

THAIS DE OLIVEIRA

**PROTEINOGRAMA SÉRICO DE CADELAS HÍGIDAS E ACOMETIDAS POR
NEOPLASIAS MAMÁRIAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Leandro Abreu da Fonseca

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

O48p
2020

Oliveira, Thais de, 1992-

Proteinograma sérico de cadelas híginas e acometidas por neoplasias mamárias / Thais de Oliveira. – Viçosa, MG, 2020. 71 f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Leandro Abreu da Fonseca.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.56-67.

1. Proteínas da fase aguda. 2. Neoplasias da Mama.
3. Eletroforese. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.08969949

THAIS DE OLIVEIRA

**PROTEINOGRAMA SÉRICO DE CADELAS HÍGIDAS E ACOMETIDAS
POR NEOPLASIAS MAMÁRIAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 17 de fevereiro de 2020.

Assentimento:



Thaís de Oliveira
Autora



Leandro Abreu da Fonseca
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém; é reconhecer que ninguém chega a lugar algum sozinho.

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por me fornecer saúde, paciência e persistência nesta jornada.

Agradeço ao Bruno que tanto se esforçou para a realização deste trabalho. Que me ajudou desde a ideia inicial até a conclusão. Me deu forças quando eu precisava e nunca, nunca deixou de acreditar em mim. Não consigo expressar em palavras a gratidão que sinto! Muito obrigada meu amor !!!

Aos meus pais que desde o início da minha caminhada nesta vida, se empenharam para que eu tivesse educação de qualidade e princípios para lidar com as adversidades do cotidiano. Me ensinaram a ser persistente, focada, a amar minha profissão e realizá-la da melhor maneira possível. Muito obrigada !

Ao pessoal do LPPCV, por me aturarem nesses dois anos e por me ajudarem demais na confecção e realização deste trabalho ahahaha. Um agradecimento especial vai para o Andrés, que sempre se mostrou solícito, parceiro mesmo! Valeu gente !!!

Aos amigos que de longe estavam torcendo muito por mim, Marcela, Lara, Paulo, Jonas, Jader, Jenniffer. Jamais vou esquecer o apoio de vocês!

Ao Leandro, meu orientador, que acreditou em mim desde o primeiro momento e mesmo sem me conhecer, aceitou embarcar comigo no mestrado. Comprou minha ideia e fomos aperfeiçoando juntos até a completa realização deste trabalho.

Ao Departamento de Medicina Veterinária, Programa de Pós Graduação e NUBIOMOL que abriram as portas e me acolheram tão bem. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Aos animais que são o combustível do meu amor pela medicina veterinária e a razão de eu estar sempre querendo melhorar e aprimorar. Todo o meu esforço é por vocês !!!!

MUITO OBRIGADA !!!

RESUMO

OLIVEIRA, Thais de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Proteinograma sérico de cadelas híidas e acometidas por neoplasias mamárias**. Orientador: Leandro Abreu da Fonseca.

A resposta inflamatória é desencadeada logo após uma lesão celular e está intimamente envolvida com a resposta de fase aguda, assim como, com a síntese e liberação de proteínas inflamatórias na corrente sanguínea frente a diferentes estímulos, como os neoplásicos. Existem diferentes técnicas para identificação e quantificação dessas proteínas, entre elas a eletroforese. Esta técnica possibilita a avaliação do proteinograma sérico e auxilia a delinear o perfil inflamatório da doença. Objetivou-se com este estudo avaliar o proteinograma sérico, identificando e quantificando proteínas inflamatórias utilizando a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Essa avaliação procedeu-se em cadelas híidas e acometidas por neoplasias mamárias. No presente trabalho, 67 cadelas com idades e raças aleatórias foram estudadas. Destas, 56 (83,5%) receberam diagnóstico de neoplasia mamária e 11 (16,5%) eram híidas. Esses animais foram atendidos na rotina do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e avaliados por meio de parâmetros hematológicos, bioquímicos (renal e hepático), histopatológicos e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Para isso, os animais foram divididos em 3 grupos experimentais: grupo controle (GC) composto por cadelas híidas; grupo 1 (G1) composto por cadelas que apresentaram apenas neoplasias, tanto benignas quanto malignas; grupo 2 (G2) composto por cadelas que apresentaram neoplasia mamária e alguma comorbidade associada. Os grupos foram ainda subdivididos em dois momentos: momento 0 (M0) onde a coleta de sangue foi realizada no pré-cirúrgico imediato e momento 1 (M1), onde a venopunção foi realizada 10 dias após o procedimento cirúrgico. Foram observadas diferenças estatísticas nas concentrações soroprotéicas das seguintes proteínas: complemento C3, albumina, transferrina, alfa-1-glicoproteína ácida, apolipoproteína A1 e haptoglobina. Estes resultados indicaram a existência de resposta inflamatória importante no grupo dos animais doentes. A albumina demonstrou ser um bom marcador de lesão inflamatória, porém para que esta possa ser utilizada como potencial indicador de prognóstico, mais estudos devem ser realizados.

Palavras-chave: Proteínas de fase aguda. Câncer de mama. Eletroforese

ABSTRACT

OLIVEIRA, Thais de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Serum protein profile of healthy and affected by breast cancer female dogs.** Advisor: Leandro Abreu da Fonseca.

