C.; CAMELLI, B.; FONSECA, F. A. H.; BERTOLAMI, M. C. (Coordenação Geral) 2007 IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia

SWITONSKI, M.; MANKOWSKA, M. Dog obesity--the need for identifying predisposing genetic markers. *Research in veterinary science*, v. 95, n. 3, p. 831–6, dez. 2013.

TABAK, D. Obesidade e câncer. *Onco. Sn*, p. 22- 25, 2014, disponível em: <http://revistaonco.com.br/wp-content/uploads/2014/03/MAMA.pdf>

TEOH, S. L.; DAS, S. Tumour biology of obesity-related cancers: understanding the molecular concept for better diagnosis and treatment. *Tumor Biology*, v. 37, n. 11, p. 14363–14380, 14 nov. 2016.

THRALL, M.A. et al. Avaliação laboratorial do fígado. In:_____. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. São Paulo : Roca, 2007. p.335-354.

TORÍBIO, J. M. M. L.; ESTRELA-LIMA, A.; MARTINS-FILHO, E. F.; RIBEIRO, L. G. R.; D'ASSIS, M. J. M. H.; TEIXEIRA, R. G.; DAMASCENO, K. A.; CASSALI, G. D.; COSTA-NETO, J. M. Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de Salvador, Bahia. *Rev. Ceres*. v.59, n.4, 2012.

TORRES, R. J.; DE NORONHA, L.; CASELLA, A. M.; GROBE, S. F.; MARTINS, I. C.; TORRES, R. R.; LUCHINI, A.; STURZENEKER, M. C.; TORRES, C. L.; PRECOMA, D. B. Tumour biology of obesity-related cancers: understanding the

molecular concept for better diagnosis and treatment. *Tumor Biology*, v. 37, n. 11, p. 14363–14380, 14 nov. 2016.

TEOH, S. L.; DAS, S. Tumour biology of obesity-related cancers: understanding the molecular concept for better diagnosis and treatment. *Tumor Biology*, v. 37, n. 11, p. 14363–14380, 14 nov. 2016.

TORRES, R. J. DE A. et al. Effect of Olmesartan on Leukocyte Recruitment in Choroid–Sclera Complex in Hypercholesterolemia Model. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, v. 29, n. 8, p. 709–714, out. 2013.

VARA-MESSLER, M.; PASQUALINI, M. E.; COMBA, A.; SILVA, R.; BUCCELLATI, C.; TRENTI, A.; TREVISI, L.; EYNARD, A. R.; SALA, A.; BOLEGO, C.; VALENTICH, M. A. Increased dietary levels of α -linoleic acid inhibit mammary tumor growth and metastasis. *European journal of nutrition*, v. 56, n. 2, p. 509–519, mar. 2017.

VEIGA, A. P. M. Suscetibilidade a diabetes mellitus em cães obesos. 2007. 90 f. Tese (doutorado em ciência animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 46.

VOORWALD, F. A.; TIOSSO, C. F.; TONIOLLO, G. H. Gonadectomia pré-puberal em cães e gatos. *Cienc. Rural*. v.43, n.6, pp.1082-1091, 2013.

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

WITHROW, S. J. & VAIL, D. M. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. 4.ed. Saint Louis: Saunders, 2007. Cap.18, p.375-401.

WITHROW, S. J. Surgical management of canine mammary tumors. *Vet Clin North Am*, v. 5, n. 3, p. 495-506, 1975.

WOLFE, A. R.; ATKINSON, R. L.; REDDY, J. P.; DEBEB, B. G.; LARSON, R.; LI, L.; MASUDA, H.; BREWER, T.; ATKINSON, B. J.; BREWSTER, A.; UENO, N. T.; WOODWARD, W. A. High-Density and Very-Low-Density Lipoprotein Have Opposing Roles in Regulating Tumor-Initiating Cells and Sensitivity to Radiation in Inflammatory Breast Cancer. *International Journal of Radiation Oncology*Biography*Physics*, v. 91, n. 5, p. 1072–1080, abr. 2015.

WOZNIAK, S. E.; GEE, L. L.; WACHTEL, M. S.; FREZZA, E. E. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci*.v.54, n.9, p.1847-56, 2009

YOO, K. et al. Postmenopausal obesity as a breast cancer risk factor according to estrogen and progesterone receptor status (Japan). *Cancer Lett*, v.167, p.57-63, 2001.

YU, E. J.; GRABER, J. M.; LU, S. E.; LIN, Y.; LU-YAO, G.; TAN, X. L. Effect of Metformin and Statin Use on Survival in Pancreatic Cancer Patients: a Systematic Literature Review and Meta-analysis. *Current medicinal chemistry*, 2017.

YU, H. et al. A low ratio of n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids suppresses matrix metalloproteinase 13 expression and reduces adjuvant-induced arthritis in rats. *Nutrition research* (New York, N.Y.), v. 35, n. 12, p. 1113–21, dez. 2015.

ZORAN, D. L. Obesity in Dogs and Cats: A Metabolic and Endocrine Disorder. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 40, n. 2, p. 221–239, mar. 2010.

ANEXOS

Apêndice 1: Termo de esclarecimento/consentimento livre e esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
HOSPITAL DE MEDICINA VETERINÁRIA PROF RENATO MEDEIROS

Termo de esclarecimento/consentimento livre e esclarecido

O presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido tem o objetivo de informar ao responsável pelo paciente, quanto aos principais aspectos relacionados ao projeto ao qual o animal será submetido, complementando as informações prestadas pelo seu médico veterinário e pela equipe de profissionais do Projeto Mama do Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia.

Nome do projeto: Avaliação da eficácia da quimioterapia anti-neoplásica em cadelas portadoras de carcinomas de mama selecionadas a partir do perfil de leucócitos no sangue periférico

Nome dos Médicos Veterinários responsáveis pelo estudo: Prof. Dra. Alessandra Estrela da Silva Lima, MV. Msc. Mário Jorge Melhor Heine D'Assis, MV. Msc. Marília Carneiro de Araújo Machado, MV. Msc. Carlos Humberto da Costa Vieira Filho, MV. Msc. Keidylânia da Costa Santos, MV. Michelle Neves Pereira e MV. Aline Conceição dos Santos

Propósito e objetivo do projeto

Tumores de mama em cadelas são os principais tumores observados na clínica de pequenos animais, sendo a taxa de malignidade extremamente variável, podendo alcançar mais de 90% dos casos, muitos dos quais já apresentam metástase linfática no momento do diagnóstico. A partir deste estudo clínico, objetivamos determinar os principais achados clínicos e conduta cirúrgica adequada; estabelecer o diagnóstico e graduação histopatológica das neoplasias, correlacionando com os fatores prognósticos; avaliar o potencial proliferativo dos tumores e a eficácia da cirurgia e quimioterapia (convencional e metronômica) no aumento da sobrevida global; utilização de ômega 3 para melhoria do sistema imunológico; além do uso de eletroacupuntura como tratamento adjuvante à cirurgia.

Como eu faço para participar do projeto?

Todos os pacientes deverão ser avaliados previamente pelos médicos veterinários responsáveis pelo estudo e esta avaliação deverá ser realizada no Hospital de Medicina Veterinária da UFBA. Para participação do projeto o proprietário deve ser comprometido em realizar todo o tratamento recomendado, além de estar ciente dos custos que terão com o tratamento.

Quais são os exames necessários para inclusão do paciente no estudo?

Após a avaliação inicial, o paciente será encaminhado para radiografia de tórax em 3 incidências, USG, eletrocardiograma e ecocardiograma a serem realizadas em clínica indicada pelos médicos veterinários responsáveis pelo projeto. Após este procedimento, serão coletadas amostras de sangue destes pacientes para realização de função hepática (ALT, FA), função renal (ureia e creatinina), hemograma completo, cálcio e glicose.

Após os exames pré-operatórios será realizada a cirurgia (mastectomia unilateral total com castração), no qual 30 minutos antes do procedimento cirúrgico será coletada uma amostra de sangue para realização da imunofenotipagem e perfil lipídico sérico. No dia de revisão pós-operatória e retirada dos pontos será realizada uma colheita de sangue para avaliação hormonal e perfil lipídico. Naqueles pacientes em que será necessária a quimioterapia, esta será realizada após a retirada dos pontos e instituído suplementação com ômega 3 e ração Proplan-Nestlé. A quimioterapia será realizada no total de 6 sessões, com intervalo de 21 dias, sendo necessário o acompanhamento do paciente no intervalo entre as sessões.

Quais são os efeitos colaterais que meu animal poderá apresentar durante o tratamento?

O seu animal pode apresentar efeitos colaterais devido ao tratamento, podendo ser leves a sérios. Os efeitos colaterais mais comumente esperados são alterações gastrointestinais (vômito, diarreia e diminuição de apetite), que serão avaliados e então analisada a necessidade da interrupção do tratamento.

Qual será o custo do tratamento?

Exames de imagem (radiografia de tórax, USG, ECG E ECO)

Hemograma e bioquímica sérica

Cirurgia = de acordo com o peso do animal

Medicações pós-operatórias e quimioterápicas

Para fins de ordem legal, declaro que fui devidamente informado, em linguagem clara e objetiva, sobre as normas do projeto descrito acima e autorizo a participação do meu animal especificado abaixo, estando ciente de que assumirei a responsabilidade do tratamento bem como do acompanhamento do meu animal.

Aceito as responsabilidades pelos custos inerentes, bem como o fornecimento das medicações e os retornos marcados pelo médico veterinário responsável.

Foi-me concedida a oportunidade de esclarecer dúvidas e fazer questionamentos sobre a doença do meu animal e tratamento ao qual ele será submetido, assim como me foi disponibilizada a possibilidade de novos esclarecimentos caso eu julgue necessário.

Estou ciente dos riscos e benefícios do tratamento/procedimento proposto, assim como dos riscos decorrentes da não realização do(s) mesmo(s).

Declaro ter compreendido que não existe garantia absoluta sobre os resultados a serem obtidos, independentemente do tipo de cirurgia e de quimioterapia, da eficiência dos cuidados médicos e da boa técnica cirúrgica e anestésica.

Fui também informado que, apesar de incomum, durante ou após qualquer procedimento cirúrgico, pode ocorrer parada cardiorrespiratória, edema de glote, embolia pulmonar, pneumonias, derrame cerebral (acidente vascular encefálico), reações adversas a medicações utilizadas. Além disso, fui informado que, algumas vezes, estas complicações podem levar ao encaminhamento do meu animal para internamento, incapacidade temporária ou permanente e até óbito.

Estou ciente que excepcionalmente pode haver necessidade do procedimento ser suspenso ou de haver mudança da via de acesso, técnica e/ou tática cirúrgica. Estou ciente que situações imprevisíveis, imponderáveis e emergências podem ocorrer. Autorizo, nestas circunstâncias, qualquer outro procedimento, exames, tratamento ou cirurgia, para solucionar tais situações de acordo com suas características e peculiaridades técnicas, isto inclui a traqueostomia (abertura da traqueia) e a toracotomia (abertura do tórax).

Fui informado que, no período pós-operatório devo comunicar o médico veterinário responsável e/ou retornar ao hospital caso meu animal apresente febre, vermelhidão ou saída de secreção do local da cirurgia, dor forte, vômitos, dificuldades respiratórias, qualquer sangramento ou desmaio.

Confirmando que recebi explicações, li, compreendo e concordo com tudo que me foi esclarecido e que me foi concedido a oportunidade de anular, questionar, alterar qualquer espaço, parágrafo ou palavras com as quais não concordasse. Tive a oportunidade de fazer perguntas que me foram respondidas satisfatoriamente. Assim, tendo conhecimento, autorizo a realização do procedimento proposto em meu animal.

Dados do proprietário

Nome: _____

RG: _____ Telefone: _____

Dados do animal

Nome: _____ Espécie: _____ Idade: _____ Raça _____

Salvador _____ / _____ / _____

Ass: _____

Anexo 1: Protocolo nº 05/2015 da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia aprovou, na reunião de 31 de março de 2015, o parecer referente ao protocolo nº. 05/2015 e certifica que o projeto de ensino intitulado "Avaliação dos níveis de androstenediona e estrona no tecido subcutâneo de cadelas com carcinoma em tumor misto benigno e a influência de suplementação com ômega 3 na taxa de sobrevivência", coordenado pela Profa. Alessandra Estrela da Silva Lima, está de acordo com os princípios de ética e bem-estar animal.

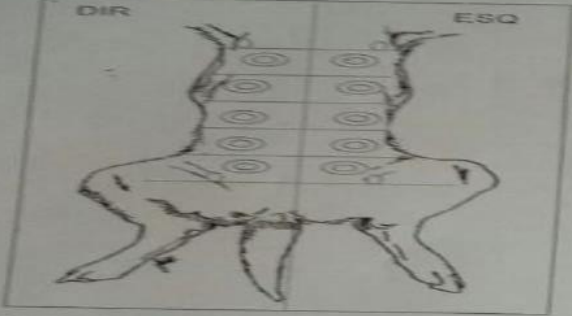
Salvador, 07 de abril de 2015.



Lúcio Leppoldo de Aragão da Silva
Coordenador CEUA/MEVZ-UFBA

Anexo 2: Ficha oncológica adaptada de Ferreira et al., 2003

Mamas acomodadas (Esquema)



DIR ESQ

Exames solicitados:

Marcar com um X o tamanho correspondente:

M1D - <= 3cm <input type="checkbox"/> ; >3-5cm <input type="checkbox"/> ; >5cm <input type="checkbox"/>	M1E - <= 3cm <input type="checkbox"/> ; >3-5cm <input type="checkbox"/> ; >5cm <input type="checkbox"/>
M2D - <= 3cm <input type="checkbox"/> ; >3-5cm <input type="checkbox"/> ; >5cm <input type="checkbox"/>	M2E - <= 3cm <input type="checkbox"/> ; >3-5cm <input type="checkbox"/> ; >5cm <input type="checkbox"/>
M3D - <= 3cm <input type="checkbox"/> ; >3-5cm <input type="checkbox"/> ; >5cm <input type="checkbox"/>	M3E - <= 3cm <input type="checkbox"/> ; >3-5cm <input type="checkbox"/> ; >5cm <input type="checkbox"/>
M4D - <= 3cm <input type="checkbox"/> ; >3-5cm <input type="checkbox"/> ; >5cm <input type="checkbox"/>	M4E - <= 3cm <input type="checkbox"/> ; >3-5cm <input type="checkbox"/> ; >5cm <input type="checkbox"/>
M5D - <= 3cm <input type="checkbox"/> ; >3-5cm <input type="checkbox"/> ; >5cm <input type="checkbox"/>	M5E - <= 3cm <input type="checkbox"/> ; >3-5cm <input type="checkbox"/> ; >5cm <input type="checkbox"/>

Outro local: _____

Consistência: _____

Secreção Sim Não _____

Edema de membros: Sim Qual(is)? _____

Linfonodos infartados: Sim Qual(is)? _____

Veterinário resp: _____ Data: _____

**FICHA CLÍNICA DE ACOMPANHAMENTO DE CADELAS COM NEOPLASIAS
MAMÁRIAS**

RG: _____ RG projeto: _____ Data: _____
 Histo: _____ Cito: _____ Ralo-X: _____
 Proprietário: _____ Telefone: _____
 Endereço: _____
 Nome: _____ Espécie: _____ Raça: _____
 Sexo: Macho Fêmea Pelagem: _____ Cor: _____
 Idade: _____ Porte: Pequeno (até 35cm) Peso: _____
 FC: _____ FR: _____ Médio (36-46cm) Condição corporal: Magro
 Mucosas: _____ TPC: _____ Grande (acima 46cm) Normal
 Alimentação: Ração Comida caseira Ração + Comida caseira Obeso
 Ambiente: _____
 Antecedentes genéticos: _____
 Vacinação: Anti-rábica Sim Não Quando/Qual: _____
 Outras Sim Não Quando/Qual: _____
 Vermifugação: Sim Não Quando/Qual: _____
 Doenças anteriores e atuais: _____

 Tomando medicamento: Sim Não Qual/Tempo: _____
 Anticoncepcional: Sim Não Quanto/Qual: _____ Última data: _____
 Cio Regular: Sim Não Último (data): _____
 Castrada: Sim Não Idade: _____
 Pseudo-gestação: Regulares Intermitentes Não
 Partos: Sim Não Quantos: _____ Último: _____
 Aborto: Sim Não Quantos: _____ Último: _____
 Já cruzou e não emprenhou: Sim Não
 Secreção vaginal: Sim Não Quando/Intensidade: _____
 Características do(s) tumor(s):
 Inteira Ulcerada Cística

Anexo 3: Ficha de Anamnese dietética Nestlé Purina®

FICHA DE ANAMNESE DIETÉTICA

Paciente: _____ Peso: _____

Raça: _____ Porte: _____

Castrado (sim ou não): _____ Idade: _____ ECC: _____

Anamnese dietética

1 - Alimento habitual: comercial alimento caseiro

2 - Alimento seco: sim não

Marca: _____ Quantidade: _____/dia Frequência: _____

3 - Alimento úmido: sim não

4 - Alimento caseiro: sim não

Ingredientes: _____

5 - Petisco: sim não

Marca: _____ Quantidade: /dia Frequência: refeições

6 - Restos de alimentos: sim não Descrição/frequência:

7 - Apetite: Disorexia Normofagia Polifagia

8 - Onde o seu animal de estimação permanece a maior parte do tempo:

9 - A preparação do alimento é realizada na presença de animal de estimação: _____

10 - É permitido que seu animal permaneça presente durante as refeições da família:

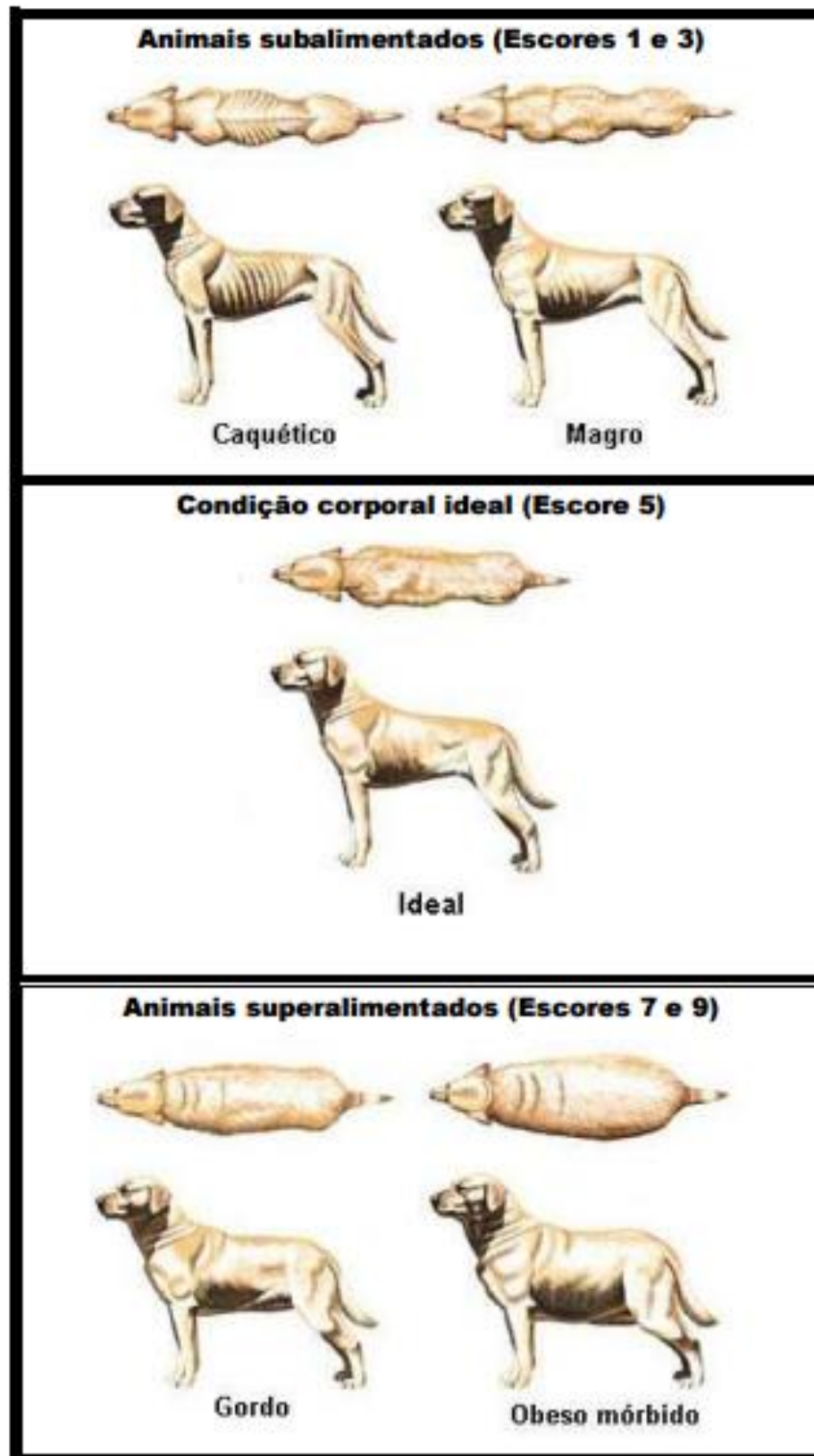
11 - Há outros animais na casa? _____. Há idoso/criança _____

12 - Seu animal de estimação realiza alguma atividade física: _____ Qual?