The inflammatory response is triggered right after a cell injury and is closely involved with the acute phase response as well as with the synthesis and release of inflammatory proteins in the bloodstream. This release occurs in face of different stimuli, such as neoplastic ones. There are different techniques for the identification and quantification of these proteins, among them electrophoresis stands out. This technique allows the evaluation of the serum proteinogram and helps to outline the inflammatory profile of the disease. The objective of this study was to evaluate the serum proteinogram, identifying and quantifying inflammatory proteins using polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). This evaluation was carried out in dogs, both healthy and affected by breast cancer. In the present study, 67 bitches with random ages and breeds were studied. Of these, 56 (83.5%) were diagnosed with breast cancer and 11 (16.5%) were healthy. These animals were seen at the Veterinary Hospital of the Federal University of Viçosa (UFV) and evaluated using hematological, biochemical (renal and hepatic), histopathological parameters and polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). For this, the animals were divided into 3 experimental groups: control group (CG) composed of healthy dogs; group 1 (G1) composed of animals that presented only neoplasms, both benign and malignant; group 2 (G2) composed of dogs who had breast cancer with some associated comorbidity. The groups were further subdivided into two moments: moment 0 (M0) where blood collection was performed in the immediate pre-surgical period and moment 1 (M1), where venipuncture was performed 10 days after the surgical procedure. Statistical differences were observed in the seroprotein concentrations of the following proteins: complement C3, albumin, transferrin, alpha-1-acid glycoprotein, apolipoprotein A1 and haptoglobin. These results indicated the existence of an important inflammatory response in the group of sick animals. Albumin has been shown to be a good marker of inflammatory injury, but in order for it to be used as a potential prognostic indicator, further studies should be performed.

Keywords: Acute phase proteins. Breast cancer. Electrophoresis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Esquema demonstrando a resposta de fase aguda nos animais.....	20
Figura 2	Traçado eletroforético das proteínas séricas de cadelas com neoplasia mamária e evidenciando o marcador de peso molecular.....	44
Figura 3	Eletroforese das proteínas séricas.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação adaptada do TNM dos tumores de mama em cadelas.....	13
Tabela 2	Estadiamento clínico de tumores de mama em cadelas.....	14
Tabela 3	Classificação das PFAs baseado na magnitude da resposta.....	21
Tabela 4	Relação entre as diferentes PFAs, magnitude de aumento e resposta de fase aguda em cão	22
Tabela 5	Média e desvio-padrão dos parâmetros do hemograma e bioquímica sérica.....	40
Tabela 6	Concentração expressa em mediana, valor máximo e mínimo das proteínas séricas em cadelas acometidas por neoplasias mamárias e pelo grupo controle.....	46
Tabela 7	Concentração expressa em mediana, valor máximo e mínimo das proteínas séricas em cadelas acometidas por neoplasias mamárias e pelo grupo controle.....	51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação histológica das neoplasias mamárias caninas.....	15
----------	--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Tumor de mama em cadelas	12
2.1.1 Influência hormonal	16
2.1.2 Biomarcadores	18
2.2 Resposta de fase aguda e proteínas de fase aguda (PFA's).....	19
2.2.1 Proteína C reativa (PCR).....	23
2.2.2 Alfa 1- glicoproteína ácida (AGP)	24
2.2.3 Ceruloplasmina (Cp).....	25
2.2.4 Haptoglobina (Hp).....	25
2.2.5 Amilóide sérica A (ASA)	26
2.2.6 Alfa 1 antripsina (α 1-Atp)	27
2.2.7 Transferrina (Trf).....	27
2.2.8 Albumina (Alb)	28
2.2.9 Complemento C3.....	29
2.2.10 Apolipoproteína A1(ApoA-1).....	29
2.3 Eletroforese de proteínas séricas.....	30
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Comissão de ética.....	33
4.2 Os Animais.....	33
4.3 Delineamento experimental	33
4.4 Análises laboratoriais	35
4.4.1 Hemograma	35
4.4.2 Análises bioquímicas	35
4.4.3 Análise radiográfica	35
4.4.4 Histopatologia	35
4.4.5 Obtenção das proteínas totais	36
4.4.6 Eletroforese de proteínas séricas em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)	36
4.4.7 Digestão enzimática das bandas no gel e preparo da amostra para análise por espectrometria de massas	37
4.4.8 Aquisição de espectros de massas de MS e MS/MS por MALDI TOF/TOF	38
4.4.9 Identificação das proteínas.....	38
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
7. CONCLUSÃO	55
8. REFERÊNCIAS	56
9. ANEXOS	68

1. INTRODUÇÃO

A elevada incidência dos casos de tumores mamários em cadelas pode ser justificada por diversas razões, entre elas destaca-se a maior longevidade destes animais. Os tutores tem se preocupado com dietas balanceadas e vacinação rigorosa. A busca por uma melhor qualidade de vida e atendimento profissional aos seus animais de estimação, tem contribuído para este aumento (ESTRALIOTO; CONTI, 2019).

O tumor de mama é a neoplasia mais frequente em cadelas, cerca de 50% a 70% possuem classificação histológica maligna e grande potencial de metástase. Neste contexto, são crescentes os estudos no setor de oncologia veterinária, onde esforços estão sendo direcionados visando a padronização do diagnóstico e avaliação prognóstica (DE NARDI et al., 2016). Além disso, fêmeas caninas são consideradas um modelo comparativo para o câncer de mama em mulheres, devido às semelhanças clínicas, epidemiológicas e comportamento biológico do tumor (ESTRALIOTO; CONTI, 2019).