13 - Frequência: _____ tempo/dia _____

Outras informações: _____

Anexo 4: Escore de Condição Corporal de acordo com Laflamme, 1997



Anexo 5: Laudo de análise do ômega 3, Inovet

26/07 4002/17
090.485 4003/17

Catalent®

DEPARTAMENTO DE CONTROLE DA QUALIDADE			
LAUDO DE ANÁLISE			
PRODUTO:			
ÓLEO DE PEIXE 500 MG			
LOTE CATALENT:	ESPECIFICAÇÃO:	FABRICAÇÃO:	VALIDADE:
17030348	05.0551.0001	03/2017	03/2020
LOTE CLIENTE:	CLIENTE:	QUANTIDADE:	
---	INOVET	152.000 CÁPSULAS	

Ensaio	Especificação	Resultados
1. DESCRIÇÃO	Líquido oleoso amarelo claro ou amarelo, com odor característico, isento de material estranho, contido em Cápsula Gelatinosa Mole incolor, no formato oval.	De acordo
2. PESO MÉDIO	500 mg/cápsula ± 7,5% ou 463 a 538 mg/cáps.	493 mg/cápsula
3. DESINTEGRAÇÃO (água/37°C)	Máximo 30 minutos.	06 minutos
4. COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS	EPA: 90,0 mg/cápsula (mínimo 85,5 mg/cáps). DHA: 60,0 mg/cápsula (mínimo 57,0 mg/cps). Total de Ômega: 150,0 mg/cápsula (mínimo 142,5 mg/cápsula).	99,5 mg/cápsula 70,5 mg/cápsula 180,3 mg/cápsula
5. ARSÊNIO	Máximo 0,10 ppm	< 0,10 ppm
6. CHUMBO	Máximo 0,10 ppm	< 0,10 ppm
7. MERCÚRIO	Máximo 0,10 ppm	< 0,10 ppm
8. ANISIDINA	Máximo 30,0	6,1
9. ÍNDICE DE PERÓXIDO	Máximo 10,0 mEq/Kg	1,6 mEq/Kg
10. TEOR	Acetato de Racealfatocoferol: 0,500 mg/caps Equivalente a Vitamina E: 0,335 mg/caps (80 a 120%); de 0,268 a 0,402 mg/caps	0,330 mg/cáps
11. CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS	Máximo 1000 UFC/g.	< 10 UFC/g
12. CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS	Máximo 100 UFC/g.	< 10 UFC/g
13. PESQUISA DE PATÓGENOS		
<i>E. coli</i>	Ausência em 1 g.	Ausente
<i>(Pseudomonas aeruginosa)</i>	Ausência em 1 g.	Ausente
<i>(Staphylococcus aureus)</i>	Ausência em 1 g.	Ausente
<i>(Salmonella sp)</i>	Ausência em 10 g.	Ausente
CONDIÇÕES E CUIDADOS DE ARMAZENAMENTO	Armazenar em temperatura máxima de 25°C e umidade relativa máxima de 65%. Manter na embalagem por no máximo 30 dias	

CÓPIA INFORMATIVA

Av. José Vieira, 446 Distrito Industrial Indaiatuba SP CEP 13347 360 19 3936 9199 www.catalent.com

Anexo 6: Formulário de autorização de necropsia

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA
HOSPITAL DE MEDICINA VETERINÁRIA

500

TERMO DE DOAÇÃO

Pelo presente termo eu,.....

R.G.nº,C.P.F.nº

endereço.....

faço doação a este Hospital Veterinário

de:.....raça.....sexo.....pelagem.....idade

.....para que esta Instituição utilize-o do modo que lhe aprouver, como seja:
mantê-lo vivo para estudos, sacrificá-lo, inclusive doá-lo a pessoas ou Instituições.

Motivo da doação:

.....
.....
.....
.....

Salvador,de.....de 200...

Assinatura do doador

OBS: Anexar o Atestado de saúde animal, emitido pelo Médico Veterinário.

**PERFIL LIPÍDICO E METABÓLICO DE CADELAS COM CARCINOMA
MAMÁRIO SUPLEMENTADAS COM ÓLEO DE PEIXE
LIPIDIC AND METABOLIC PROFILE IN FEMALE DOGS WITH
MAMMARY CARCINOMA AND SUPPLEMENTED WITH FISH OIL**

Keidylania da Costa Santos⁴, Ricardo W.D. Portela², Karine Araújo Damasceno³,
Alessandra E. S. Lima¹

¹Departamento de Anatomia, Patologia e Clínicas, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Pós-Graduação em Ciência Animal dos Trópicos. Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

² Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil, 40110-100.

³ Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX)- Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brasil.

⁴ Instituto Federal do Sertão Pernambucano (IF - Sertão) – Santa Maria da Boa Vista, Pernambuco, Brasil.

ABSTRACT.- Santos K.C., Portela R.W.D.P., Damasceno, K.A., Estrela-Lima, A.S. 2017. [**lipidic and metabolic profile in female dogs with mammary carcinoma and supplemented with fish oil.**] Perfil lipídico e metabólico de cadelas com carcinoma mamário suplementadas com óleo de peixe. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Universidade Federal da Bahia. Avenida Adhemar de Barros, s/n, Ondina, CEP 40170110. Bahia – Brazil. E-mail: alestrela@gmail.com

Studies have shown that elements obesity-related, as example of excess of cholesterol, induce angiogenesis and accelerate the development and the *in vivo* growth of breast tumors. In this context, the objective of this study was to trace the lipid and metabolic profile of female dogs with mammary and compare the results with body condition, malignancy, obesity and reproductive status, besides studying the effect of omega-3 supplementation as a supporting treatment in female dogs with mammary carcinoma. Pre- and post-mastectomy peripheral blood sampling was performed to evaluate total cholesterol, HDL-cholesterol, VLDL, LDL and triglycerides, as well as lactate, calcium, glucose, albumin, total protein and globulin of female canine (n=46). After 15 days of the surgery, 7 female dogs were selected to supplementation with omega

3 at 90%, followed by omega 3 at 60% for 30 days. The lipid and metabolic profile was evaluated at the beginning, middle (30th day) and end (60th day) of the supplementation period. There was greater involvement of Poodle dogs 26.09% (12/46). The female dogs presented predominantly score 4 (45.65%), body mass index above the reference value (45.65%) and 39.13% of female dogs presented body fat percentage within the standard. There was a significant difference in the mean values of triglyceride levels ($p = 0.0363$) and VLDL ($p = 0.0181$). The concentration of albumin and lactate were higher in female dogs with a more aggressive histological type (CTM pre = 2.685; post = 2.53, pre-Ca = 2.85; post = 2.75). There was no change in the lipidic profile after supplementation with fish oil at any concentration. However, it was observed changes in glucose ($p = 0.0067$), total protein ($p = 0.0002$) and globulin ($p = 0.0002$) when fish oil with 90% of omega-3 was used as supplementation. Obese female dogs present altered lipidic profile and more aggressive tumors (Ca), suggesting a relationship between tumor aggressiveness and lipidic and metabolic profile.

INDEX TERMS: mammary neoplasia, obesity, fish oil, lipids.

RESUMO: Estudos demonstraram que elementos relacionados à obesidade, como exemplo de excesso de colesterol, induzem angiogênese e aceleram o desenvolvimento e o crescimento *in vivo* de tumores mamários. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi traçar o perfil lipídico e metabólico das fêmeas com neoformações mamárias e comparar os resultados com a condição corporal, malignidade, obesidade e status reprodutivo, além de estudar o efeito da suplementação de omega-3 como um tratamento complementar em cadelas com carcinoma mamário.

A amostragem de sangue periférico pré e pós-mastectomia foi colhida para avaliação de colesterol total, HDL-colesterol, VLDL, LDL e triglicérides, bem como lactato, cálcio, glicose, albumina, proteína total e globulina. Após 15 dias da cirurgia, 7 fêmeas foram selecionadas para suplementação com ômega 3 a 90%, seguido de ômega 3 a 60% durante 30 dias. O perfil lipídico e metabólico foi avaliado no início, meio (30º dia) e final (60º dia) do período de suplementação.

Houve maior envolvimento de cães da raça poodle 26,09% (12/46). As fêmeas apresentaram predominantemente escore corporal 4 (45,65%), índice de massa corporal acima do valor de referência (45,65%) e 39,13% das fêmeas apresentaram porcentagem

de gordura corporal dentro do padrão. Houve diferença significativa nos valores médios dos níveis de triglicerídeos ($p = 0,0363$) e VLDL ($p = 0,0181$). A concentração de albumina e lactato foi maior em cães fêmeas com tipo histológico mais agressivo (CTM pré = 2.685; pós = 2.53, pré-Ca = 2.85; pós = 2,75). Não houve alteração no perfil lipídico após suplementação com óleo de peixe em qualquer concentração. No entanto, observou-se alterações na glicose ($p = 0,0067$), proteína total ($p = 0,0002$) e globulina ($p = 0,0002$) quando o óleo de peixe com 90% de omega-3 foi utilizado como suplementação.

As cadelas obesas apresentam perfil lipídico alterado e tumores mais agressivos (Ca), sugerindo uma relação entre agressividade tumoral e perfil lipídico e metabólico.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: neoplasias mamárias, obesidade, óleo de peixe, lipídios

INTRODUÇÃO

Os tumores mamários são frequentes na clínica de pequenos animais e acometem cadelas de meia idade a idosas, castradas ou inteiras, sem predisposição racial (CASSALI, 2014). Possuem etiologia multifatorial, com participação de fatores genéticos, ambientais e hormonais (SILVA et al. 2004). Dentre os fatores ambientais, destaca-se a nutrição representada por dietas desbalanceadas que culminam com a obesidade (FELICIANO et al. 2012).

A obesidade está relacionada ao surgimento de diferentes neoplasias em humanos, a exemplo das neoplasias do trato digestivo, tais como esôfago, estômago, fígado, vesícula biliar, pâncreas, cólon e reto. Além das neoplasias hormônio-dependentes, tais como mama, endométrio, colo uterino e ovários (CALLE et al. 2003; LARSSON; WOLK, 2007; KAIDAR-PERSON et al. 2011).

Dentre os possíveis mecanismos que ligam a obesidade a carcinogênese, destaca-se o metabolismo dos hormônios sexuais, desregulação da sinalização da insulina, que leva ao desequilíbrio na proliferação celular, diferenciação e apoptose e expressão alterada de adipocinas (DJURIC, 2016). Além disso já tem sido sugerida a participação das dislipidemias, co-morbidade associada ao excesso de peso como fator de risco para o desenvolvimento de neoplasias (GERMAN, 2006; GERMAN; HONDEN; MORRIS, 2010; LEKCHAROENSUK et al. 2000).

Estudos com roedores demonstraram que a hipercolesterolemia induz a formação de tumores mais agressivos de evolução rápida, menor apoptose e maior atividade

angiogênica, e maior predisposição para desenvolver metástases (LLAVERIAS, 2011; TORRES, NORONHA, CASELLA, 2013). Em adição, o colesterol LDL e o VLDL se apresentam significativamente elevados em mulheres com câncer de mama. Em 2017, Lu et al. verificaram que subfrações de LDL e VLDL aumentaram a tumorigênese de células neoplásicas da linhagem MCF7 e MDA-MB-231 *in vitro*.

Uma forma de controlar a hiperlipidemia em humanos consiste na suplementação com ácidos graxos polinsaturados (BORGES, 2013; SELTING et al. 2014). Essa suplementação, de acordo com pesquisas *in vitro*, é capaz de inibir a carcinogênese ao retardar o crescimento de células tumorais de mama, útero, bexiga, neuroblastoma, glioblastoma, além de aumentar a eficácia de drogas quimioterápicas (BIONDO et al. 2008; CARMO, CORREIA, 2008).

Mesmo diante das afirmações que demonstram a relevância das dislipidemias no comportamento das neoplasias mamárias, pesquisas relacionando a obesidade e alterações no perfil lipídico ao desenvolvimento de tumores mamários caninos são escassas. Por tais motivos, objetivou-se com esse estudo traçar o perfil lipídico de cadelas portadoras de carcinoma mamário, comparar com o status reprodutivo e tipo histológico do tumor e avaliar o efeito da suplementação com óleo de peixe sobre o perfil lipídico e sobrevida.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais. Foram selecionadas 46 cadelas de diferentes raças, com idade variando de seis a 18 anos e média de 9,7 anos de idade, e diagnóstico de carcinoma mamário, atendidas no Hospital de Medicina Veterinária Professor Renato Rodenburg de Medeiros Netto, no período de abril de 2015 a agosto de 2016. As cadelas foram divididas de acordo com o tipo histológico em cadelas com carcinoma em Tumor Misto (CTM) e demais carcinomas (Ca). Todos os animais foram acompanhados por um período mínimo de um ano.

Animais elegíveis para o presente estudo não fizeram uso prévio (mínimo de trinta dias antes da cirurgia) de fármacos antineoplásicos, suplementação com óleo de peixe ou não apresentaram histórico de endocrinopatia.

Avaliação clínica. As cadelas com lesão mamária foram submetidas ao exame físico geral e específico. Os exames consistiram na avaliação da condição clínica geral, coleta de informações sobre o histórico clínico (período de desenvolvimento e evolução das lesões) e ciclo reprodutivo (ciclo estral regular, castração, histórico de pseudociese e aplicação de progestágenos). Todas as informações foram transcritas para uma ficha oncológica específica segundo o protocolo modificado de Ferreira et al. (2003). Foram realizados hemograma e exames de bioquímica sérica (alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, creatinina, ureia, glicose e cálcio, seguindo os valores de referência de Thrall, 2007), além de exames de imagem (radiografia simples de tórax em três incidências látero-lateral direita, látero-lateral esquerda e ventro-dorsal) para pesquisa de metástase pulmonar e ultrassonografia de abdômen total. Também foi realizado eletrocardiograma e ecocardiograma.

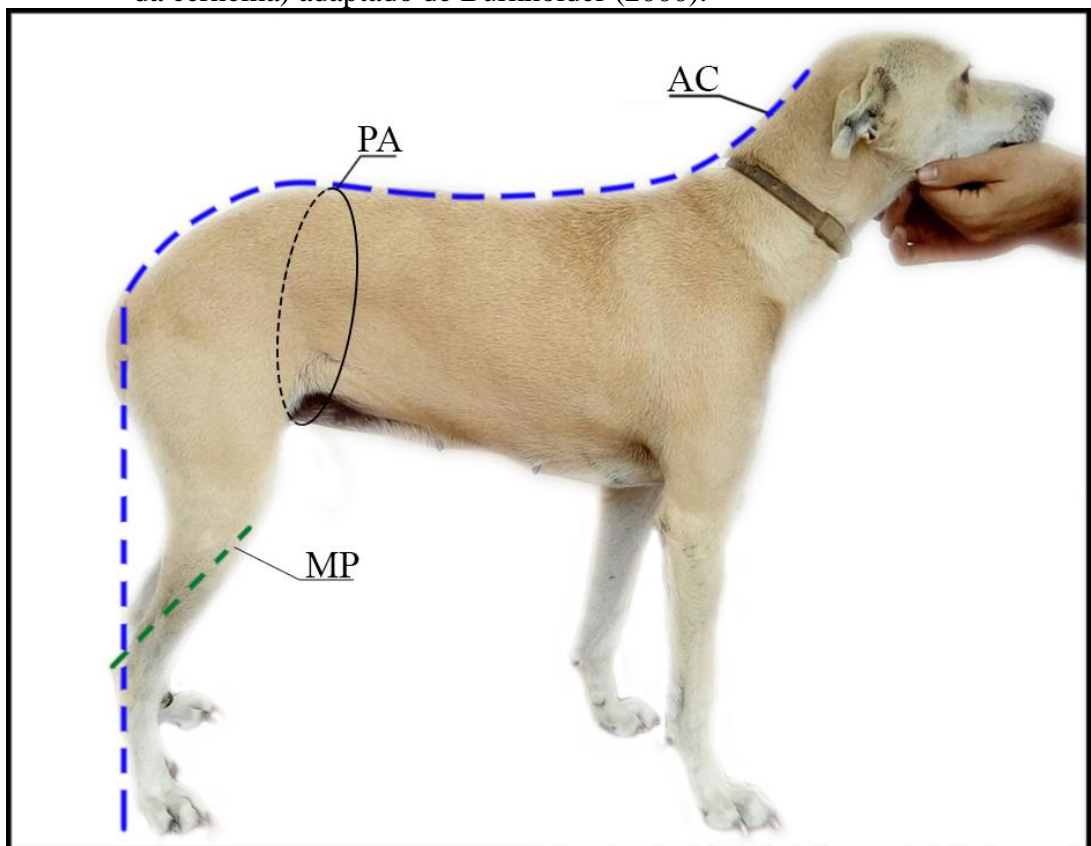
Cirurgia. Após a avaliação do risco cirúrgico, os animais foram submetidos a cirurgia. A abordagem cirúrgica foi a mastectomia radical unilateral e gonadectomia em cadelas não castradas. As cadelas foram monitoradas durante o período pós-cirúrgico com utilização de bandagem compressiva e no décimo quinto dia foi realizada a retirada de suturas e colheita de sangue periférico mediante jejum alimentar de 12 horas para avaliação do perfil lipídico pós-operatório.