Marcadores biológicos são elementos objetivamente mensuráveis nos componentes biológicos, tais como sangue, fluidos e tecidos corporais. As proteínas de fase aguda são exemplos destes marcadores biológicos encontrados quando há presença de processo inflamatório. O sistema imune inato e a resposta de fase aguda (RFA) dos animais são ativados frente a alguma injúria, tais como infecção, traumas ou neoplasias. Diante disto, o organismo pode elevar ou diminuir a concentração das proteínas séricas (ECKERSALL; BELL, 2010).

Murata et al. (2004) relatam que a quantificação das PFAs é capaz de fornecer informações importantes no que diz respeito à saúde do animal, com potencial avaliação prognóstica de diversos distúrbios orgânicos.

Nas neoplasias, as alterações nas concentrações destas proteínas séricas, estão associadas ao grau de malignidade do tumor e à capacidade de produzir metástase (MARTÍNEZ-SUBIELA, PARRA e CERÓN, 2004).

A eletroforese permite o monitoramento dos processos inflamatórios através da identificação e quantificação de proteínas (GRUYS et al., 2005). É considerada uma técnica relativamente simples, que apresenta baixo custo e requer pouca quantidade de amostra. Além disso, pode ser utilizada para a obtenção do proteinograma sérico de diversas espécies (CALAZANS et al., 2009). Em medicina, a utilização das PFAs

é relatada há décadas, porém, em medicina veterinária seus estudos são recentes, quando comparadas aos estudos desenvolvidos em humanos, e promissores (ECKERSALL; BELL, 2010).

Diante disto, este estudo visa obter o proteinograma sérico por meio da eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE) em cadelas acometidas por neoplasia mamária e relacionar as diferentes proteínas encontradas com o estadiamento histopatológico dos tumores, objetivando compreender o papel das proteínas envolvidas na doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tumor de mama em cadelas

As neoplasias mamárias apresentam a maior incidência dentre os tipos de câncer que acometem as cadelas (DE NARDI et al., 2016). Nesta espécie, 52% de todos os tumores são mamários e destes, 50% possuem características de malignidade (FELICIANO et al., 2012). Estes tumores são frequentes em fêmeas caninas e causam grande impacto em medicina veterinária, pois as neoplasias malignas podem metastatizar para linfonodos, pulmões entre outros órgãos (TECLES et al., 2009). Neste contexto, vários esforços estão sendo mobilizados visando adotar critérios de diagnóstico, entendimento do comportamento biológico do tumor e prognóstico (CASSALI et al., 2014).

Os tumores mamários afetam cadelas de meia idade a idosas, castradas e não castradas. As nodulações podem ser encontradas em uma ou mais mamas e são facilmente percebidas durante o exame físico realizado pelo Médico Veterinário ou pelo tutor do animal (CASSALI et al., 2014).

As fêmeas caninas possuem duas cadeias mamárias, compostas por cinco pares de glândulas, porém, não é incomum observarmos cadelas com quatro ou seis pares. A nomenclatura de cada mama é atribuída conforme sua localização. São elas: um par inguinal, dois pares abdominais (craniais e caudais) e dois pares torácicos (craniais e caudais) (FELICIANO et al., 2012).

A principal via para disseminação de metástase dos tumores malignos da glândula mamária é o sistema linfático (CASSALI et al., 2014). As glândulas torácicas craniais e caudais drenam para os linfonodos axilares que estão localizados na face

medial do músculo redondo maior. As abdominais caudais e inguinais drenam para os linfonodos inguinais que se encontram craniais ao osso púbico e dorsolaterais a glândula mamária inguinal. A abdominal cranial pode drenar tanto para os linfonodos axilares quanto para os inguinais (FOSSUM et al., 2008).

Feliciano (2009) relatam não haver comunicação linfática direta entre as cadeias mamárias direita e esquerda, apenas entre as glândulas homolaterais, porém, podem haver modificações no curso normal da circulação linfática devido ao processo neoplásico, e com isto, existir a comunicação entre as cadeias e até mesmo entre as glândulas adjacentes de uma mesma cadeia mamária (CASSALI et al., 2014; MIOLAT, 2015). O tratamento preconizado consiste principalmente da remoção cirúrgica do tumor, da glândula mamária acometida e dos linfonodos que fazem parte da drenagem linfática, porém diversas técnicas de mastectomia são descritas (FOSSUM et al., 2008; McGAVIN e ZACHARY, 2016; CALDAS et al., 2017).

Nesta perspectiva é de suma importância que o cirurgião tenha conhecimento da anatomia da glândula mamária e da drenagem linfática das mesmas, para que o procedimento seja realizado de forma apropriada, culminando com o melhor prognóstico para o paciente (McGAVIN e ZACHARY, 2016).

Os tumores podem-se apresentar de inúmeras formas, geralmente são nódulos circunscritos com diferentes tamanhos, aderidos ou não à musculatura. Podem estar associados a ulceração da pele e acometer uma ou múltiplas mamas simultaneamente, com diferentes tipos histopatológicos. De maneira geral, as mamas abdominais caudais e inguinais são as mais acometidas, provavelmente por possuírem maior quantidade de tecido glandular (CASSALI et al., 2009).

Aproximadamente 50% dos casos clínicos de cadelas que apresentam nódulos em mamas, os possuem de maneira múltipla. Isto se deve não somente a rapidez de progressão da doença, mas também ao adiamento do tutor em levar o animal para consulta (LANA et al., 2007).

Durante a avaliação clínica do animal, as duas cadeias mamárias e os linfonodos regionais devem ser palpados. Objetivando traçar o estadiamento clínico, o profissional deve realizar exames hematológicos, bioquímicos e de imagem. O mais comumente utilizado é o raio x de tórax, em três projeções (lateral direita, lateral esquerda e ventro dorsal) para pesquisa de metástase pulmonares, visto que o pulmão é o local de predileção das metástases oriundas de tumores mamários, além da avaliação de outras estruturas, tais como pleura e linfonodos mediastinais

(TECLES et al., 2009; FELICIANO et al., 2012).

Lesões pulmonares variando entre 6 a 8mm de diâmetro podem ser detectadas na radiografia convencional, por outro lado, lesões menores só serão visualizadas com o auxílio da tomografia computadorizada ou ressonância magnética e estão associadas ao pior prognóstico (SORENMO, 2003).

A inspeção cuidadosa dos linfonodos devem ser incluídas no exame físico visto que a presença de metástase nesses órgãos interfere diretamente no estadiamento clínico. A citologia deste órgão é indicada pois é um método seguro que possui alta sensibilidade e especificidade na identificação de metástase (LANGENBACH et al., 2001). No que diz respeito à citologia dos nódulos mamários, ela poder ser útil na exclusão de diagnósticos diferenciais, tais como tumores de pele e mastite (MISDORP et al., 1999).

Com o objetivo prognóstico, o estadiamento clínico da doença é determinado de acordo com o sistema TNM, que foi estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para tumores mamários caninos, onde: T - descreve o tamanho do tumor (em cm); N- Se há presença de metástase em linfonodos inguinais e axilares; e M- metástase a distância, principalmente em pulmão (Tabela 1 e 2) (CASSALI et al., 2017).

Tabela 1: Classificação adaptada do TNM dos tumores de mama em cadelas

Tumor (T)	T0 Sem evidência de tumor primário T1 Tumor <3 cm T2 Tumor entre 3 e 5 cm T3 Tumor >5 cm
Linfonodos regionais (N)	N0 Sem metástase linfonodal inguinal ou axilar N1 Linfonodo metastático
Metástases (M)	M0 Sem metástase a distância M1 Metástases à distância, incluindo linfonodos distantes

Fonte: Cassali et al. (2017) modificada.

Para a obtenção do estadiamento clínico, que é graduado do estágio 1 a 5 e combinando possíveis T, N e M, podemos classificar de acordo com a tabela abaixo.

Tabela 2: Estadiamento clínico de tumores de mama em cadelas

ESTADIAMENTO	T	N	M
I	T1 < 3cm	N0	M0
II	T2 3-5 cm	N0	M0
III	T3 > 5 cm	N0	M0
IV	Qualquer T	N1	M0
V	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: Cassali et al. (2017) modificada.

O tamanho do tumor pode ser considerado fator prognóstico independente, aqueles menores que 3cm estão correlacionados com melhor prognóstico em comparação aos tumores de maiores tamanhos (CASSALI et al., 2014). Um estudo realizado por Ferreira et al. (2009) concluiu que as fêmeas caninas que possuíam tumores maiores que 5cm de diâmetro eram muito mais propensas a um diagnóstico maligno e com alta taxa proliferativa se comparadas aquelas que possuíam tumores de menores tamanhos.

Outro método que visa auxiliar na avaliação diagnóstica e prognóstica é a classificação histopatológica das massas excisadas cirurgicamente, conforme exemplificado no quadro 1 (MISDORP et al., 1999; MIALOT, 2015). Este exame permite avaliar a estrutura do tecido mamário, presença de pleomorfismo, grau de diferenciação, margens cirúrgicas, número de mitoses por campos, presença de necrose, atipia celular entre outros fatores, objetivando a classificação do tumor (CASSALI et al., 2014).

Quadro 1. Classificação histológica das neoplasias mamárias caninas.

LESÕES EPITELIAIS NÃO NEOPLÁSICAS	TUMORES BENIGNOS	TUMORES MALIGNOS
<i>Hiperplasia epitelial</i>	Adenoma Adenoepitelioma	Carcinomas <i>Carcinoma in situ ductal e lobular</i> <i>Carcinoma em tumor misto</i> <i>Carcinoma papilar e tubular</i> <i>Carcinoma sólido</i>
Hiperplasia ductal	Adenoma basaloide Fibroadenoma	Tipos especiais de carcinomas
Hiperplasia lobular	Tumor benigno misto Papiloma ductal	<i>Carcinoma micropapilar</i> <i>Carcinoma lobular invasivo</i> <i>Carcinoma lobular pleomórfico</i> <i>Carcinoma secretório</i> <i>Carcinoma mucinoso</i> <i>Carcinoma rico em lipídeos</i> <i>Carcinoma de células escamosas</i> <i>Carcinoma espino celular</i> <i>Carcinoma anaplástico</i> <i>Neoplasia mamária com diferenciação sebácea</i> <i>Neoplasia mioepitelial</i> <i>Adenoepitelioma maligno</i>
Adenose		Sarcomas
Lesão celular colunar		<i>Fibrossarcoma</i> <i>Osteossarcoma</i> <i>Carcinossarcoma</i> <i>Sarcoma em tumor misto</i> <i>Outros sarcomas (Condrossarcoma, Lipossarcoma e Hemangiossarcoma)</i>
Alteração celular colunar Hiperplasia colunar celular		
Lesão colunar celular atípica		

Modificado Cassali et al., 2014

Segundo Lana et al. (2007) o tratamento de eleição é a excisão cirúrgica, com amplas margens de segurança, exceto para aqueles animais que apresentam carcinoma inflamatório.