Procedimento histopatológico. A cadeia mamária retirada no momento da cirurgia foi fixada em formol neutro e tamponado com fosfato a 10% e processada pela técnica rotineira de inclusão em parafina (PROPHET; MILLS; ARRINGTON, 1992). As secções histológicas de 4µm foram coradas pelas técnicas da Hematoxilina-Eosina (LUNA, 1968) para posterior classificação e graduação histopatológica.

Determinação de condição corporal. Visando agrupar os animais segundo a sua condição corporal em cadelas com peso adequado ou acima do peso, foi realizada a avaliação da condição corporal, baseada em quatro métodos: Escore de Condição Corporal (ECC), de acordo com Laflamme (1997); Índice de Massa Corporal Canino (IMCc), que seguiu recomendações de Muller et al. (2008); Medição Morfométrica (MM) (**Figura 1**) e Porcentagem de Gordura Corporal (%GC), proposta por Burkholder (2000). Os valores da medição foram inseridos na equação $\% GC \text{ em cadelas} = - 1,7 (\text{MP cm}) + 0,93 (\text{PA cm}) + 5$ para determinação da % de gordura corporal, na qual % GC significa porcentagem de gordura corporal, MP indica a longitude do membro posterior direito

desde a tuberosidade calcânea até a metade do ligamento patelar e PA significa perímetro do abdome.

Figura 1: As medidas morfométricas canina foram obtidas utilizando fita métrica. Para a estatura, a medida foi desde a articulação atlanto-occipital até a região posterior aos membros posteriores, passando e apoiando a fita sobre a última vértebra sacral, ficando a fita exatamente sobre o dorso do animal. (PA - Perímetro do abdome; MP - Comprimento do membro posterior e AC - Altura da cernelha) adaptado de Burkholder (2000).



Obtenção do sangue periférico. Para a avaliação do perfil lipídico, metabólico e hormonal, o sangue foi colhido em seringas descartáveis estéreis de 5mL, por meio da venopunção jugular e transferido para tubos estéreis bioquímicos mantido a temperatura ambiente. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 3000 rotações por minuto por 10 minutos para obtenção do soro, que foi armazenado e refrigerado para posterior processamento.

Avaliação do perfil lipídico sérico. A colheita de sangue para realização do perfil lipídico foi realizada dois dias antes da mastectomia, 15 dias após a mastectomia e 30 e 60 dias após a suplementação com óleo de peixe (ômega 3). Foram utilizados kits bioquímicos comerciais para a determinação do colesterol total, triglicérides, colesterol HDL e magnésio (Labtest®). Todas as colheitas foram realizadas após jejum de 12 horas. Os valores do colesterol VLDL e LDL foram obtidos por meio do resultado da Fórmula de Friedwald, sendo os valores expressos em mg/dL (FISCHBACH, 2002; SCHMIDT et al. 2004). Os valores de referência seguiram descrição de Kaneko, 1997; Meyer, Harvey, 2004; Thrall, 2007, sendo colesterol total 135 – 270 mg/dL; colesterol HDL 60.0 – 140.0 mg/dL; colesterol LDL 34.0 – 115.0 mg/dL; colesterol VLDL até 25.0 mg/dL e triglicérides 20 – 112 mg/dL.

Avaliação do perfil metabólico. Foi denominado perfil metabólico a avaliação sérica de glicose, cálcio, albumina, lactato e proteínas totais. A avaliação de patologia clínica foi realizada por meio de colheita de sangue periférico e realização de kits bioquímicos comerciais, tais como glicose, cálcio, albumina, lactato e proteínas totais (Labtest®). A globulina foi calculada por meio da fórmula Proteínas totais – albumina = globulinas. Os valores de referência seguiram descrição de Kaneko, 1997; Meyer, Harvey, 2004; Thrall, 2007, sendo glicose 70 - 110 mg/dL, proteína total 5.4 - 7.10 g/dL, albumina 2.6 - 3.3 g/dL, globulina 2.7 - 4.4 g/dL e lactato 45 - 233 U/L.

Suplementação com óleo de peixe (ômega 3). Após quinze dias do procedimento cirúrgico, sete cadelas ingeriram junto à refeição uma cápsula de óleo de peixe (Inovet®) administrada para cada 10 kg de peso vivo. No óleo de peixe 500mg, 90% e 60% da composição era ômega 3, e desta concentração, 60% EPA e 40% DHA. No primeiro mês a suplementação foi realizada com óleo de peixe (ômega 3 90%) e no segundo mês a suplementação foi realizada com óleo de peixe (ômega 3 60%), de acordo com recomendação do fabricante, com colheita de sangue no início, 30 dias e 60 dias após início do tratamento. Foi recomendada a conservação do frasco contendo ômega 3 em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As cadelas apresentavam os diagnósticos histopatológicos CTM (n=3) e Ca (n= 4).

Acompanhamento e sobrevida. Recomendou-se a realização de exames radiológicos a cada 60 dias, exames laboratoriais (hemograma, bioquímico – ureia,

creatinina, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina) e clínicos mensalmente até 12 meses após a cirurgia como período de acompanhamento, no qual foram coletados dados a respeito da sobrevida global. O tempo de sobrevida global foi definida (em dias) como sendo o período entre a exérese cirúrgica do tumor primário e a data de óbito pela doença.

Os animais que evoluíram para o óbito foram submetidos a necropsia para determinação da *causa mortis* e detecção de possíveis metástases.

Análise estatística. A análise do perfil lipídico e metabólico foi realizada em duas fases. Na primeira fase as análises foram realizadas utilizando o procedimento GLINMIX do SAS (versão 9.2), sendo castração, tipo histológico e a interação entre estes considerados fixos no modelo estatístico. Foram testadas as seguintes distribuições de probabilidade contínua em cada variável: exponencial, log-normal, Gamma, Weibull, distribuição t, inversa gaussiana e normal. Os critérios para obtenção do melhor ajuste relativo à estas distribuições foram o critério de máxima verossimilhança e a relação entre Chi-quadrado e graus liberdade, que foram melhores quanto maior a proximidade de 1. Para comparação entre as médias de máxima verossimilhança o valor de p de cada comparação foi conclusivo. Todas as análises foram conduzidas utilizando 0.05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I.

A avaliação do perfil lipídico e metabólico durante e após a suplementação com óleo de peixe foi analisada utilizando o procedimento GLINMIX do SAS (versão 9.2), sendo a suplementação com óleo de peixe considerada efeito fixo no modelo estatístico. Nesta etapa foram realizados dois contrastes ortogonais: 1º) Pré x 60: médias de máxima verossimilhança comparadas antes da suplementação e após 30 dias de suplementação com óleo de peixe composto por 60% de ômega 3; 2º) Pré x 90: médias de máxima verossimilhança comparadas antes da suplementação e após 30 dias de suplementação com óleo de peixe composto por 90% de Ômega 3.

As curvas de sobrevida foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox) ou Cox na análise univariada ou multivariada, respectivamente. Em todos os casos, valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises de sobrevida foram realizadas utilizando o softwares Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS

Fatores clínicos, reprodutivos e patológicos

A idade das cadelas estudadas variou de seis a 18 anos, sendo de 9,76 anos a média de idade de acometimento por carcinomas mamários. Houve um maior envolvimento de cães da raça Poodle 26,09% (12/46), seguida por cães Sem Raça Definida (SRD) 21,74% (10/46) e Pinscher 13,04% (6/46). As demais raças totalizaram 39,13% (18/46).

A respeito das características reprodutivas, do total de animais, 11 (23,91%) cadelas tinham sido castradas antes da presença do nódulo e 35 (76,08%) cadelas não eram castradas. Notou-se ainda que cinco cadelas (10,86%) tinham sido medicadas com contraceptivos injetáveis e 18 (39,13%) cadelas apresentaram pseudociese em algum momento da vida.

Com relação as dimensões, 15 (32,6%) cadelas possuíam tumor maior que cinco centímetros, 11 (23,91%) cadelas apresentaram nódulo com tamanho entre 3 e 5 cm e 20 (42,47%) cadelas apresentaram nódulos abaixo de 3 cm de diâmetro.

Neste estudo foram registradas 28 cadelas diagnosticadas com CTM e 18 cadelas com outros carcinomas (Ca), conforme demonstrado na **Quadro 1**.

Quadro 1: Distribuição dos animais de acordo com os tipos histológicos.

CTM (n = 28)		Grau I (n = 25)	Estadio I (n = 10)
			Estadio II (n = 7)
			Estadio III (n = 7)
			Estadio IV (n = 1)
		Grau II (n = 3)	Estadio III (n = 2)
			Estadio IV (n = 1)
Ca (n = 18)	Carcinoma tubular (n = 8)	Grau I (n = 7)	Estadio I (n = 6)
			Estadio II (n = 1)
		Grau II (n = 1)	Estadio III (n = 1)
	Carcinoma papilar (n = 6)	Grau I (n = 3)	Não invasor (n = 1)
			Estádio II (n = 2)
		Grau 2 (n = 3)	Estadio II (n = 3)
	Carcinoma sólido (n = 4)	Grau I (n = 3)	Estadio I (n = 1)
			Estadio II (n = 2)
		Estadio III (n = 3)	
	Grau III (n = 1)	Estadio IV (n = 1)	

Parâmetros corporais das cadelas com neoplasias mamárias

Considerando ser pertinente a comparação entre os métodos de aferição da condição corporal dos cães, utilizou-se o escore de condição corporal (LAFLAMME, 1997); índice de massa corporal canina (MÜLLER, 2008); medidas morfométricas (BURKHOLDER; TOLL, 1997) e gordura corporal canina (BURKHOLDER, 2000). Os resultados indicaram correlação significativa entre o peso e Índice de massa corporal canina ($r = 0,70$; $p < 0,001$), baixa correlação entre gordura corporal e IMCc ($r = 0,45$; $p = 0,002$), baixa correlação entre ECC e IMCc ($r = 0,42$; $p = 0,004$) e moderada correlação entre ECC e gordura corporal ($r = 0,57$; $p < 0,001$).

Com relação ao escore corporal das cadelas com carcinoma mamário, uma cadela (2,22%) pertencia ao escore 3; 21 cadelas (45,65%) pertenciam ao escore 4; nove cadelas (20%) pertenciam ao escore 5; 11 cadelas (24,4%) pertenciam ao escore 6; uma cadela (2,22%) pertencia ao escore 7; 3 cadelas (6,66%) pertenciam ao escore 8.

Com relação ao IMCc e %GC se constatou que 15 (32,6%) cadelas estavam abaixo do IMCc, 10 (21,73%) cadelas estavam dentro do padrão e 21 (45,65%) cadelas estavam com IMCc acima do valor de referência. Quinze (32,6%) cadelas possuíam porcentagem de gordura corporal abaixo do valor de referência, 18 (39,13%) cadelas apresentavam %GC dentro do padrão e 13 (28,26%) cadelas estavam acima do valor padrão (**Quadro 2**).

Quadro 2: Agrupamento de cadelas de acordo com escore corporal, índice de massa corporal e porcentagem de gordura corporal.

	Abaixo	Normal	Acima
IMCc	15 (32.6%)	10 (21.73%)	21 (45.65%)
ECC	1 (2.22%)	30 (65.2%)	15 (32.6%)
%GC	15(32.6%)	18 (39.13%)	13 (28.26%)

Ao correlacionar o status reprodutivo com o status corpóreo foi possível observar diferenças significativas no IMCc ($t = 2,18$; $p = 0,035$) dos animais castrados ($16,32 \pm 4,79$) em comparação aos animais inteiros ($13,49 \pm 3,37$). A porcentagem de gordura corporal também apresentou diferença significativa ($t = 2,06$; $p = 0,045$) entre os grupos

castrados e inteiros, com valores superiores nos castrados ($25,09 \pm 11,09$) em comparação aos inteiros ($19,54 \pm 6,44$) e a variação peso ($t = 2,051$; $p = 0,046$) se apresentou maior nos castrados ($18,25 \pm 13,00$) em comparação ao grupo de cadelas inteiras ($11,62 \pm 7,89$).

Perfil lipídico das cadelas diagnosticadas com CTM e Ca

Não foi observada influência da interação entre o tipo histológico e presença do tumor na concentração de colesterol sérico das cadelas ($p = 0,577$). Ao analisar as variáveis, tipo histológico e presença do tumor, de forma isolada, não houve diferença significativa nos valores médios do nível de colesterol comparados ao tipo histológico ($p = 0,2003$); da mesma forma não foi observada diferença ao comparar os momentos pré e pós mastectomia com a concentração de colesterol total ($p = 0,4178$).

Houve diferença significativa nos valores médios dos níveis de triglicérides com relação ao tipo histológico ($p = 0,0363$). Cadelas com CTM (pré = 212,7; pós = 196,7) apresentaram valores médios menores que as cadelas com Ca (pré = 227,0; pós = 212,3). Entretanto, não foi observada diferença ao comparar a concentração de triglicérides antes ou depois da cirurgia ($p = 0,6841$). Não foi observada alteração significativa nas concentrações de triglicérides perante a interação do tipo histológico e presença do tumor ($p = 0,6418$).

A concentração de HDL ou LDL não variou entre os diferentes tipos histológicos ou após a exérese do tumor. Não houve alteração significativa nos níveis de VLDL ao analisar a relação entre tipo de tumor e presença do tumor ($p = 0,9626$). Entretanto, verificou-se que os tipos histológicos mais malignos (Ca) estavam associados à alta concentração de VLDL ($p = 0,0181$) (CTM pré = 10,98; pós = 12,46; Ca pré = 18,25; pós = 14,39). Não foi observada diferença da concentração na presença ou ausência do tumor ($p = 0,9196$) (**Quadro 3; Figura 2**).

Quadro 3. Médias de máxima verossimilhança para variáveis referentes as concentrações séricas avaliadas em cadelas levando em consideração os fatores: tipo de câncer, a presença/ausência do tumor e a interação dos mesmos, erro padrão da média (EPM) e *p*-valor fatores/interação.

	TIPO		MASTECTOMIA		EPM	<i>Valor de p</i>		
	CMT	Ca	PRÉ	POS		TIPO	MASTEC	TIPO*MASTEC
Colesterol	5.29	5.37	5.35	5.30	0.058	0.2003	0.4178	0.5766
Triglicérides	3.88	4.19	4.07	4.01	0.144	0.0363	0.6841	0.6418
HDL	3.49	3.71	3.39	3.81	0.251	0.3968	0.0995	0.7918
VLDL	2.27	2.66	2.46	2.48	0.159	0.0181	0.9196	0.9626
LDL	4.93	4.65	4.92	4.67	0.145	0.0603	0.1010	0.7159
Proteína	1.97	1.82	1.94	1.84	0.077	0.0517	0.1987	0.9483
Albumina	0.93	1.17	0.99	1.11	0.101	0.0188	0.2800	0.1207
Glicose	4.43	4.39	4.49	4.33	0.092	0.6901	0.0778	0.5528
Cálcio	2.21	2.27	2.21	2.27	0.057	0.2728	0.3307	0.1106
Lactato	3.77	4.18	3.88	4.07	0.179	0.0255	0.3068	0.5437

Onde CMT = Carcinoma em Tumor Misto e Ca = Demais carcinomas.

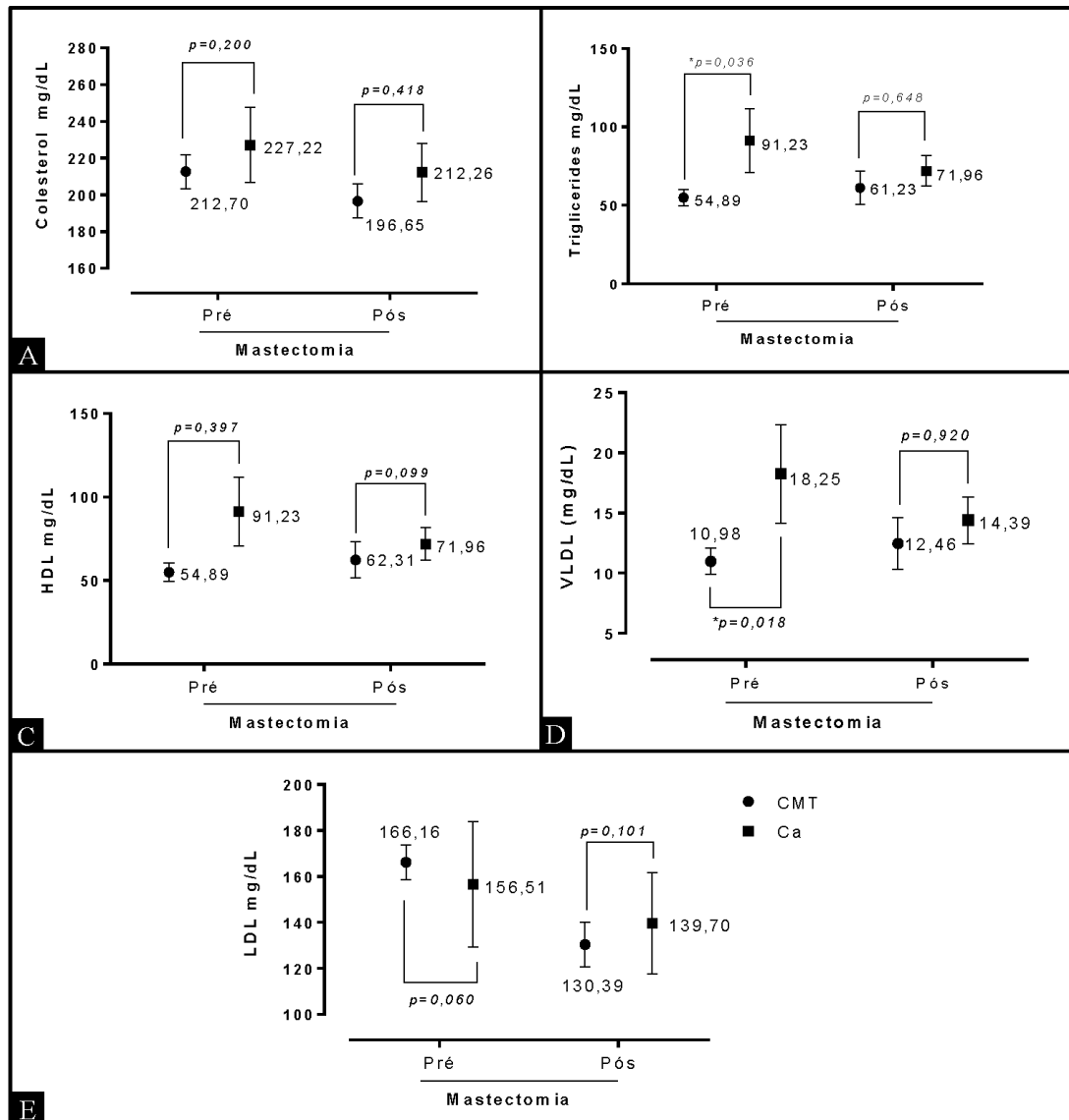
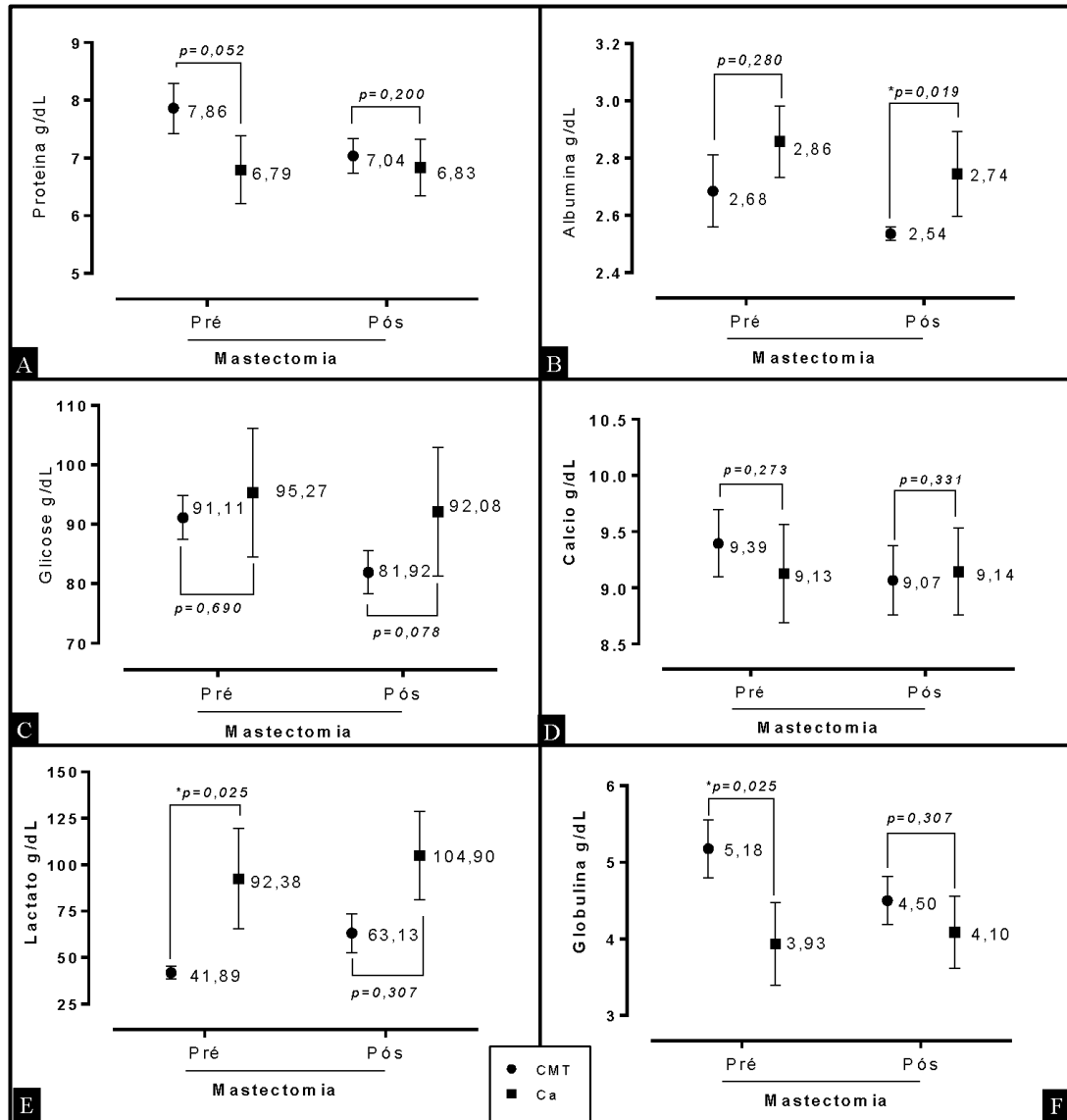


Figura 2: Representação gráfica do perfil lipídico de cadelas com Carcinoma mamário.

Perfil metabólico das cadelas diagnosticadas com CTM e Ca

As concentrações de proteína total, glicose e cálcio não demonstraram alterações nos diferentes tipos histológicos ou após a exérese do tumor ou ainda mediante a interação destes. Todavia a concentração de albumina e lactato foram maiores em cadelas com tipo histológico mais agressivo, sendo possível observar para o CTM pré = 2,685; pós = 2,53; Ca pré = 2,85; pós = 2,75, respectivamente (**Figura 3**).

Figura 3: Representação gráfica da concentração de proteína total, albumina, glicose, cálcio, lactato e globulina em cadelas com carcinoma mamário.



Perfil lipídico e metabólico mediante suplementação com ômega 3

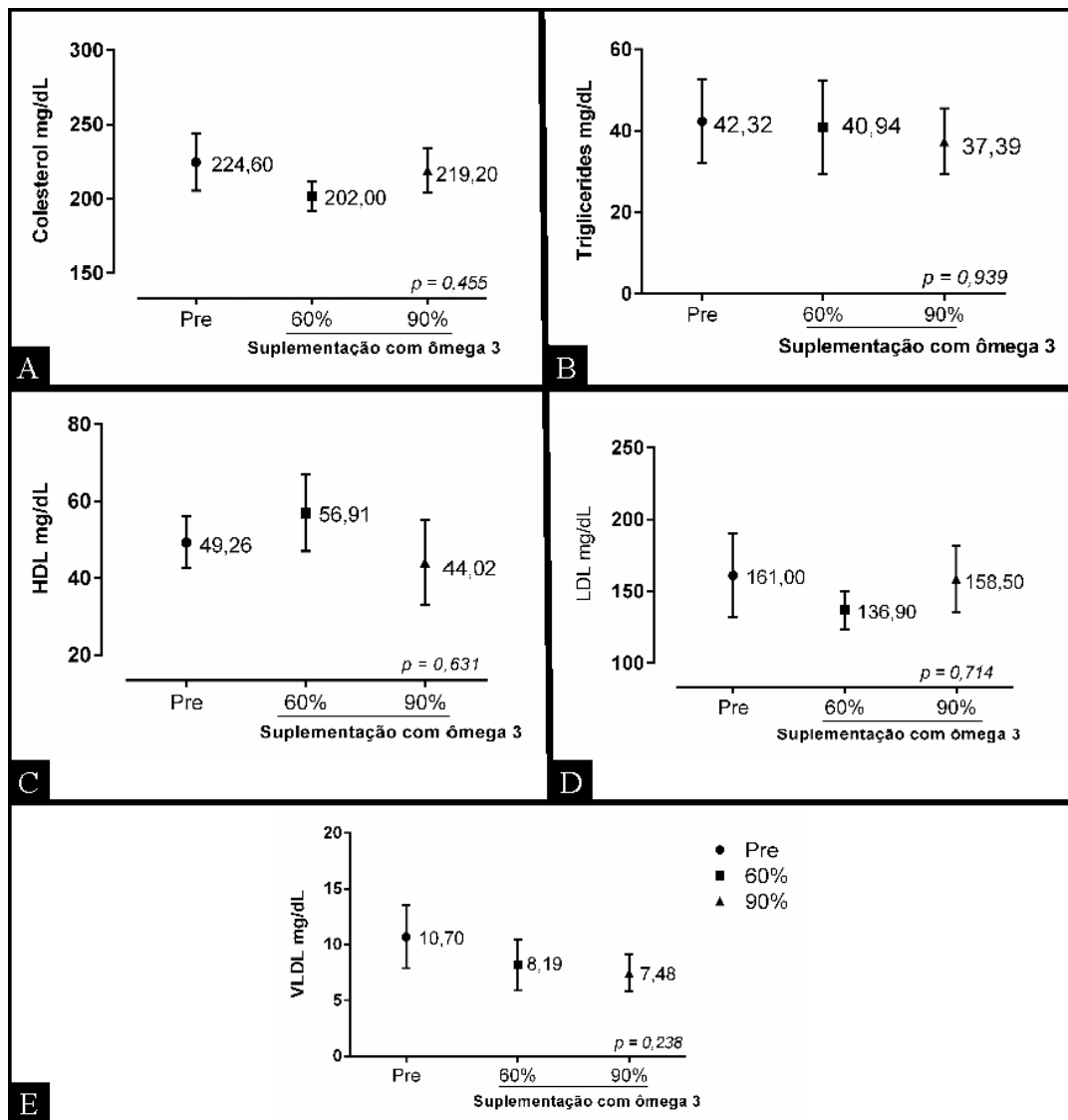
Não houve alteração no perfil lipídico após suplementação com óleo de peixe em nenhuma concentração. Ao avaliar o perfil metabólico, foi observada alteração na glicose, proteína e globulina quando utilizado óleo de peixe com 90% de ômega 3. Nas cadelas suplementadas com ômega 3 a 90%, observou-se altos índices glicêmicos (pré = 80,60; O-90% 107,4 $p = 0,0067$), redução nos níveis de globulina sérica (pré = 5,366; O-90%

3,52 p = 0,0002) e redução nos níveis de proteína sérica (pré = 8,133; O-90% = 6,44 p = 0,0002) em comparação ao momento pré-cirúrgico (**Figura 4**).

Quadro 4. Médias de máxima verossimilhança para variáveis referentes as diferentes concentrações de ômega 3, considerando erro padrão da média (EPM) e p-valor fatores/interação.

	Ômega III				Valor de p	
	Pre	60	90	EPM	Pré x 60	Pré x 90
Triglicérides	3,5404	3,4800	3,4573	0,279	0,8817	0,8772
Colesterol	5,3950	5,3008	5,3757	0,067	0,3348	0,7390
HDL	3,8330	3,9319	3,8341	0,189	0,7080	0,8407
LDL	4,9268	4,8881	5,0070	0,191	0,8843	0,6829
VLDL	2,1100	1,8704	1,8476	0,283	0,5574	0,6859
Glicose	4,3852	4,4847	4,6646	0,061	0,2658	0,0067
Albumina	0,9775	0,9543	1,0539	0,098	0,8699	0,4750
Proteína	2,0851	2,2081	1,8592	0,050	0,0989	0,0002
Cálcio	2,2121	2,1605	2,3364	0,065	0,5811	0,0753
Lactato	3,9954	3,9262	3,9324	0,147	0,7433	0,8764
Globulina	2,0851	2,2081	1,8592	0,050	0,0989	0,0002

Figura 4: Representação gráfica do perfil lipídico de cadelas com carcinoma mamário durante a suplementação com ômega 3 a 90% e 60%.

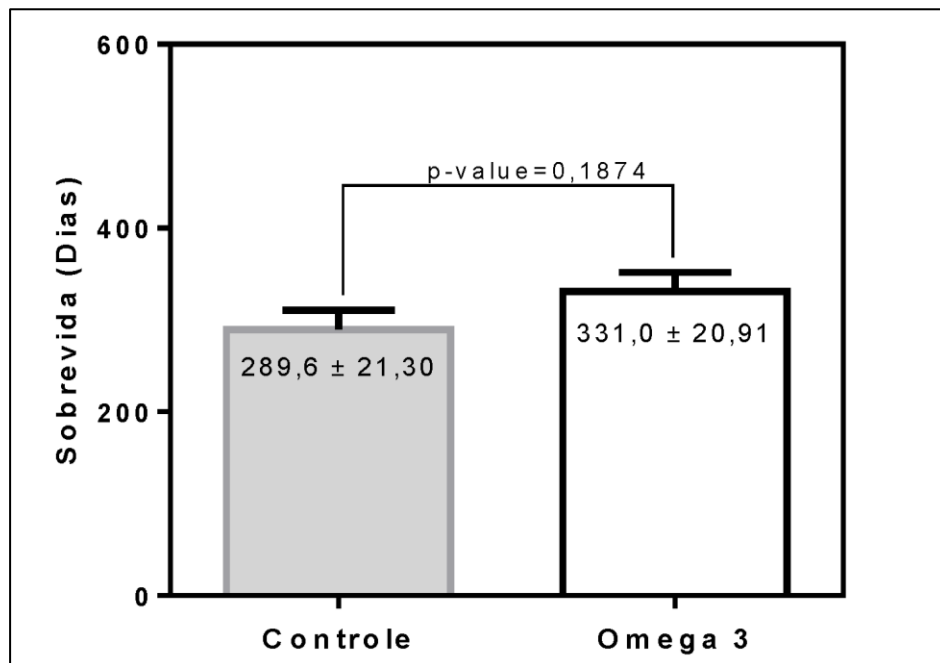


Sobrevida

O tempo mínimo de sobrevida foi de 97 dias atribuído ao animal do grupo Ca, que evoluiu para óbito por metástase pulmonar após a mastectomia e o máximo foi de 638 dias, após mastectomia, atribuído ao animal do grupo CTM.

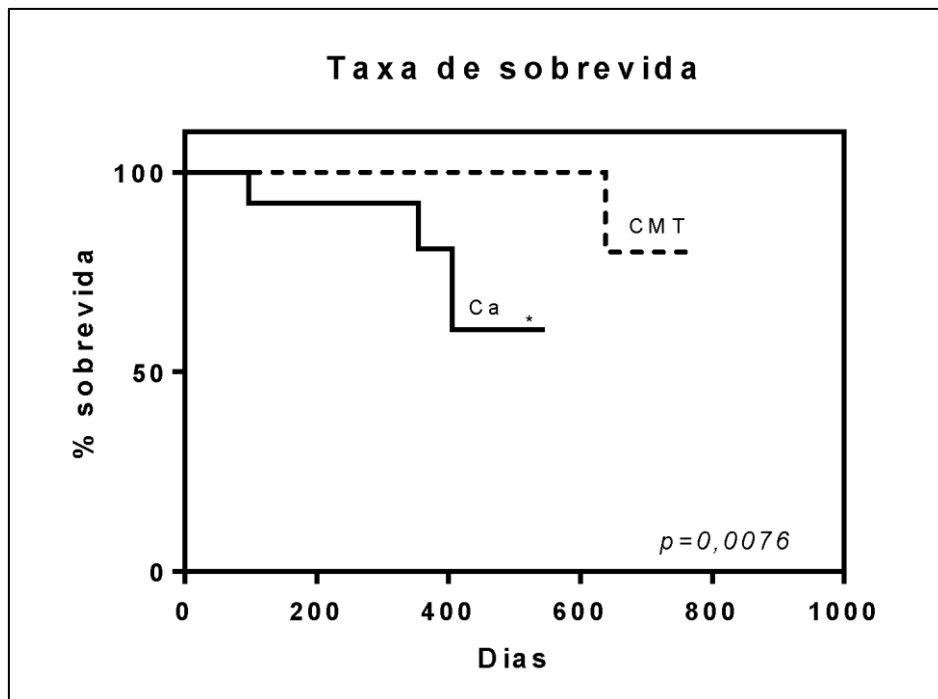
Com base na curva de sobrevida estratificada pelos grupos avaliados, observou-se valores significativos ($p = 0,0076$) para o grupo CTM em relação ao grupo Ca (**Figura 5**).

Figura 5. Curva de sobrevida dos grupos CTM e Ca. Diferenças significativas quando $p < 0,05$, sendo destacadas por *.



Com relação a taxa de sobrevida das cadelas que ingeriram óleo de peixe (ômega 3) ($331,0 \pm 20,91$) e aqueles animais que não fizeram uso do óleo de peixe (ômega 3) ($289,6 \pm 21,30$) foi observado apenas diferença numérica, visto que não houve diferença estatística (**Figura 6**).

Figura 6. Taxas de sobrevivência dos animais de acordo com a não realização do tratamento com ômega 3 (controle) ou tratadas (ômega 3 90% e 60%).



Diferenças significativas quando $p < 0,05$, sendo destacadas por *.

DISCUSSÃO

Fatores clínicos, reprodutivos e patológicos

Os resultados do presente estudo, assim como a maioria dos relatos anteriores, indicam maior acometimento de cadelas entre nove e 11 anos, com rara ocorrência em idades inferiores a dois anos (OLIVEIRA et al. 2003; PIRES et al. 2003; DE NARDI et al. 2007; FURIAN et al. 2007; RIBEIRO et al. 2009; CASSALI et al. 2014). O aumento da expectativa de vida dos animais de companhia acarreta maior exposição aos carcinógenos e maior probabilidade do organismo em acumular ou desenvolver mutações responsáveis pela multiplicação celular descontrolada e consequente neoplasia (RODASKI e PIEKARZ, 2009).

Semelhante aos achados de Toríbio et al. (2012), foi observado maior ocorrência de neofomações mamárias em cães da raça Poodle, seguida por animais sem raça definida. Segundo Hataka (2004) e Estrela-Lima (2010), a elevada frequência é reflexo da popularização da raça e a existência de diversas linhagens e misturas entre elas.

A grande ocorrência de tumores com dimensões maiores que 5 cm observadas neste estudo ainda é reflexo do diagnóstico tardio, conseqüente ao fato dos tutores demorarem para procurar a assistência médico veterinária. Ferreira et al. (2009) verificaram que a maioria das lesões tumorais acima de cinco centímetros (T3) é maligna e apresenta índice de proliferação mais elevado e menor positividade para receptores de progesterona (RP), indicando independência hormonal e maior agressividade quando comparados com tumores menores (T1 e T2). Contudo, cabe destacar que o tamanho *per si* não confirma malignidade sendo a avaliação histopatológica, ferramenta decisiva para o diagnóstico.

A maior prevalência de neofomações mamárias em cadelas não castradas é reflexo da influência dos hormônios sexuais na etiologia do câncer de mama (SILVA, 2004). O maior número de cadelas não castradas, associado ao fato de ainda ocorrer a aplicação de progestágenos pode evidenciar o desconhecimento, conforme relatado pelos guardiões legais, sobre os fatores predisponentes e formas de prevenção do câncer de mama em cadelas, demonstrando ser fundamental atividades relacionadas a conscientização dos riscos e cuidados referente aos tumores mamários, inclusive destinados aos profissionais da área.

Quanto aos tipos histológicos, foi observada maior frequência de carcinoma em tumor misto, tipo histológico que deriva da transformação maligna do componente epitelial do tumor misto benigno (MOULTON; ROSENBLAT, 1970; DAMASCENO et al. 2012; 2014; 2016; SAAD, MILLEY, AL-KHAN, 2017). O CTM, a princípio representa um tumor de melhor prognóstico. Contudo sua graduação histológica deve sempre ser considerada e representa correlação direta com seu potencial de malignidade. O carcinoma em tumor misto também foi o tipo histológico predominante em outros estudos (CAVALCANTI; CASSALI, 2006; RIBEIRO et al. 2009; ESTRELA-LIMA et al. 2010; TORÍBIO et al. 2012; SAAD, MILLEY, AL-KHAN, 2017).

Parâmetros corporais das cadelas com neoplasias mamárias

No presente estudo, observou-se fraca correlação entre as variáveis ECC/IMCc e ECC/GC, sendo necessário identificar as possíveis particularidades que interferiram na avaliação do animal. Um dos motivos aventados para justificar a fraca correlação do escore corporal com gordura corporal é a conformação anatômica da raça. A circunferência da cintura é o parâmetro para avaliação da gordura corporal total. Em raças

curvilíneas, a altura e comprimento predominam sobre os diâmetros transversais. Portanto essa medida em função do tamanho do animal não é fidedigna.

Deve-se ressaltar que não existe uma avaliação universal para aferir sobrepeso e obesidade. Apesar da dificuldade em agrupar animais de diferentes portes e área corporal variada, os resultados obtidos foram considerados satisfatórios e por meio deles é possível afirmar que, neste estudo, a forma mais apropriada para a avaliação corporal foi a avaliação em conjunto do peso e IMC_c.