A quimioterapia utilizando associação de Doxorubicina e Ciclofosfamida, com intervalo de 21 dias entre as sessões, totalizando quatro a seis ciclos, é relatada. Em casos que é verificada a existência de metástase pulmonar, o Paclitaxel é a droga de escolha, porém, os protocolos quimioterápicos existentes apresentam baixa ação antitumoral e por isso, não são amplamente utilizados. (WITHROW, 2013).

O prognóstico para as fêmeas acometidas pela neoplasia mamária é dependente de fatores como estadiamento clínico, tipo de tumor, idade, presença de metástase e condição clínica do animal (CASSALI et al., 2017).

2.1.1 Influência hormonal

O primeiro relato na literatura levantando a hipótese do envolvimento hormonal no tumor de mama em mulheres foi descrito por Cooper em 1896. Ele observou variações macroscópicas no tamanho do tumor em mulheres durante o ciclo menstrual, com diminuição no início do ciclo e na menopausa. Já em 1986, Beatson relatou ter havido remissão dos tumores em mulheres ovariectomizadas (FONSECA; DALECK, 2000).

Em cadelas, também há indícios do envolvimento hormonal para o desenvolvimento desta neoplasia. Como exemplo, cita-se a diferença na incidência, quando comparadas cadelas inteiras com aquelas que foram castradas em diferentes idades. Observou-se que fêmeas ovariectomizadas antes do primeiro cio, o risco de desenvolvimento do câncer de mama foi reduzido para 0,5%. Após o primeiro ciclo estral, houve um aumento de 8% e o segundo de até 26%. Após a fêmea completar dois anos e meio de idade, a castração não conferiu nenhum efeito protetivo (SCHNEIDER; DORN; TAYLOR, 1969).

A carcinogênese é composta por vários estágios que incluem iniciação, promoção, dependência e autonomia. A fase de iniciação é caracterizada pela exposição das células ao carcinógeno, com posterior mutação e formação de réplicas celulares atípicas. Diversos podem ser os fatores iniciantes, também denominados de carcinógenos, tais como radiação, substâncias químicas entre outros; mas são os endócrinos responsáveis pela promoção do tumor. Na fase de promoção, há multiplicação destes clones celulares. Na fase de dependência hormonal, as células tumorais alvo, diferem-se ainda mais das normais, pois necessitam para sua sobrevivência do estímulo hormonal. Se ele for retirado, todas as células que estão nesta fase irão desaparecer. Por fim, os tumores hormonalmente dependentes tendem a se tornar autônomos e as células se tornam indiferenciadas (BRENNAN, 1975; SILVA et al., 2004). A fase de dependência hormonal para a de independência, juntamente com a progressão do tumor, o crescimento rápido e invasivo, são características presentes nas neoplasias mamárias (BRENNAN, 1975).

No entanto, há controvérsia sobre a carcinogênese no que diz respeito às neoplasias hormônio-dependentes. Segundo Meuten (2002), diferentemente daquelas induzidas por vírus ou agentes químicos, na carcinogênese hormonal a proliferação celular não necessita de um agente iniciador específico. Os hormônios

são capazes de induzirem esta proliferação, o que resulta em mutação gênica que darão origem às células neoplásicas.

Progesterona e estrógeno exercem sua função na célula pois são capazes de atravessar a membrana celular e ligar-se a receptores específicos da célula alvo. Posteriormente, esta estrutura hormônio-receptor se movem em direção ao núcleo, ligando-se à cromatina, aumentando a produção de RNA mensageiro, ribossômico e culminando com a síntese de novas proteínas, o que irá alterar a função celular, induzindo a produção de novos receptores citoplasmáticos (JOHNSTON, 1993). Sartin et al. (1992) relataram que a presença de receptores de estrógeno no citoplasma das células tumorais de mama, indica a dependência hormonal deste câncer.

A progesterona apresenta ação carcinogênica quando seus níveis estão elevados por um período prolongado (FONSECA; DALECK, 2000). Meuten (2002) relata que a administração de progesterona exógena atua na síntese do hormônio de crescimento na glândula mamária, com hiperplasia de estruturas mioepiteliais e secretórias, predispondo a formação de tumores.

A prolactina não apresenta função de proliferação celular na glândula mamária mas na manutenção da atividade secretora, porém, relatos apontam que este hormônio estimula o crescimento do tumor mamário pois ela é capaz de sensibilizar as células ao efeito do estrógeno, facilitando sua ação mitótica, promovendo aumento no número destes (FONSECA; DALECK, 2000; SILVA et al., 2004) . Devido a isto, Diamont et al. (1978) relataram que tanto o estrógeno quanto a prolactina são necessárias para o crescimento dos tumores de mama em cadelas. Em medicina, o aumento de prolactina pode indicar pior prognóstico pois tem sido associada a agressividade e ao aparecimento de metástase (VONDERHAAR, 1999).

Em medicina veterinária, receptores de estrógeno (RE) e em menor grau os de progesterona (RP) foram identificados no tecido mamário de cadelas acometidas por neoplasias de mama benignas, malignas e naquelas que não a possuíam (MOULTON, 1990). Johnston (1993) relatam que é elevada a proporção destes receptores em cadelas com neoplasia benigna. Já aquelas que possuem carcinoma, apresentam um menor número, pois quanto maior a malignidade do tumor, menor é a dependência hormonal e a codificação dos receptores pode estar diminuída.