Ao correlacionar o status reprodutivo com o status corpóreo foi possível observar diferenças significativas no IMC_c, porcentagem de gordura corporal e peso dos animais castrados em relação aos animais inteiros. Weeth et al. (2007) observou que em cães não castrados a frequência de obesidade (7.2%) ou sobrepeso (14.2%) é menor quando comparado ao peso normal (78.6%). Tais dados refletem que de fato as cadelas, após castração ganham peso, principalmente se não estimuladas para realização de atividades que permitam gasto de energia. A obesidade surge em cães castrados devido à redução da taxa metabólica (GROSSELIN et al. 2007) e é associada a várias neoplasias, inclusive o câncer de mama (TEOH; DAS, 2016).

As evidências que sugerem correlação entre câncer de mama e obesidade em mulheres ainda não estão completamente compreendidas, mas três mecanismos podem ser citados. O metabolismo dos hormônios sexuais, uma vez que em mulheres obesas foi constatada uma baixa concentração de andrógenos (SHI et al. 2013); A produção de estrógeno, hormônio implicado na carcinogênese mamária, a partir da aromatização da androstenediona no tecido adiposo de mulheres após a menopausa (CLELAND et al. 1985; SILTERI et al. 1987; ENGIN, 2017; MULLOLY et al. 2017; HETEMAKI et al. 2017).

Outro evento que liga a obesidade a ocorrência de câncer de mama é a desregulação da sinalização da insulina, que leva ao desequilíbrio na proliferação celular, diferenciação, apoptose e expressão alterada de adipocinas (DJURIC, 2016). Por fim, o aumento de produção de radicais livres pelo tecido adiposo induz ao estresse oxidativo e aumento na produção de marcadores pró-inflamatórios, mantendo um estado de inflamação crônica no organismo (FURUKAWA et al. 2004).

Perfil lipídico/metabólico das cadelas diagnosticadas com CTM e Ca

Quando se comparou a concentração de VLDL entre os grupos CTM e Ca foi possível perceber que, na presença dos carcinomas mais agressivos (grupo Ca), o VLDL apresentava alta concentração. Para investigar os efeitos do VLDL sobre a viabilidade, angiogênese, motilidade celular e estímulo a multiplicação (metástase) nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 de células tumorais de mama, Lu et al. 2017 as submeteram ao tratamento *in vitro* com as lipoproteínas LDL, VLDL e HDL e com isso constataram que o VLDL aumentou a viabilidade da célula *Human Umbilical Vein Endothelial (HUVEC)*, além disso o tratamento *in vitro* com VLDL aumentou a formação de microvasos endoteliais; O tratamento com VLDL aumentou a fosforilação da AKT Ser 473, fato que aumentou a migração celular. O tratamento com VLDL apresentou o maior efeito de invasão celular comparada as demais lipoproteínas e aumentou a viabilidade das células endoteliais pelo aumento da concentração de amphiregulina (AREG) (LU et al. 2017). A AREG pertence a família EGFR e participa em diferentes aspectos da tumorigênese.

Também houve hipertrigliceridemia nas cadelas do grupo carcinomas (Ca). Essa maior taxa de triglicérideo pode ser resultado da síndrome metabólica desenvolvida no grupo de animais com tipos histológicos mais agressivos. A síndrome metabólica é um grupo de desordens patológicas que envolve a hiperlipidemia, com aumento de colesterol, triglicérides ou de suas lipoproteínas e hipertensão criando um ambiente com alta concentração de estrógeno, adipocinas e citocinas inflamatórias, a exemplo da IL-6 e TNF α , envolvidas na carcinogênese e metástase (TROPF et al. 2017). Aproximadamente 20% dos cães obesos não portadores de neoplasias desenvolvem distúrbios similares a síndrome metabólica observada nos humanos. Essa condição é relacionada a resistência insulínica e diminuição da concentração de adiponectina (TVARIJONAVICIUTE et al. 2016).

O perfil metabólico não apresentou diferença estatística entre os momentos pré e pós excisão cirúrgica, com exceção da concentração de lactato, albumina e globulina em cadelas com outros tipos de carcinoma (Ca), quando comparado ao carcinoma em tumor misto (CTM). A Lactato Desidrogenase (LDH) é um dos sistemas enzimáticos preferencialmente produzidos por células neoplásicas (SIMÕES, 2013). O lactato, proveniente da glicólise anaeróbica liberado pelos tecidos extra-hepáticos (principalmente músculos), é convertido em glicose por meio do ciclo de Cori, resultando

em um consumo de seis moléculas de ATP (trifosfato de adenosina), fato que pode levar o animal de um estado corpóreo obeso a um estado de perda de peso e massa corpórea, proveniente da espoliação energética (INUI, 2002; SHILS; SHIKE, 2003).

Sabe-se que o ciclo de Cori é cerca de 4 ou 6 vezes mais ativo em pacientes humanos oncológicos (RUBIN, 2003). Isso decorre da alta necessidade das células tumorais por glicose para realização da constante divisão celular. Além disso, em pacientes oncológicos humanos, o uso de glicose pelo tecido muscular é reduzido, visto que há um alto consumo de glicose pela via anabólica (WAITZBERG et al. 2006). Cabe ressaltar que mulheres com carcinoma de útero com alta concentração de lactato apresentaram maior risco de desenvolvimento de metástase de acordo com Walenta et al. (2000).

Perfil lipídico e metabólico mediante suplementação com óleo de peixe composto por 90% e 60% de ômega 3

As globulinas têm como função o transporte de metais, lipídios e bilirrubina, além do papel na imunidade (GONZÁLEZ; SILVA, 2006). Existe uma globulina denominada globulina ligadora de hormônio específica para ligação a testosterona e estradiol, cuja função é regular a concentração de hormônios esteroidais livres (NAIK et al. 2008). Os hormônios sexuais têm um papel importante na etiopatogenia do câncer de mama e nesse contexto a globulina modula as funções da testosterona e estradiol, alterando a sua biodisponibilidade para os tecidos alvo.

Semelhante a um estudo realizado por Simão (2010), o uso de ômega 3 levou ao aumento da glicemia das cadelas, mostrando que o metabolismo glicêmico pode sofrer prejuízo frente as altas concentrações de ômega 3. Este aumento de glicose sugere o aumento do fluxo de precursores hepáticos da gliconeogênese (MORI, 2000; WOODMAN, 2002). O ômega 3 simula o status de jejum metabólico sobre a gordura, aumentando a oxidação, o que aumenta a gliconeogênese (GROOP, 1989; PINEDA, 1999).

Os valores de proteína total apresentaram diferenças significativas frente a suplementação com ômega 3 a 90%. A causa do aumento da proteína total, perante a suplementação, está relacionada ao aumento de globulina que apresentou valores médios maiores que o valor antes da suplementação com ômega 3.

Sobrevida

Por fim ao realizar a análise da sobrevida e taxa de sobrevida das cadelas com carcinoma mamário comparadas aos animais com CTM foi possível perceber que cadelas portadoras de carcinoma em tumor misto apresentaram tempo de sobrevida maior em relação as cadelas do grupo Ca. Este resultado se justifica, pois, a maior parte dos tumores avaliados nesse estudo receberam o diagnóstico histopatológico de CTM com graduação I, ou seja, uma neoplasia de menor malignidade comparada as demais graduações ou tipos histológicos (CASSALI et al. 2014).

Avaliando as cadelas que ingeriram ômega 3, não houve diferença estatística direta sobre o tempo de sobrevida. Esta falta de significância pode ser creditada ao fato dos efeitos do ômega 3 serem observados a longo prazo. Além disso, a melhora na taxa metabólica e perfil lipídico, observada nos animais tratados com ômega 3, pode favorecer o aumento de sobrevida de forma indireta. Cabe ressaltar que a duração do tratamento com ômega 3 foi de apenas dois meses. Assim, é possível que a ação do mesmo seja diferente ou potencializada se houver maior tempo de ingestão. É válido sugerir mais pesquisas que sejam conduzidos com maior tempo de exposição ao ômega 3 e com maior controle alimentar, evitando assim viés experimental.

Outro ponto a ser considerado é a dose nutracêutica utilizada. Em alguns casos, e é considerada a proporção de ômega 3:ômega 6 (KAIN et al.2017). Inclusive, descreve-se que mais importante que a concentração é a razão entre os diferentes tipos de ômega (ômega 3 e ômega 6). Entretanto essa pesquisa visava aplicação real por proprietários que provavelmente não teriam controle sobre a proporção ou razão da ingestão de ômega 3 e ômega 6 do *pet*.

CONCLUSÕES

Cadelas obesas apresentam alteração do perfil lipídico e tumores mais agressivos (Ca), sugerindo relação entre agressividade tumoral e a concentração de triglicérido, VLDL, albumina e lactato. Deste modo, o sobrepeso/obesidade pode ser fator de risco para promoção e progressão de nódulos mamários, inclusive em cadelas castradas.

A suplementação com óleo de peixe, rico em ômega 3, pode auxiliar no controle da dislipidemia e da obesidade em pacientes não castradas, além de favorecer maior taxa de sobrevida.

REFERÊNCIAS

- Biondo P.D., Brindley D.N., Sawyer M.B., Field C.J. 2008. The potential for treatment with dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids during chemotherapy. *J Nutr Biochem.* ;19 (12):787-96.
- Burkholder W.J., Toll P.W. 2000. Obesity. In: Hand MS. et al. *Small animal of clinical nutrition*. 4.ed. Kansas: Mark Morres Institute. p.401-430.
- Burkholder, W.J., toll, P.W., 1997. Controle da obesidade. In: HAND M.S., TATCHER C.D., REMILLARD R.I., ROUDEBUSCH P., *Small animal clinical nutrition*. 4.ed. Topeka: Mark Morris Institute,. p. 1-44.
- Calle E.E., Thun M.J. 2004. Obesity and cancer. *Oncogene*. 23:6365-6378.
- Carmo M.C.N.S., Correia M.I.T.D. 2009. A Importância dos Ácidos Graxos Ômega-3 no Câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia*;55 (3):279-287.
- Cassali G., Lavallo G., Ferreira E., Estrela-Lima A., De Nardi A., Ghever C., Sobral R.A., Amorim R.L., Oliveira L.O., Sueiro F.A.R., 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., Frehse M.S., 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., Salgado B.S., Torres R. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors-2013. 2014. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, Belo Horizonte, v. 7, n. 2, p. 38–69.
- Cavalcanti M.F., Cassali G.D. 2006. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas – revisão. *Revista Clínica Veterinária*. 61:56-63.
- Cleland W.H., Mendelson C.R., Simpson E.R. 1985. Effects of aging and obesity on aromatase activity of human adipose cells. *J Clin Endocrinol Metab*.60 (1):174-7.
- Damasceno K.A., Bertagnolli A.C., Estrela-Lima A., Rabelo B.S., Campos L.C., Ribeiro L.G., Cassali G.D. Versican expression in myoepithelial cells from carcinomas in canine mixed mammary tumors. *The Veterinary Journal (London, England)*. 1997). 2014. v. 200, p. 146-151.
- Damasceno K.A., Rabelo B.S., Cassali, G.D., Gamba C.O., Souza C.M.M., Campos L.C., Campos C.B., Ferreira E., Cassali, G.D. 2012. Histopathological and immunophenotypical analysis of canine mucinous rectal adenocarcinoma. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. v. 5, p. 74-77.
- De Nardi A.B., Rodaski S., Sousa R.S., Costa T.A., Macedo T.R., Rodigheri S.M., Rios A., Piekarcz C.H. 2002. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. *Archives of Veterinary Science*.7. (2):15-26.

- El-Ashmawy N.E., Khedr E.G., El-Bahrawy H.A., Al-Tantawy S.M. 2017. Chemopreventive effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids and atorvastatin in rats with bladder cancer. *Tumour Biol.* Feb;39(2):1010428317692254.
- Engin A. 2017. Obesity-associated Breast Cancer: Analysis of risk factors. *Adv Exp Med Biol.* ; 960:571-606.
- Estrela-Lima A., Araújo M.S.S, Costa-Neto J.M, Teixeira-Carvalho A., Barrouin-Melo S.M, Cardoso S.V, Martins-Filho A.O, Serakides R & Cassali G.D. 2010. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer.* 10:256-270.
- Estrela-Lima A., Araújo M.S.S., Costa-Neto J.M., et al. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer.* 2010. 10:256-270.
- Feliciano M.A.R., Silva A.S., Peixoto R.V.R., Galera P.D., Vicente W.R.R. 2012. Clinical, histopathological and immunohistochemical study of mammary neoplasm in bitches. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.64 n.5.
- Ferreira E, Bertagnolli AC, Cavalcanti MF, Schmitt FC & Cassali GD. 2009. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 7:01-06.
- Fischbach F. 2002. Exames bioquímicos. In:Manual de enfermagem: Exames laboratoriais & diagnósticos. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.168-247.
- Friedewald W.T., Levy R.I., Fredrickson D.S. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 18:499–502.
- Furian M., Sandei C.F.C.S., Rocha EJN, Lot RFE. Estudos retrospectivo dos tumores mamários em caninos e felinos atendidos no Hospital Veterinário da FAMED entre 2003 a 2007. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária.* 2007.
- Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M., Iwaki M, et al. 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 114. (12):1752-61.
- German A.J. 2006. The growing problem of obesity in dogs and cats. *Journal of Nutrition, Philadelphia.* v. 136, n. 7, p. 1940-1946.
- German A.J., Holden S.L., Bissot T., Hackett R.M., Biorge V. 2007. Dietary energy restriction and successful weight loss in obese client-owned dogs. *J Vet Intern Med.*;21 (6):1174-80.
- González F.H.D., Silva S.C. 2006. Introdução à bioquímica clínica veterinária. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 357p.
- Groop L.C., bonadonna R.C., delprato S., ratheiser K., Zyck K., Ferrannini E., DeFronzo, R.A. Glucose and free fatty acid metabolismo in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. *J.Clin. Invest.* 1989; v.84 p. 205-213
- Grossellin J., Wren J.A., Sunderland S.J. 2007. Canine obesity – an overview. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy, Oxford.* v. 30, p. 1-10.

- Hataka A. 2004. Citologia aspirativa com agulha fina e histopatologia: valor e significado para diagnóstico e prognóstico do câncer de mama em cadêlas. Botucatu – SP Universidade Estadual Paulista, Faculdade de medicina Veterinária e zootecnia. 90p. Tese de Doutorado - Área de clínica Veterinária.
- Hetemäki N., Savolainen-Peltonen H., Tikkanen M.J. et al. 2017. Estrogen Metabolism in Abdominal Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue in Postmenopausal Women. *J Clin Endocrinol Metab.*
- Inui A. 2002. Cancer Anorexia-Cachexia Syndrome: Current Issues in Research and Management. *A Cancer Journal for Clinicians.* v.52, n.2, p.72-91.
- Kaidar-Person O., Bar-Sela G., Person B. 2011. The two major epidemics of the twenty-first century: obesity and cancer. *Obes Surg.* 21:1792–1797.
- Kain V., Ingle K.A., Kachman M., Baum H., Shanmugam G., Rajasekaran N.S., Young M.E., Halade G.V. 2017. Excess Omega-6 Fatty Acids Influx in Aging Drives Metabolic Dysregulation, Electrocardiographic Alterations and Low-grade Chronic Inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* .
- Kaneko J.J., Harvey J., Bruss ML. 1997. *Clinical biochemistry of domestic animals.* 5 ed. San Diego: Academic Press, 932p.
- Laflamme D.P. 1997. Development and validation of a body condition score system for dogs: a clinical tool. *Canine Practice, Santa Barbara.* v. 22, n. 3, p. 10- 15.
- Larsson S.C., Wolk A. 2007. Obesity and the risk of gallbladder cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 96 (9):1457-61.
- Lekcharoensuk C., Lulich J.P., Osborne C.A., Pusoonthornthum R., Allen T.A., Koehler L.A., Urlich L.K., Carpenter K.A., Swanson L.L. 2000. Patient and environmental factors associated with calcium oxalate urolithiasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* v. 217, n. 4, p. 515-519.
- Llaverias G., Danilo C., Mercier I., Daumer K., Capozza F., Williams T.M., Sotgia F., Lisanti M.P., Frank P.G. 2011. Role of cholesterol in the development and progression of breast cancer. *Am J Pathol.* 178 (1):402-12.
- Lu C.W., Lo Y.H., Chen C.H., Lin C.Y., et al. VLDL and LDL, but not HDL, promote breast cancer cell proliferation, metastasis and angiogenesis. *Cancer Lett.* 2017 Mar 1;388:130-138.
- Luna L.G., 1968. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology.* 3rd ed. New York. McGraw Hill.
- Maki K.C., Lubin B.C., Reeves M.S., Dicklin M.R., Harris W.S. 2009. Prescription omega-3 acid ethyl esters plus simvastatin 20 and 80 mg: effects in mixed dyslipidemia. *J Clin Lipidol.* 3 (1):33-8.
- Mori T.A., Burke V., Puddey I.B., Watts G.F., O'Neal D.N., Best JD, Beilin L.J. 2000. Purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids have differential effects on serum lipids and lipoproteins, LDL particle size, glucose, and insulin in mildly hyperlipidemic men. *Am J Clin Nutr.* 71:1085-94.
- Moulton J.E., Rosenblat L.S. 1970. Canine mammary tumors. *Veterinary Pathology.* 7:289-320.

- Mueller R.S., Fieseler K.V., Fettman M.J., Zabel S., Rosychuk R.A., Ogilvie G.K., Greenwalt T.L. 2004. Effect of omega-3 fatty acids on canine atopic dermatitis. *J Small Anim Pract.* 45 (6):293-7.
- Müller D.C, Schossler J.E.; Pinheiro, M. 2008. Adaptação do índice massa corporal humano para cães. *Ciência Rural, Santa Maria.* v. 38, n.4, p. 1038-1043.
- Mullooly M., Yang H.P., Falk R.T., Nyante S.J et al. 2017. Relationship between crown-like structures and sex-steroid hormones in breast adipose tissue and serum among postmenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* Jan 19;19(1):8.
- Oliveira L.O., Oliveira R.T., Loretto A.P., Rodrigues R., Driemeier D. 2003. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta Scientiae Veterinariae.* 31:105-110.
- Pires M.A., Travassos F.S., Pires I. 2003. Neoplasias Em Canídeos - Um Estudo descritivo de seis anos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias.* 98:111-118.
- Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B., Sobin L.H.* 1992. *Laboratory methods in Histotechnology.* Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology. 98-100.
- Ribeiro L.G.R., Damasceno K.A., Costa Neto J.M. 2009. JExpressão da Cox-2 nos carcinomas mamários de cadela. *Veterinária em Foco.* v.6, p.134-139.
- Rodaski S., Piekarz C.H. 2009. Diagnóstico e estadiamento clínico, p.52-73 In: Daleck CR, De Nardi AB. & Rodaski S. (Eds), *Oncologia em Cães e Gatos.* 11ª ed. Roca, São Paulo.
- Rubin H. 2003. Cancer Cachexia: its correlations and causes. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*;100 (9):5384-5389.
- Saad E, Milley K, Al-Khan A, Nimmo J, Bacci B et al. Canine Mixed Mammary Tumour as a Model for Human Breast Cancer with Osseous Metaplasia', *Journal of Comparative Pathology.* 2017. v.156, n.4, pp. 352-365.
- Schmidt C, Lopes M.D., Silva M.C., Figuera R.A., Souza T.M. 2004. Perfil lipoprotéico de cadelas submetidas à ovariectomia com e sem reposição estrogênica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.56, n.4, p.449-456.
- Shi Y., Han J.J., Tennakoon J.B.F.F, Merchant F.A. et al. 2013. Androgens Promote Prostate Cancer Cell Growth through Induction of Autophagy. *Molecular Endocrinology.*27 (2):280-295.
- Shils M.E., Shike M. 2003. Suporte nutricional do paciente com câncer. In: Shils, ME, Olson, J SHIKE, M, ROSS AC. (Eds.). *Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença.* São Paulo: Manole.. v.2, p. 1385-1416.
- Siliteri P.K., 1987 Adipose tissue as a source of hormones. *American Journal of Clinical Nutrition* 45 277-282.
- Silva A.E., Serakides R., Cassali G.D. 2004. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. *Cienc. Rural. Santa Maria.* v. 34, n. 2, p. 625-33.
- Simao N.A.C, Godeny P., Lozovoy M.A.B., Dichi J.B., Dichi I. 2010. Efeito dos ácidos graxos n-3 no perfil glicêmico e lipídico, no estresse oxidativo e na capacidade antioxidante total de pacientes com síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* v.54, n.5.

- Teoh S.L., Das S. 2016. Tumour biology of obesity-related cancers: understanding the molecular concept for better diagnosis and treatment. *Tumour Biol.* 37 (11):14363-14380.
- Toríbio J.M.M.L., Estrela-Lima A., Martins-Filho E.F., Ribeiro L.G.R., D'assis, M.J.M.H., Teixeira R.G., Damasceno K.A., Cassali G.D., Neto J.M.C. 2012. Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de Salvador, Bahia. *Rev. Ceres.* v.59 n.4.
- Torres R.J., De Noronha L., Casella A.M., Grobe S.F., Martins I.C., Torres R.R., Luchini A., Sturzeneker M.C., Torres C.L., Precoma D.B., 2013. Effect of olmesartan on leukocyte recruitment in choroid-sclera complex in hypercholesterolemia model. *J Ocul Pharmacol Ther.* 29 (8):709-14.
- Tóth Š., Šajty M., Pekárová T., Mughees A., Štefanič P., Katz M., Spišáková K., Pella J., Pella D. 2017. Addition of omega-3 fatty acid and coenzyme Q10 to statin therapy in patients with combined dyslipidemia. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* . 26;28 (4):327-336.
- Trall M.A., 2007. *Hematologia e Bioquímica Veterinária.* 1. ed. São Paulo: Roca., p.92-109.
- Tvarijonaviciute A., Ceron J.J., De Torre C, Ljubić B.B., Holden SL., Queau Y, et al. 2016. Obese dogs with and without obesity-related metabolic dysfunction – a proteomic approach. *BMC Vet Res.*
- Waitzberg D., Torrinhos R., Jesus R., Alves C. 2006. Alterações metabólicas no Câncer. In: *Dieta, Nutrição e Câncer.* 1.ed. São Paulo: Editora Atheneu. p. 277-288.
- Walenta S., Wetterling M., Lehrke M., Schwickert G., Sundfjør K., Rofstad E.K., Mueller-Klieser W. 2000. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res.*15. 60(4):916-21.
- Weeth L.P., Fascetti A.J., Kass P.H., Suter S.E., Santos A.M., Delaney, S.J. 2007. Prevalence of obese dogs in a population of dogs with cancer. *American Journal of Veterinary Research, Schaumburg.* v. 68, n. 4, p. 389-398.
- Woodman R.J., Mori T.A., Burke V., Puddey I.B., Watts G.F., Beilin L.J. 2002. Effects of purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on glycemic control, blood pressure, and serum lipids in type 2 diabetic patients with treated hypertension. *Am J Clin Nutr.*;76:1007-15.

Relação entre androstenediona/estrone séricos e aromatase em tecido adiposo peritumoral em cadelas obesas diagnosticadas com carcinomas mamários

Keidylania da Costa Santos⁴, Ricardo W.D. Portela², Karine Araújo Damasceno³, Alessandra E. S. Lima¹

¹Departamento de Anatomia, Patologia e Clínicas, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Pós-Graduação em Ciência Animal dos Trópicos. Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

² Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil, 40110-100.

³ Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX)- Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brasil.

⁴ Instituto Federal do Sertão Pernambucano (IF - Sertão) – Santa Maria da Boa Vista, Pernambuco, Brasil.

ABSTRACT.- Santos K.C., Portela R.W.D.P., Damasceno, K.A., Estrela-Lima, A.S. 2017, Relation between **androstenedione/estrone séricos and aromatase in obese canine adiposity peritumoral tissue with mammary carcinoma**. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00, Universidade Federal da Bahia. Avenida Adhemar de Barros, s/n, Ondina, CEP 40170110, Bahia – Brazil. E-mail: alestrela@gmail.com

In the last decades a greater relevance has been given as adipose tissue abilities since it has been attributed to an endocrine function, suggesting that it is efficient to be a component of the hormonal metabolism in the body, plus a factor that is added to relate an obesity to cancer. In This context the objective was to evaluate the conversion of androstenedione to estrone on adiposity tissue of female dogs with mammary carcinoma. So through pre-surgical blood sampling it was evaluated the concentration of androstenedione and estrone in sérum female dog (n=46) using ELISA kit and compare results with body condition, obesity, reproductive status, besides evaluate the expression of estrogen, progesterone and P 450 aromatase receptors in female dogs with mammary carcinoma. It was observed that there was no statistical difference in the concentration of androstenedione in relation to the histological type, however there was difference in the percentage of body fat. The evaluation of the P450 aromatase shows greater expression of the enzyme in the adipose tissue, suggesting androstenedione aromatization, with production of estrogen in the adipose tissue. It was observed a greater expression of progesterone receptors in peritumoral adipose tissue, in this way, it is possible to say that

there is aromatization of androstenedione in female dogs with adipose tissue excess, being a possible factor involved in mammary carcinogenesis.

INDEX TERMS: mammary neoplasia, obesity, estrone, androstenedione

RESUMO.- Nas últimas décadas uma maior relevância tem sido dada as habilidades do tecido adiposo desde que foi atribuída a ele a função endócrina, sugerindo que provavelmente trate de um componente do metabolismo hormonal no organismo, mais um fator que se soma para relacionar a obesidade ao câncer. Neste contexto se objetiva avaliar a existência da conversão de androstenediona em estrona no tecido adiposo de cadelas portadoras de carcinoma mamário por meio de colheitas de sangue no momento pré-cirúrgico e avaliação por Kit ELISA e comparar os resultados com a condição corporal, obesidade, status reprodutivo, além de avaliar a expressão dos receptores para estrógeno, progesterona e aromatase P 450 em cadelas com carcinoma mamário. Com isso foi observado que não houve diferença estatística na concentração de androstenediona no que tange o tipo histológico, mas houve diferença com relação a porcentagem de gordura corporal. A avaliação da aromatase P450 indicou maior expressão dessa enzima no tecido adiposo, sugerindo aromatização da androstenediona, com produção de estrógeno no tecido adiposo. Com relação aos receptores, observou-se maior expressão de receptores para progesterona em tecido adiposo peritumoral. Assim é possível afirmar que há aromatização da androstenediona em cadelas com excesso de tecido adiposo, sendo um possível fator envolvido na carcinogênese mamária.

TERMO DE INDEXAÇÃO: neoplasia mamária, obesidade, estrona, androstenediona

INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias são frequentes em cadelas e 50% das neoformações apresentam características malignas no momento do diagnóstico (DALECK et al. 1998). Cerca de 32% das cadelas com tumores mamários maiores que cinco centímetros morre um ano após a mastectomia (ESTRELA-LIMA et al. 2010).

A etiologia do câncer de mama envolve participação de fatores genéticos, ambientais e hormonais (SILVA et al. 2004). Considerando a natureza hormonal (FONSECA; DALECK, 2000), a conduta veterinária para a prevenção de neoplasias mamárias é baseada na ovariectomia (OH) precoce que, de acordo com Schneider et al. (1969), reduz o risco de desenvolvimento de neoplasias. No entanto, a castração precoce retarda o fechamento de diáfises de ossos longos, predispõe à dermatite de prega vulvar recorrente, além de desencadear uma forte tendência para o ganho de peso, que pode culminar com obesidade (O'FARRELL; PEACHEY, 1990; SALMERI et al. 1991; SPAIN et al. 2004; SONTAS; EKICI, 2007).

Tabak (2014) sugeriu que a maior síntese de estradiol em mulheres obesas predispõe ao câncer. Tal afirmação decorre do fato que no tecido subcutâneo antes da menopausa ocorre a conversão da androstenediona em estrona, mediada pela aromatase P450, e o excesso de tecido adiposo acentua esse processo a partir do aumento da transcrição desta enzima (CLELAND et al. 1985; ENGIN, 2017; MULLOLY et al. 2017; HETEMAKI et al. 2017).

Em cadelas também se verificou uma maior atividade da aromatase P450 em neoplasia mamária maligna, sendo que o número de tumores histologicamente mais agressivos foi maior no grupo de cadelas acima do peso ou obesas. Adicionalmente, Queiroga et al. (2015) constataram maiores concentrações de estrógenos e seus precursores na região peritumoral do que no soro do próprio animal, o que pode sugerir a ocorrência da aromatização da androstenediona em cadelas. Pérez Alenza et al. (1998) verificaram que a obesidade é um fator de risco independente para o desenvolvimento de neoplasias mamárias em cadelas, mesmo naquelas sem estímulo hormonal ovariano.

Uma vez que o tumor de mama em cadelas é um modelo experimental de estudo do câncer em mulheres e que em humanos ocorre a conversão hormonal no tecido adiposo, acredita-se que tal fenômeno também ocorra na espécie canina. Assim, objetivou-se avaliar as concentrações séricas de androstenediona e estrona, bem como a expressão da enzima aromatase P450 e receptores hormonais para estrógeno e progesterona no tecido adiposo peritumoral de cadelas portadoras de carcinomas mamários.

METODOLOGIA

Animais: Foram selecionadas 46 cadelas de diferentes raças, com idade variando de 6 a 18 anos, agrupadas de acordo com o tipo histológico em Carcinoma em Tumor Misto (CTM) e outros tipos de carcinomas (Ca). Os animais foram atendidos no Hospital de Medicina Veterinária da UFBA no período de 2015 a 2016. Todos os tutores legais foram previamente informados sobre a realização do projeto de pesquisa e assinatura em termo de livre consentimento esclarecido. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), com número de protocolo 05/2015.

Nenhum dos animais selecionados fez uso prévio (mínimo de trinta dias antes da cirurgia) de fármacos antineoplásicos e não apresentaram histórico de endocrinopatia.

Avaliação clínica: As cadelas com lesão mamária foram submetidas ao exame físico geral e específico. Os exames consistiram na avaliação da condição clínica geral, coleta de informações sobre o histórico clínico e ciclo reprodutivo (ciclo estral regular, castração, período de desenvolvimento e evolução das lesões, histórico de pseudociese e aplicação de progestágenos). Todas as informações foram transcritas para uma ficha oncológica específica segundo o protocolo modificado de Ferreira et al. (2003). Foram realizados hemograma e exames de bioquímica sérica (alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, creatinina, ureia, glicose e cálcio) através de kits comerciais de bioquímica clínica (LABTEST[®]), além dos exames de imagem (radiografia simples de tórax em três incidências látero-lateral direita, látero-lateral esquerda e ventro-dorsal) para pesquisa de metástase pulmonar e ultrassonografia de abdômen total. Também foi realizado eletrocardiograma e ecocardiograma. Após a avaliação do risco cirúrgico, os animais foram submetidos a mastectomia radical unilateral e gonadectomia.

Procedimento histopatológico: A cadeia mamária retirada no momento da cirurgia foi fixada em formol neutro e tamponado com fosfato a 10% e processada pela técnica rotineira de inclusão em parafina (PROPHET; MILLS; ARRINGTON, 1992). As secções histológicas de 4µm foram coradas pelas técnicas da Hematoxilina-Eosina (HE) (LUNA, 1968) para posterior classificação e graduação histopatológica.

Determinação sorológica de estrona e androstenediona: Para avaliar a concentração sérica dos hormônios estrona e androstenediona foram utilizados Kits de ELISA de competição multiespécie (Develop[®]) e os procedimentos foram realizados de acordo com instruções do fabricante.

Imuno-histoquímica: Foram utilizados os anticorpos anti-aromatase (Clone M22, Biovision Research Products, diluição 1:100), anti-receptor de estrógeno e anti-receptor de progesterona em secções histológicas com 4µm, contendo fragmentos de tecido adiposo peritumoral. Foi empregado nesse estudo um Kit comercial com sistema de amplificação polimérica (Novo Link Max Polymer Detection System - Leica[®]). Os reagentes foram aplicados pela técnica manual, sendo o tempo de incubação do anticorpo primário de 1 hora. Para os demais reagentes, o tempo foi de 30 minutos, com exceção do cromógeno DAB que foi de dois minutos. Como controles positivos, foram utilizadas amostras de mama previamente testadas para avaliação do anticorpo e os controles negativos foram obtidos por substituição do anticorpo primário pelo soro normal.

Para a análise da imunomarcagem de RE e RP, amostras contendo > 1% de adipócitos marcados foram consideradas positivas, segundo os critérios de Hammond et al. (2010). Para avaliação da expressão de aromatase, a porcentagem de adipócitos marcados foi classificada de acordo com os seguintes critérios: 0: < 1%, 1: 1–25%, 2: 26–50%, 3: 51–75%, 4: 76–100%. A intensidade de marcação da aromatase foi determinada segundo a graduação: 0: sem marcação; 1: fraca; 2: moderada e 3: intensa. O escore de cada caso foi obtido pela multiplicação do componente da porcentagem de células pela graduação da intensidade de marcação (adaptado de Sasano et al. 2005).

Determinação antropométrica: Visando agrupar os animais segundo a sua condição corporal em cadelas com peso adequado ou acima do peso, foi realizada a avaliação da condição corporal. A faixa de condição corporal foi baseada em quatro métodos: Escore de Condição Corporal (ECC), de acordo com Laflamme (1997); Índice de Massa Corporal Canino (IMCc), que seguiu recomendações de Muller et al. (2008); Medição Morfométrica (MM) e Porcentagem de Gordura Corporal (%GC), proposta por Burkholder (2000). Os valores da medição foram inseridos na equação % GC em cadelas = - 1,7 (MP cm) + 0,93 (PA cm) + 5 para determinação da % de gordura corporal, na qual

% GC significa porcentagem de gordura corporal, MP indica a longitude do membro posterior direito desde a tuberosidade calcânea até a metade do ligamento patelar e PA significa perímetro do abdome.

Acompanhamento e sobrevida: Recomendou-se a realização de exames radiológicos a cada 60 dias, exames laboratoriais (hemograma, bioquímico – ureia, creatinina, ALT e FA) e clínicos mensalmente até 12 meses após a cirurgia, período de acompanhamento, no qual foram coletados dados a respeito da sobrevida global. O tempo de sobrevida global foi definida (em dias) como sendo o período entre a exérese cirúrgica do tumor primário e a data de óbito pela doença.

Os animais que evoluíram para o óbito foram submetidos a necropsia para determinação da *causa mortis* e detecção de possíveis metástases. Este procedimento foi realizado após autorização dos proprietários por escrito em formulário específico do grupo de pesquisa.

Análise estatística: Na análise estatística foram avaliadas as relações das concentrações séricas de androstenediona e estrona (variáveis dependentes) com o IMC, peso corporal e o percentual de gordura corporal (variáveis independentes). Estimou-se o coeficiente de determinação parcial de cada variável independente no modelo e se adotou o procedimento de seleção de equações ajustadas denominado stepwise (DRAPER; SMITH, 1981), utilizando o procedimento REG do SAS (versão 9,1). Apenas as variáveis significativas ($p < 0,05$) foram mantidas na composição do modelo matemático final. A avaliação de aromatase foi realizada pelo teste do qui-quadrado.

As curvas de sobrevida foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox) ou Cox na análise univariada ou multivariada, respectivamente e utilizando o softwares Prism 5,0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Em todos os casos, valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Fatores clínicos, reprodutivos e patológicos

Foram atendidas 219 cadelas, no período de abril de 2015 a agosto de 2016, Destes, setenta e cinco retornaram para a realização da mastectomia e OH. Quarenta e seis cadelas foram selecionadas para o estudo com base nos critérios de exclusão. A idade das cadelas estudadas variou de seis a dezoito anos, sendo de 9,76 anos a média de idade de acometimento pela neoplasia mamária.

Houve um maior envolvimento de cães da raça Poodle 26,09% (12/46), seguida por cães Sem Raça Definida (SRD) 21,74% (10/46) e Pinscher 13,04% (6/46). As demais raças totalizaram 39,13% (18/46).

Parâmetros corporais das cadelas inteiras e castradas

Com relação ao escore corporal das cadelas com carcinoma mamário, foi possível observar que 2,22% (1/46) pertencia ao escore 3; 44,4% (20/45) pertencia ao escore 4; 20% (10/46) pertencia ao escore 5; 24,4% (11/46) pertencia ao escore 6; 2,22% (1/46) pertencia ao escore 7; 6,66 (3/46) pertencia ao escore 8.

Com relação ao IMC_c e %GC constatou-se que 15 (32,6%) cadelas estavam abaixo do IMC_c, 10 (21,73%) cadelas estavam dentro do padrão e 21 (45,65%) estavam acima do valor de referência. Quinze (32,6%) cadelas possuíam porcentagem de gordura corporal abaixo do aconselhado, dezoito (39,13%) cadelas apresentavam %GC dentro do padrão e 13 (28,26%) cadelas estavam acima do valor referido (**Quadro 1**).

Quadro 1: Agrupamento de cadelas de acordo com escore corporal, índice de massa corporal e porcentagem de gordura corporal.