Em carcinomas mamários, a diminuição da relação RE/RP, tem sido associada com uma menor diferenciação celular e progressão da doença tanto em cadelas quanto em mulheres (SARTIN et al., 1992).

A importância da OH (ovariohisterectomia) como tratamento em cadelas portadoras de neoplasia mamária ainda não está bem estabelecida. Pensava-se que ao retirar a influência estrogênica durante a castração das cadelas, haveria regressão do tumor (FANTON & WITHROW, 1981) porém, estudos mostraram que mesmo realizando a OH no momento da mastectomia, não há nenhum efeito protetor no que diz respeito ao aparecimento de novas nodulações mamárias ou metástase (MORRIS et al., 1998).

2.1.2 Biomarcadores

Os biomarcadores tumorais são substâncias mensuráveis encontradas no tumor, sangue ou em fluidos biológicos. Podem ser produzidas primariamente pelo câncer ou secundariamente a ele, pelo animal, em resposta ao tumor. O crescimento e a formação das células cancerígenas podem levar ao aparecimento ou alterações na concentração dos biomarcadores (JACOBS; HASKELL, 1991; ALMEIDA et al., 2007).

Recentemente, a definição de biomarcador foi ampliada com o intuito de incluir as características biológicas que podem ser medidas e avaliadas como indicadores de processos biológicos normais ou patogênicos e as respostas do organismo frente a intervenções terapêuticas. De maneira prática, os biomarcadores incluem ferramentas que auxiliam na compreensão da causa, progressão, diagnóstico, regressão ou avaliação do resultado de um tratamento da doença. Neste contexto, as proteínas de fase aguda podem atuar como marcadores biológicos relacionados a presença de reação inflamatória (ECKERSALL; BELL, 2010).

Células neoplásicas podem produzir substâncias que são fisiologicamente sintetizadas por células diferenciadas, porém, as produzem em quantidades elevadas, sendo possível avaliar o tumor pelo aumento da sua concentração sérica. Estas substâncias podem ser identificados e quantificados por meio de testes como imunohistoquímica e exames bioquímicos (LINDBLOM; LILJEGREN, 2000) podendo auxiliar no diagnóstico, prognóstico e monitoramento da terapia empregada (JACOBS e HASKELL, 1991).

Na literatura são descritos diversos marcadores tumorais. Dentre eles o CA 15.3, BR 27.29 que pertencem ao grupo das mucinas; as proteínas oncofetais (CEA), oncoproteínas (c-erbB2, c-myc e p 53), entre outros (MOLINA et al., 2005). Os

marcadores mucinosos são aqueles que possuem complexo glicoprotéico de alto peso molecular, com localização extracelular, e são produtos do gene MUC-1 (RIVERA, 1997; SOUZA, 2002). Este gene é expresso em tecidos epiteliais e não epiteliais, além de ser responsável por características celulares como adesão, proliferação e apoptose (SOUZA, 2002).

O CA 15.3 já utilizado em medicina para acompanhamento de mulheres diagnosticados com câncer de mama, sendo atualmente o mais sensível em detectar metástase, mesmo antes do aparecimento de sinais clínicos (NAYARA et al., 2012). Em cadelas, Manueliet al. (2012) verificaram que os níveis de CA 15.3 tiveram relação positiva com o grau de malignidade histológica do tumor.

Um marcador biológico ideal é aquele que possui alta especificidade para uma determinada neoplasia e sensibilidade para ser detectado mesmo na presença de um pequeno número de células neoplásicas, auxiliando no diagnóstico precoce do câncer (ANDRIOLO, 2008), porém, nenhuma molécula possui todas as características necessárias (BICALHO, 2012).

Apesar da alta prevalência do câncer de mama em cadelas e de suas semelhanças com o câncer na mulher, o número de pesquisas relacionadas aos marcadores biológicos em medicina veterinária são escassos, reforçando a necessidade de novos estudos (CAMPOS, 2010).

2.2 Resposta de fase aguda e proteínas de fase aguda (PFAs)

A resposta de fase aguda é considerada um evento inespecífico e complexo de defesa do organismo, que age de maneira precoce frente a estímulos como infecção, neoplasia, trauma e inflamação, objetivando restaurar a homeostase (Figura 1) (CRAY, 2009). É componente do sistema de defesa inato e antecede a resposta imune adquirida (CÉRON et al., 2005).



Figura 1: Esquema demonstrando a resposta de fase aguda nos animais
Fonte: Cray, 2009 modificado.

A resposta de fase aguda é composta por três características principais. A primeira diz respeito à sua resposta extremamente rápida, antes mesmo da estimulação do sistema imunológico específico e na grande maioria dos casos, antecede os sinais clínicos. Um segundo ponto a ser mencionado é sua alta inespecificidade, pois é gerada frente a inúmeros processos que culminam com lesão tecidual. O terceiro ponto seria que sua produção e resposta, é espécie-específico. Como exemplo pode-se citar o aumento na concentração de proteína C reativa (PCR) em cães, frente a estímulos inflamatórios. O mesmo não é observado em felinos domésticos (CÉRON et al., 2005).