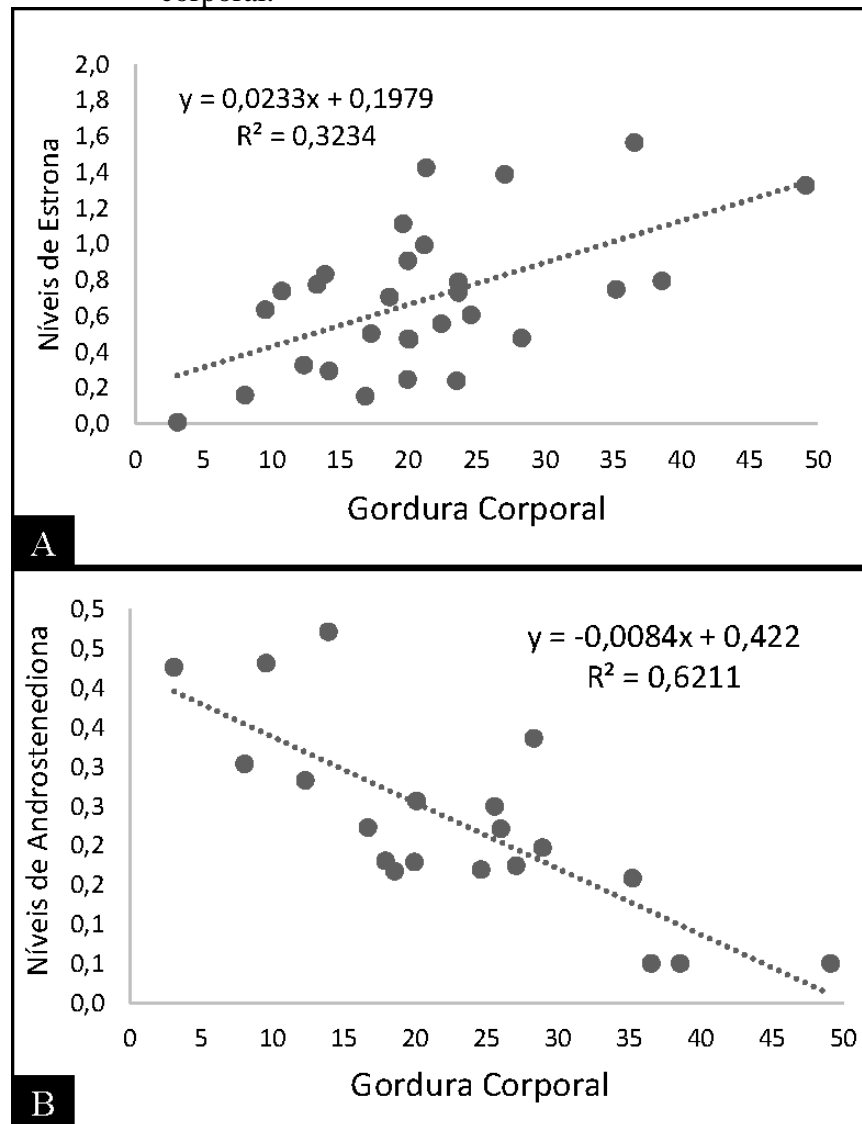
	ABAIXO	NORMAL	ACIMA
IMCC (11,8 E 15 KG/M²)	15 (32,6%)	10 (21,73%)	21 (45,65%)
ECC (4 E 5)	1 (2,22%)	30 (65,2%)	15 (32,6%)
%GC (16 A 25%)	15(32,6%)	18 (39,13%)	13 (28,26%)

Ao correlacionar o status reprodutivo com o status corpóreo foi possível observar diferenças significativas no IMC_c ($t = 2,18$; $p = 0,035$) dos animais castrados e inteiros, sendo os valores médios maiores nos animais castrados ($16,32 \pm 4,79$) em comparação aos animais inteiros ($13,49 \pm 3,37$). A porcentagem de gordura corporal também apresentou diferença significativa ($t = 2,06$; $p = 0,045$) entre os grupos castrados e inteiros, com valores superiores nos castrados ($25,09 \pm 11,09$) em detrimento dos inteiros ($19,54 \pm 6,44$). O peso ($t = 2,051$; $p = 0,046$) também foi maior nos animais castrados ($18,25 \pm 13,00$) em comparação ao grupo de cadelas não castradas ($11,62 \pm 7,89$).

Concentração sérica de androstenediona e estrona, expressão da aromatase P450 e receptores de progesterona e estrógeno.

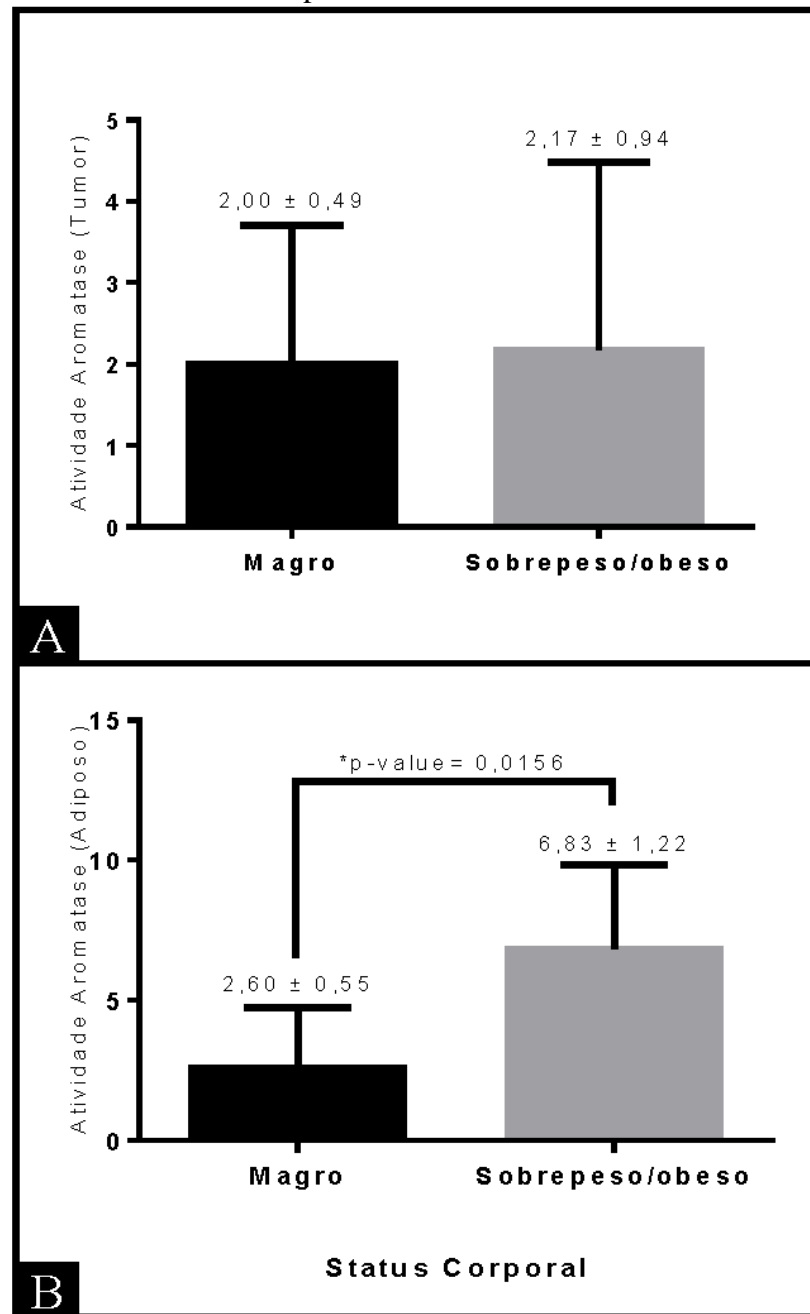
Verificou-se associação entre as concentrações de androstendiona e a gordura corporal com diferença significativa ($p < 0,0001$) e correlação negativa significativa entre as variáveis ($r = -0,7880$). Associação também foi observada entre as concentrações de estrona e a gordura corporal apresenta diferença significativa ($p = 0,0013$) e com correlação positiva entre as variáveis ($r = 0,5687$) (**Figura 1**).

Figura 1: Correlação de estrona e androstenediona com a gordura corporal.



A fim de investigar se a maior concentração de estrona relacionada a gordura corporal era resultado da conversão da androstenediona, avaliou-se a expressão da enzima aromatase P450, correlacionando o valor com a condição corporal e grupo histológico estudado (CTM e Ca). Observou-se uma significativa atividade da aromatase, tanto no tecido adiposo peritumoral quanto no tumor de cadelas com carcinoma mamário com sobrepeso ou obesas (**Figura 2**).

Figura 2: Expressão da enzima aromatase no tecido adiposo peritumoral (A) e tumor (B) de cadelas com carcinoma mamário, divididas de acordo com o escore corporal.



Foi observada maior expressão da enzima aromatase no tecido adiposo peritumoral apenas dos animais do grupo Ca ($p = 0,0156$) (Figura 3 e 4).

Figura 3. Expressão da enzima aromatase no tecido adiposo peritumoral (A) e tumor (B) de cadelas dos grupos CTM e Ca.

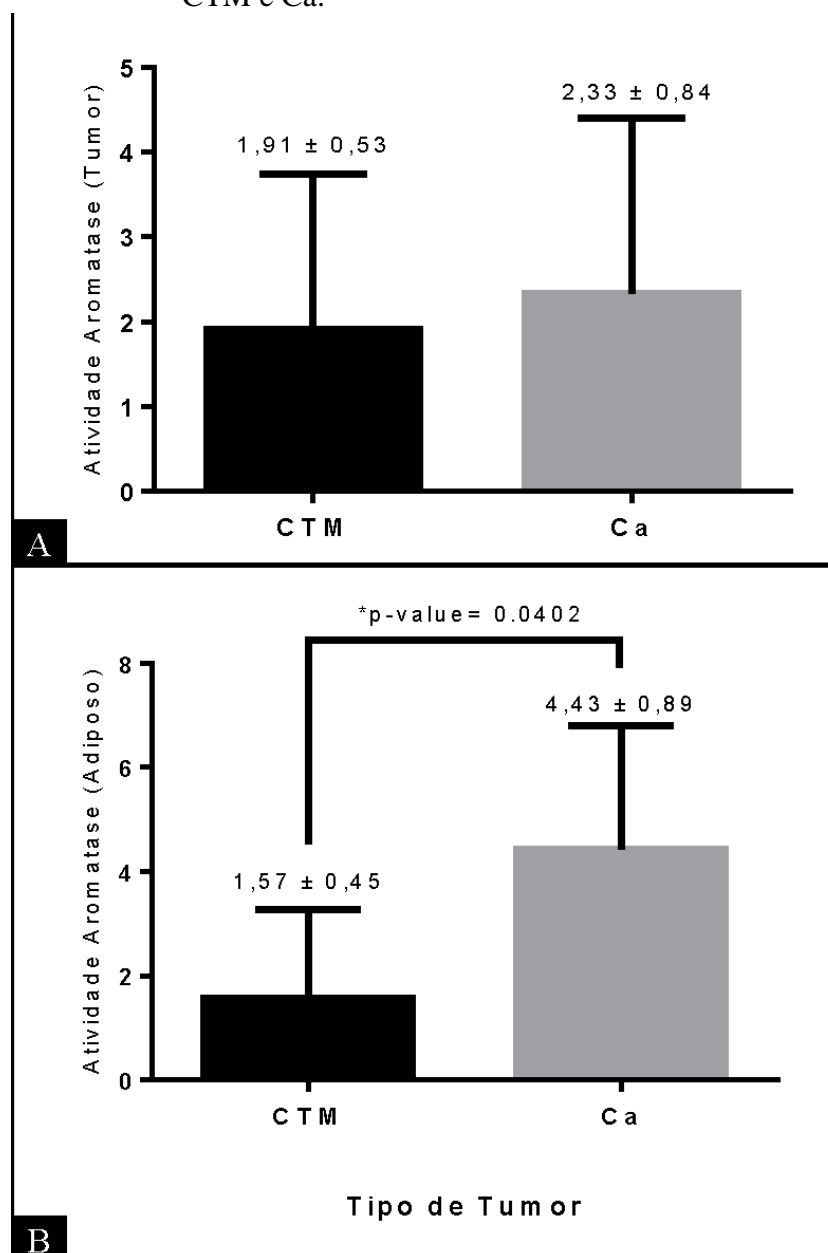
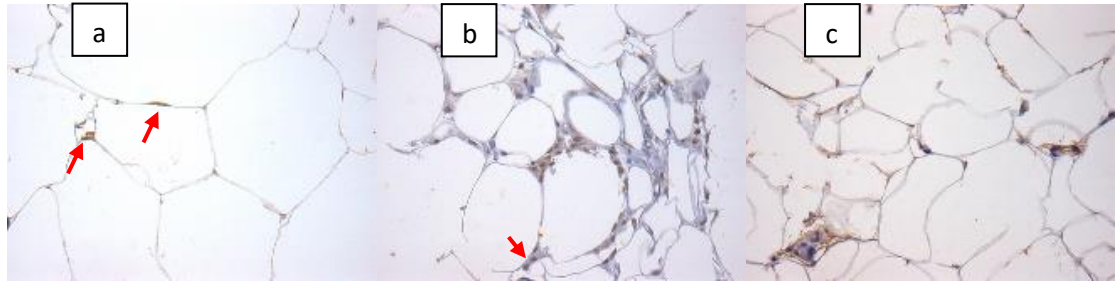
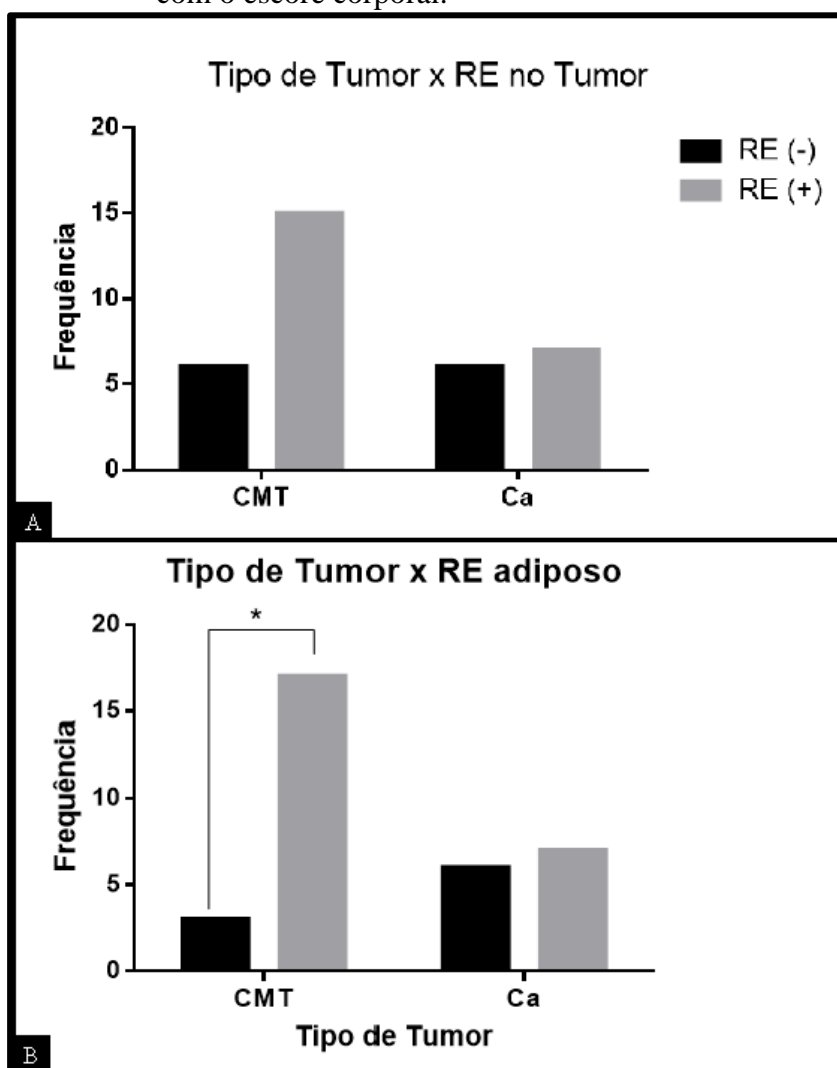


Figura 4. Tecido adiposo adjacente a carcinoma em glândula mamária canina. (a) Adipócitos peritumorais revelando expressão nuclear de receptor de estrógeno (setas vermelhas) (40x). (b) Adipócitos peritumorais com imunomarcação nuclear de receptor de progesterona (seta vermelha) (40x). (c) Expressão citoplasmática de aromatase em adipócitos peritumorais. (40x). Contra-coloração de Mayer's.



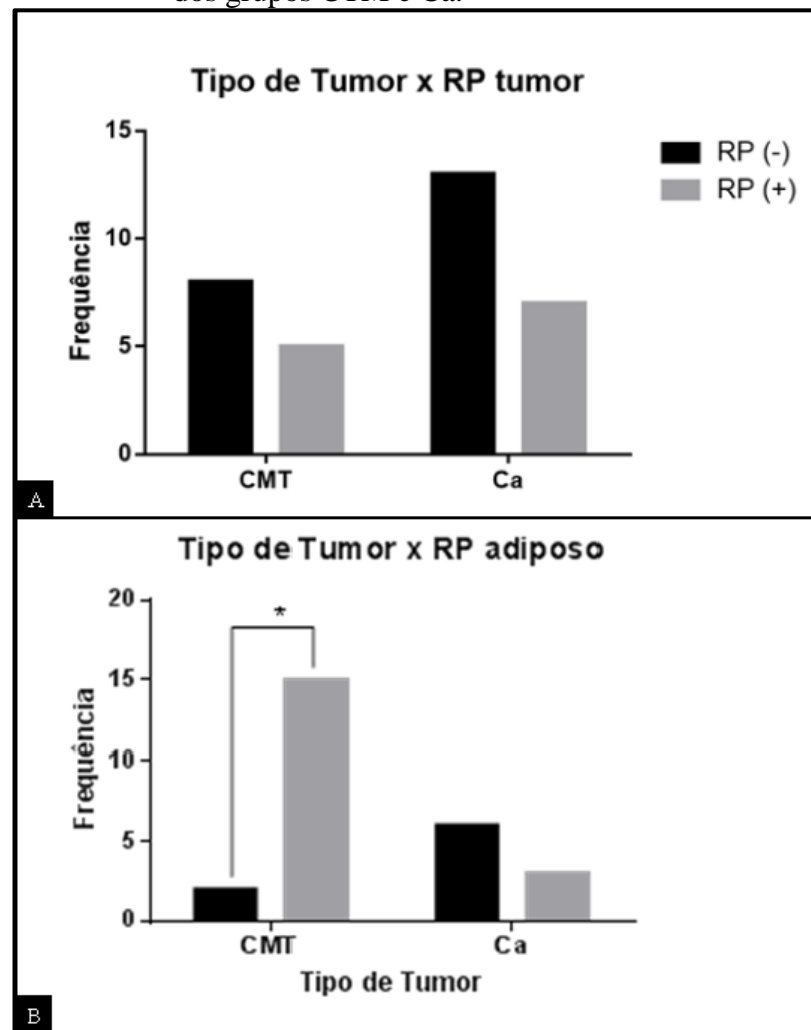
A avaliação da expressão dos receptores de estrógeno e progesterona foi realizada no tecido adiposo peritumoral e no tumor. As cadelas foram divididas por escore corporal e grupo histológico (CTM e Ca). Foram observadas maiores expressões dos receptores de estrógeno ($\chi^2 = 2,143$; $p = 0,0321$) e progesterona ($\chi^2 = 4,911$; $p = 0,0267$) nos animais com sobrepeso/obesos em relação aos animais com escore corporal normal. **(Figura 5).**

Figura 5. Expressão do receptor de estrógeno (RE) e progesterona (RP) negativo (-) e positivo (+) segregadas de acordo com o escore corporal.



Não foi observada diferença na expressão dos receptores de estrógeno ($x^2 = 1,087$; $p = 0,2972$) e progesterona ($x^2 = 0,0408$; $p = 0,8399$) no tumor quando se comparou os grupos CTM e Ca (**Figuras 6 e 7**). Contudo, foram observadas diferenças significativas na expressão, tanto em relação aos receptores de estrógeno ($x^2 = 3,855$; $p = 0,0496$) quanto receptores de progesterona ($x^2 = 8,327$; $p = 0,0039$) no tecido adiposo peritumoral de cadelas do grupo CTM (**Figuras 6 e 7**). As demais amostras não apresentaram diferença estatística.

Figura 6. Expressão do receptor de estrogênio no tecido adiposo peritumoral (A) e tumor (B) em de cadelas dos grupos CTM e Ca.

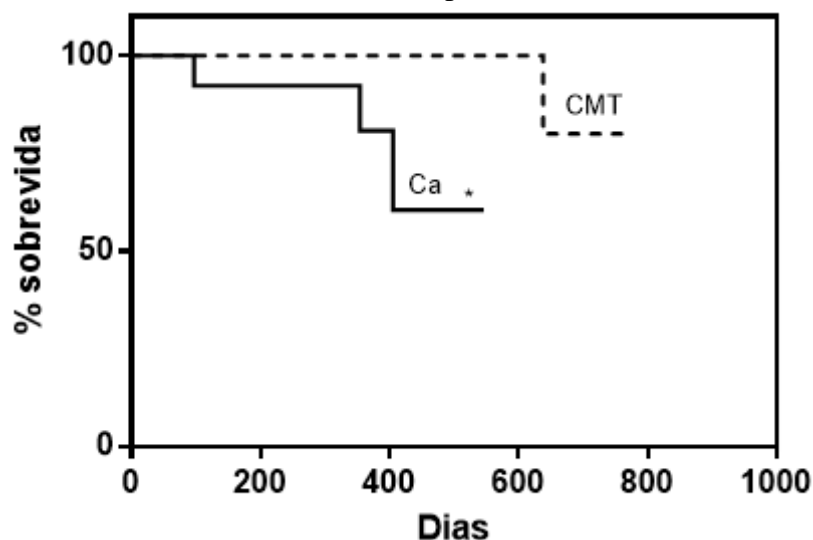


Sobrevida

Cadelas portadora de carcinomas variados (Ca) apresentaram tempo de sobrevida menor (97 dias). Estes animais evoluíram para óbito por metástase pulmonar após a mastectomia. O maior tempo de sobrevida foi 638 dias, após mastectomia, atribuído ao animal do grupo CTM, que ainda se encontra vivo.

Com base na curva de sobrevida estratificada pelos grupos avaliados, observa-se que a curva para os animais do grupo CTM apresenta diferença significativa ($p < 0,0076$) com relação ao grupo Ca (**Figura 8**).

Figura 8, Curva de sobrevida de COX dos grupos estudados CTM e Ca. Diferenças significativas quando $p < 0,05$, sendo destacadas por *.



DISCUSSÃO

Os resultados indicaram maior acometimento de cadelas entre nove e onze anos, com rara ocorrência em idades inferiores a dois anos (OLIVEIRA et al. 2003; PIRES et al. 2003; DE NARDI et al. 2007; FURIAN et al. 2007; RIBEIRO et al. 2009; CASSALI et al. 2014). Semelhante aos achados de Toríbio et al. (2012), foi observado maior acometimento de cães da raça Poodle, seguida por SRD. Segundo Hataka (2004) e Estrela-Lima (2010), essa elevada frequência é reflexo da popularização da raça e a existência de diversas linhagens e misturas entre elas no país.

Os tumores com dimensões maiores que 5 cm ainda são reflexo do diagnóstico tardio, consequente ao fato dos guardiões legais demorarem para procurar a assistência médica veterinária, muitas vezes pela cultura de associar o tamanho da neoformação a características benignas. Ferreira et al. (2009) verificaram que a maioria das lesões tumorais acima de cinco centímetros (T3) é maligna e apresenta índice de proliferação mais elevado e menor positividade para receptores de progesterona (RP), indicando independência hormonal e maior agressividade quando comparados aos tumores menores (T1 e T2). Contudo, cabe destacar que o tamanho *per si* não confirma malignidade, sendo a avaliação histopatológica, ferramenta decisiva para o diagnóstico.

A maior frequência de neoplasias mamárias em cadelas não castradas é reflexo da influência dos hormônios sexuais na etiologia do câncer de mama (SILVA et al. 2004). O maior número de cadelas não castradas, associada ao fato de ainda ocorrer a aplicação de progestágenos pode evidenciar o desconhecimento, conforme relatado pelos guardiões legais, sobre os fatores predisponentes e formas de prevenção do câncer de mama em cadelas, demonstrando ser fundamental atividades relacionadas a conscientização dos riscos e cuidados referente as neoplasias mamárias, inclusive destinados aos profissionais da área.

Quanto aos tipos histológicos, foi observado maior frequência de carcinoma em tumor misto, tipo histológico que deriva da transformação maligna do componente epitelial do tumor misto benigno (MOULTON; ROSENBLAT, 1970; DAMASCENO et al. 2012; 2014; 2016; SAAD, MILLEY, AL-KHAN, 2017). O CTM, a priori, representa um tumor de melhor prognóstico. Contudo sua graduação histológica deve sempre ser condicionada ao estado clínico do paciente e características físicas do tumor e representa correlação direta com seu potencial de malignidade. O carcinoma em tumor misto também foi o tipo histológico predominante em outros estudos (CAVALCANTI; CASSALI, 2006; RIBEIRO et al. 2009; ESTRELA-LIMA et al. 2010; TORÍBIO et al. 2012; SAAD, MILLEY, AL-KHAN, 2017).

Ao correlacionar o status reprodutivo com o status corpóreo, foi possível observar diferenças significativas no IMC, porcentagem de gordura corporal e peso dos animais castrados em relação aos animais inteiros. Weeth et al. (2007) observou que em cães não castrados a frequência de obesidade (7,2%) ou sobrepeso (14,2%) é menor quando comparado ao peso normal (78,6%). Estes dados refletem que os animais, após castração ganham peso, principalmente se não estimulados a realização de atividades que permitam gasto de energia. A obesidade surge em cães castrados devido a redução da taxa metabólica (GROSSELIN et al. 2007) e é associada a várias neoplasias, inclusive o câncer de mama (TEOH; DAS, 2016). Dentre os mecanismos sugeridos para explicar a ligação da obesidade ao câncer de mama cita-se a aromatização da androstenediona (CLELAND et al. 1985; SILTERI et al. 1987; ENGIN, 2017; MULLOLY et al. 2017; HETEMAKI et al. 2017).

O aumento da concentração sérica de estrona, à medida que a concentração de androstenediona diminui, como observado nessa pesquisa, sugere a conversão hormonal

com produção de estrógeno. Tal fenômeno foi demonstrado pela primeira vez em mulheres e se acentua em função do envelhecimento e da obesidade, pelo aumento na transcrição da aromatase P450 na gordura subcutânea, nos adipócitos e células estromais (pré-adipócitos) (CLELAND et al. 1985; SILTERI et al. 1987).

No presente estudo a maior expressão da enzima aromatase observada no tecido adiposo peritumoral e tumor de cadelas com alta porcentagem de gordura corporal associada a maior concentração do hormônio estrona sugerem que o mesmo fenômeno de aromatização da androstenediona em estrona também ocorre em cadelas, assim como na mulher.

Em mulheres após a menopausa, o tecido adiposo, que aumenta com a idade e o peso corporal, tornou-se o principal local de expressão da aromatase. As mulheres pós-menopáusicas são mais propensas a desenvolver câncer de mama do que as mulheres mais jovens, sugerindo que a biossíntese de estrogênio no tecido adiposo da mama contribui de forma relevante para o crescimento de tumores mamários (CLELAND et al. 1985; ENGIN, 2017; MULLOLY et al. 2017; HETEMAKI et al. 2017).

Nesta pesquisa também foi observada maior expressão da aromatase no tecido adiposo peritumoral de cadelas pertencentes ao grupo de tumores mais agressivos (Ca). A maior expressão da aromatase em neoplasias mamárias malignas foi observada por Lim et al. (2015) e Shin et al. (2016), sendo justificada pela maior concentração de Prostaglandina 2, NF- κ B e leptina no tecido adiposo sugerindo uma interação entre adipócito e células neoplásicas no microambiente tumoral. A avaliação da expressão dos receptores hormonais, estrógeno e progesterona não se restringiu ao tumor, abrangendo também o tecido adiposo peritumoral. Os resultados indicaram maior expressão destes receptores em adipócitos nas áreas peritumorais de cadelas com sobrepeso/obesa e no grupo constituído pelos tumores menos agressivos, possivelmente, ainda hormônio dependentes (CTM).

A função dos receptores hormonais nas neoplasias tem sido intensivamente estudada. Acredita-se que exista relação entre o número desses receptores e a capacidade proliferativa das células neoplásicas (COSTA et al. 2002). A alta concentração de hormônios sexuais no soro ou tecido adiposo tem sido associada à expressão positiva destes receptores no câncer de mama (FALK et al. 2012). Em mulheres e cadelas, neoplasias benignas na mama tendem a apresentar elevada expressão de receptores de

estrógeno e progesterona, ao contrário das neoplasias malignas que expressam esses receptores em menores concentrações (CASSALI, 2000; GERALDES et al. 2000). Isto acontece, pois com a progressão do tumor e aumento da malignidade ocorre redução da dependência hormonal e maior autonomia das células neoplásicas (GERALDES et al. 2000). Desta forma, diante dos resultados aqui observados, sugere-se a participação do tecido adiposo como fonte de hormônio, principalmente, nos carcinomas em tumores mistos, influenciando possivelmente a promoção e aumento do potencial de malignidade dos tumores.

Por fim ao realizar a análise da sobrevida e taxa de sobrevida das cadelas com carcinoma mamário variados comparadas aos animais com CTM foi possível perceber que cadelas portadoras de carcinoma em tumor misto apresentaram tempo de sobrevida maior. Este resultado se justifica, pois, a maior parte dos tumores avaliados nesse estudo receberam o diagnóstico histopatológico de CTM com graduação I, ou seja, uma neoplasia de menor malignidade comparada as demais graduações ou tipos histológicos (CASSALI et al. 2014). Considerando o menor tempo de sobrevida nas cadelas com tumores mais agressivos e a influência hormonal neste diagnóstico, é possível que a obesidade possa influenciar no tempo de sobrevida das cadelas com carcinoma mamário.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados, sugere-se que cadelas que apresentam sobrepeso no momento do diagnóstico da neoplasia mamária tendem a apresentar elevados níveis séricos de estrona, bem como alta expressão de RE, RP e aromatase em tecido adiposo peritumoral. Esta relação direta entre obesidade e índices hormonais pode influenciar as etapas iniciais de desenvolvimento tumoral e no caráter agressivo das neoplasias.

REFERÊNCIAS

- Burkholder W.J., Toll P.W. 2000. Obesity. In: Hand MS. et al. Small animal of clinical nutrition. 4.ed. Kansas: Mark Morres Institute. p.401-430.
- Cassali G., Lavallo G., Ferreira E., Estrela-Lima A., De Nardi A., Ghever C., Sobral R.A., Amorim R.L., Oliveira L.O., Sueiro F.A.R., 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., Frehse M.S., 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., Salgado B.S., Torres R. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors-2013. 2014. Brazilian Journal of Veterinary Pathology, Belo Horizonte, v. 7, n. 2, p. 38–69.
- Cassali G.D. 2000. Estudos morfológicos, imunohistoquímicos e citométrico de tumores mamários da cadela – aspectos comparativos com neoplasias da mama humana., 73f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Patologia, Escola de Veterinária, UFMG.
- Cavalcanti M.F., Cassali G.D. 2006. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas – revisão. Revista Clínica Veterinária. 61:56-63.
- Cleland W.H., Mendelson C.R., Simpson E.R. 1985. Effects of aging and obesity on aromatase activity of human adipose cells. J Clin Endocrinol Metab.60 (1):174-7.
- Costa S.D, Lange S., Klinga K., 2002. Factors influencing the prognostic role of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer. Eur J Cancer. v.38, n.10, p1329-1334.
- CR, Franceschini PH, Alessi, AC, Santana AE. Aspectos Clínicos e Cirúrgicos do Tumor Mamário Canino. Ciência Rural. 1998, v.28 n.1.
- Damasceno K.A., Bertagnolli A.C., Estrela-Lima A., Rabelo B.S., Campos L.C., Ribeiro L.G., Cassali G.D. Versican expression in myoepithelial cells from carcinomas in canine mixed mammary tumors. The Veterinary Journal (London, England. 1997). 2014. v. 200, p. 146-151.
- Damasceno K.A., Rabelo B.S., Cassali, G.D., Gamba C.O., Souza C.M.M., Campos L.C., Campos C.B., Ferreira E., Cassali, G.D. 2012. Histopathological and immunophenotypical analysis of canine mucinous rectal adenocarcinoma. Brazilian Journal of Veterinary Pathology. v. 5, p. 74-77.
- De Nardi A.B., 2007. Correlação da ciclooxigenase-2 com Ki-67, P53 e caspase-3 nas neoplasias de mama em cadelas. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 92p.
- Draper N.R., Smith H. Applied regression analysis. 2,ed. New York: John Wiley, 1981, 709p.
- Engin A. 2017. Obesity-associated Breast Cancer: Analysis of risk factors. Adv Exp Med Biol. 960:571-606.

Estrela-Lima A., Araújo M.S.S, Costa-Neto J.M, Teixeira-Carvalho A., Barrouin-Melo S.M, Cardoso S.V, Martins-Filho A.O, Serakides R & Cassali G.D. 2010. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer*. 10:256-270.

Falk R.T., Gentschein E., Stanczyk Z. Garcia Figueroa, JD. Ioffe, O.O.B. 2012. Sex steroid hormone levels in breast adipose tissue and serum in postmenopausal women *Breast Cancer Res Treat*. Jan; 131(1): 287–294.

Ferreira E, Bertagnolli AC, Cavalcanti MF, Schmitt FC & Cassali GD. 2009. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 7:01-06.

Fonseca C.S. Daleck C.R. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeito da ovariectomia como terapia adjuvante. *Ciência Rural*. 2000, v.30, n.4, p.731-735.

Furian M., Sandei C.F.C.S., Rocha E.J.N & Lot R.F.E. 2007 Estudos retrospectivo dos tumores mamários em caninos e felinos atendidos no Hospital Veterinário da FAMED entre 2003 a 2007, *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*.

Geraldes M., Gärtner F., Schmitt F.N.A. 2000. immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. *Vet Rec.*, v.146, p.1140- 1148.

Grossellin J., Wren J.A., Sunderland S.J. 2007. Canine obesity – an overview. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy*, Oxford. v. 30, p. 1-10.

Hammond M.E.H, Hayes D.F, Dowsett M, Allred D.C, 2010. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Journal of Oncology Practice*., v. 6, n. 4, p. 195–197.

Hataka A. 2004. Citologia aspirativa com agulha fina e histopatologia: valor e significado para diagnóstico e prognóstico do câncer de mama em cadelas. Botucatu – SP Universidade Estadual Paulista, Faculdade de medicina Veterinária e zootecnia. 90p. Tese de Doutorado - Área de clínica Veterinária.

Hetemäki N., Savolainen-Peltonen H., Tikkanen M.J. et al. 2017. Estrogen Metabolism in Abdominal Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue in Postmenopausal Women. *J Clin Endocrinol Metab*.

Laflamme D.P. 1997. Development and validation of a body condition score system for dogs: a clinical tool. *Canine Practice*, Santa Barbara. v. 22, n. 3, p. 10- 15.

Lim H.Y., Im K.S., Kim N.H., Kim H.W., Shin J.I., Yhee J.Y., Sur JH. 2015. Effects of Obesity and Obesity-Related Molecules on Canine Mammary Gland Tumors. *Vet Pathol*. Nov;52(6):1045-51.

Luna L.G., 1968. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3rd ed. New York. McGraw Hill.

Moulton J.E., Rosenblat L.S. 1970. Canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*. 7:289-320.

- Müller D.C, Schossler J.E.; Pinheiro, M. 2008. Adaptação do índice massa corporal humano para cães. *Ciência Rural*, Santa Maria. v. 38, n.4, p. 1038-1043.
- Mullooly M., Yang H.P., Falk R.T., Nyante S.J et al. 2017. Relationship between crown-like structures and sex-steroid hormones in breast adipose tissue and serum among postmenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* Jan 19;19(1):8.
- O'farrell V, Peachey E. 1990. Behavioural effects of ovariohysterectomy on bitches. *J Small Anim Pract*, v.31. p.595-598.
- Oliveira L.O., Oliveira R.T., Loretti A.P., Rodrigues R., Driemeier D. 2003. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta Scientiae Veterinariae.* 31:105-110.
- Perez Alenza MD, Rutteman GR, Peña L et al.. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in case-control study. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 1998, v.12, p.132-139.
- Pires M.A., Travassos F.S., Pires I. 2003. Neoplasias Em Canídeos - Um Estudo descritivo de seis anos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias.* 98:111-118.
- Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B., Sobin L.H. 1992. Laboratory methods in Histotechnology. Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology. 98-100.
- Queiroga, FL. Perez-Alenza L, Gonzalez-Gil, Silva, AG et al. Serum and Tissue Steroid Hormone Levels in Canine Mammary Tumours: Clinical and Prognostic Implications. *Reprod Dom Anim* 2015, 50, 858-865.
- Ribeiro L.G.R., Damasceno K.A., Costa Neto J.M. 2009.]Expressão da Cox-2 nos carcinomas mamários de cadela. *Veterinária em Foco.* v.6, p.134-139.
- Saad E, Milley K, Al-Khan A, Nimmo J, Bacci B et al. Canine Mixed Mammary Tumour as a Model for Human Breast Cancer with Osseous Metaplasia', *Journal of Comparative Pathology.* 2017. v.156, n.4, pp. 352-365.
- Salmeri KR, Bloomberg MS.; Scruggs SL.; Shille V. Gonadectomy in immature dogs: effects on skeletal, physical, and behavioral development. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1991, v.198, n.7, p.1193-203.
- Schneider R., Dorn CR., Taylor DON. Factors influencing canine mammary development and postsurgical survival. *Journal of the National Cancer Institute.* 1969, p. 1249-1961,
- Shin JI, Lim HY, Kim HW, Seung BJ, Ju JH, Sur JH. Analysis of Obesity-Related Factors and their Association with Aromatase Expression in Canine Malignant Mammary Tumours. *J Comp Pathol.* 2016 Jul;155(1):15-23.
- Silteri P.K., 1987 Adipose tissue as a source of hormones. *American Journal of Clinical Nutrition* 45 277-282.
- Silva A.E., Serakides R., Cassali G.D. 2004. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. *Cienc. Rural.* Santa Maria. v. 34, n. 2, p. 625-33.
- Sontas B.H, Ekici, H. 2007. Short-term effects of prepubertal ovariohysterectomy on skeletal, physical and behavioural development of dogs up to 24 weeks of age. *Acta Vet Hung*, v.55, n.3, p.379-387,

Spain C.V., Scarlett J.M., Houpt K.A. Long-term risks and benefits of early-age gonadectomy in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, v.224, p.380-387, 2004,

Tabak D. Obesidade e câncer. *Onco. Sn*, p. 22- 25, 2014,

Teoh S.L., Das S. 2016. Tumour biology of obesity-related cancers: understanding the molecular concept for better diagnosis and treatment. *Tumour Biol.* 37 (11):14363-14380.

Toríbio J.M.M.L., Estrela-Lima A., Martins-Filho E.F., Ribeiro L.G.R., D'assis, M.J.M.H., Teixeira R.G., Damasceno K.A., Cassali G.D., Neto J.M.C. 2012. Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de Salvador, Bahia. *Rev. Ceres.* v.59 n.4.

Weeth L.P., Fascetti A.J., Kass P.H., Suter S.E., Santos A.M., Delaney, S.J. 2007. Prevalence of obese dogs in a population of dogs with cancer. *American Journal of Veterinary Research, Schaumburg.* v. 68, n. 4, p. 389-398.