Por definição, a resposta de fase aguda dura apenas alguns dias, mas apesar de sua denominação remeter à processos que cursam de maneira aguda, é relatado em casos onde há estimulação persistente e as concentrações de PFAs permanecem alteradas quando comparadas à animais saudáveis (GRUYS et al., 2005). Como exemplo, cadelas acometidas por tumor de mama, que possuem variações dos valores séricos das PFA em função da inflamação tecidual crônica, além de outros fatores como o tamanho do tumor primário e a presença de metástases (TECLES et al., 2009).

As PFA's são consideradas marcadores da inflamação, auxiliando no

diagnóstico clínico e monitoramento de diversas doenças, incluindo as neoplásicas (CROSSLEY et al., 2010).

Quando desencadeada a resposta de fase aguda, podem haver alterações sistêmicas, tais como leucocitose, aumento do cortisol sanguíneo e alterações metabólicas (lipólise, catabolismo muscular e gliconeogênese) (KUSHNER; RZEWNICKI, 1994). Além disso, essa resposta inclui alterações nas concentrações séricas das proteínas de fase aguda, as quais observa-se aumento ou diminuição. As que possuem suas concentrações diminuídas, são denominadas como sendo proteínas de fase aguda negativas. Este grupo é composto principalmente pela albumina e transferrina. Já aquelas que culminam com aumento em suas concentrações, são denominadas como sendo proteínas de fase aguda positivas, tais como a proteína C reativa (PCR), amilóide sérica A (ASA), haptoglobina (Hp), alfa-1 glicoproteína ácida (AGP), ceruloplasmina (Cp) e fibrinogênio (Fib) (CÉRON et al., 2005).

As PFA's podem ainda ser classificadas como maior, moderada ou negativa, dependendo da amplitude do aumento de suas concentrações. As que se elevam cerca de 10 a 100 vezes são consideradas maiores. Este aumento é acentuado nas primeiras 48hs após o estímulo e apresenta um declínio rápido, graças a sua curta duração. Já as moderadas, aumentam de 2 a 10 vezes, de maneira progressiva e lenta, e as proteínas negativas apresentam diminuição de suas concentrações. Em cães, as PFA's classificadas como sendo maiores são representadas pela proteína C reativa e amilóide sérica A. Já as moderadas são a haptoglobina, alfa-1 glicoproteína ácida e ceruloplasmina e as negativas são a albumina e transferrina (tabela 3 e 4) (CÉRON et al., 2005; CRAY et al., 2009).

Tabela 3 : Classificação das PFAs baseado na magnitude da resposta

Espécie	Maior	Moderada	Negativa
Cães	Proteína C reativa Amilóide sérica A	Ceruloplasmina Haptoglobina Alfa-1-glicoproteína ácida	Albumina Transferrina

Fonte: Céron et al., 2005

Tabela 4: Relação entre as diferentes PFAs, magnitude de aumento e resposta de fase aguda em cães

PFA	[] basal em cães (mg/dL)	Inflamação (x [] basal)	Início da resposta (h)	Dias até o pico da []
Fibrinogênio	< 300	3 x	-	-
PCR	< 1	95 x	4	1
Amilóide S A	< 0,4	800 x	2	-
Haptoglobina	< 300	3 x	24	3 a 4
α 1-Glico ácida	< 60	3 x	-	3
Ceruloplasmina	< 5	3 x	24	4

Fonte: Stockham e Scott, 2011

Logo após o estímulo, citocinas pró-inflamatórias são liberadas. As principais são a interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral α (TNF- α). Tanto em humanos quanto na espécie canina, a IL-6 tem suas concentrações elevadas e induz a síntese de diversas PFA's. Juntamente com a IL-1, são responsáveis por alterações nas concentrações séricas de haptoglobina, proteína C reativa e amiloide sérica A (KUSHNER; RZEWNICKI, 1994; CÉRON et al, 2005).

As PFA's são produzidas predominantemente nos hepatócitos porém, há evidências que sugerem sua produção extra-hepática. Gahmberg et al. (1978) relataram em seus estudos que a glicoproteína ácida pode ser produzida por linfócitos. Este fato poderia explicar a alta concentração desta proteína em cães diagnosticado com linfoma (CÉRON et al., 2005). Além disso, há relatos de sua produção em próstata, líquido seminal, intestino, coração e rins (FOURNIER; et al., 2000; POLAND et al., 2002). Foi demonstrada a produção de amiloide sérica A em intestino, rins, adipócitos (em animais com hiperglicemia), medula óssea e glândula mamária (somente em casos de mastite) em variadas espécies de animais (ECKERSALL et al., 2001; LIN et al., 2001). Em humanos há produção da proteína C reativa pelos rins, e esta pode ser utilizada como indicador de rejeição após realização do procedimento

de transplante renal (JABS et al., 2003).

A função biológica das PFAs é variada. Estão presentes na regulação do processo imune, no reparo tecidual e na proteção do organismo contra infecções (CÉRON et al., 2005). A albumina e a glicoproteína ácida podem se ligar a vários medicamentos, gerando implicações importantes na farmacocinética, pois os níveis plasmáticos destas proteínas podem sofrer alterações frente a diversos processos, alterando a concentração plasmática livre do quimioterápico na corrente sanguínea (FOURNIER et al., 2000). A ceruloplasmina possui ação antioxidante, protegendo o organismo dos radicais livres que são liberados por células fagocíticas durante o processo inflamatório. Já a proteína C-reativa, amilóide sérica A e o fibrinogênio atuam na defesa do organismo frente a um patógeno, ocasionando mudanças fisiológicas (SANTOS; ALBERTO, 2015). Gruys et al. (2005) citam ainda que as PFAs positivas são capazes de opsonizar e aprisionar microorganismo, ativar a via do complemento e modular a resposta imune do hospedeiro.

2.2.1 Proteína C reativa (PCR)

A PCR foi a primeira proteína de fase aguda descrita. Possui peso molecular de 100kD e é composta por 5 subunidades de 20kD cada. Em humanos é considerada um marcador sensível de inflamação e dano tecidual (PEPYS et al., 2003).

Após o estímulo, a PCR é sintetizada pelos hepatócitos, sob influência de citocinas, como a IL-1, IL-6, TNF e em medicina veterinária tem se mostrado um potencial indicador de inflamação e infecção (ECKERSALL; BELL, 2010).

Em cães, está associada ao aumento precoce, declínio rápido e meia vida curta frente a diversos estímulos, tais como infecções por babesia, leishmania, parvovírus, leptospira entre outros. Após o trauma cirúrgico, é observado um aumento de 95 vezes na concentração da PCR. O pico máximo é atingido cerca de 24h depois do início do processo e suas concentrações podem ser mensuradas após 4h do início do trauma. Este aumento é mais rápido quando comparado aos humanos, onde as concentrações de PCR podem ser mensuradas cerca de 6h após o começo do fator desencadeante (CÉRON et al., 2005).

Esta proteína possui um papel importante no que diz respeito a interação entre a resposta imune inata e específica. É capaz de se ligar as bactérias, o que gera a opsonização das mesmas, levando a interações receptores específicos e captação

por fagócitos, resultando na produção de citocinas inflamatórias e modulação da função dos neutrófilos, além de ativação da via do complemento, atuando na regulação da resposta imune do hospedeiro (ECKERSALL, 2008).

2.2.2 Alfa 1-glicoproteína ácida (AGP)

A AGP possui 43 kDa de peso molecular e é caracterizada por apresentar resposta moderada frente ao estímulo desencadeante, ou seja, suas concentrações aumentam de forma lenta e permanecem elevadas por mais tempo. Esta característica auxilia na avaliação da progressão da enfermidade (ECKERSALL, 2008). Sua produção ocorre predominantemente nos hepatócitos, mas há indícios de serem produzidas por linfócitos. Isso explicaria o porquê gatos diagnosticados com linfoma, tem a concentração sanguínea elevada desta proteína. Em humanos, foi observada produção extra hepática da AGP em locais como intestino, rins, coração e leucócitos (GAHMBERG et al., 1978; CÉRON et al., 2005).

A AGP possui diversas funções, atuando na atividade imunomoduladora e se ligando as substâncias exógenas, como os fármacos. Neste contexto, essa proteína pode influenciar na farmacocinética de alguns medicamentos, pois durante a resposta de fase aguda sua concentração sanguínea irá se elevar, e ficará disponível para se ligar a fração livre dos medicamentos (ECKERSALL, 2008). Além disso, possui função de supressão do sistema imune, pois é capaz de inibir a proliferação dos linfócitos e células Natural Killer (MURATA et al., 2004).

A concentração sanguínea da AGP pode variar frente a diversos fatores, tais como idade, infecção e trauma cirúrgico. Em cães filhotes, observa-se que há um baixo nível desta proteína e que ela tende a aumentar gradativamente conforme a idade. Pode-se observar variações conforme a raça do animal e se ele está gestante ou não (YUKI et al., 2008). Kuribayashi et al. (2003) relataram níveis séricos elevados em fêmeas prenhes, quando comparadas as não gestantes. Uma hipótese levantada pelo autor, seria que este aumento é justificado pela reação inflamatória promovida pela presença do feto no endométrio do animal.

Hayashi et al. (2001) descreveram que a concentração da AGP em cadelas acometidas por piometra era cerca de quatro vezes maior quando comparada às saudáveis e que o procedimento cirúrgico, mesmo em animais que passaram por um procedimento eletivo como a OH, tiveram as concentrações desta PFA elevadas

(HAGMAN, 2011).

2.2.3 Ceruloplasmina (Cp)

A Cp é uma PFA que possui peso molecular de 151kDa e apresenta resposta moderada em cães. Sua produção ocorre nos hepatócitos (HELMAN et al., 2002).

Essa proteína possui capacidade de atuar como antiinflamatório pois minimiza a formação de radical aniônico superóxido, formado pelo leucócitos polimorfonucleares durante um processo inflamatório, e que possui potencial de causar danos teciduais, aumentando ainda mais a inflamação (BROADLEY et al., 1989). Além disso, é a principal proteína que se liga ao metal cobre (Cu) no sangue.

Em cães, houve aumento na concentração desta PFA após trauma cirúrgico que objetivou o implante de enxerto de aorta abdominal. Foi observada elevação de três a quatro vezes cerca de 96h após o início do procedimento (CONNER et al., 1988). Após cirurgia de OH em cadelas, Serin e Ulutas (2010) observaram aumento dos valores de ceruloplasmina quando comparados ao momento pré-cirúrgico, e o pico desta elevação foi registrado cerca de 72h após a cirurgia.

Em processos inflamatórios, a ceruloplasmina e a haptoglobina foram cerca de seis vezes mais sensíveis do que a contagem leucocitária e o fibrinogênio (SOLTER et al., 1991). Suas concentrações podem se apresentar elevadas frente a processos inflamatórios, virais, bacterianos e parasitários. Já uma diminuição dos seus valores pode ser notada em animais que apresentam doenças infecciosas associadas a intoxicação por cobre, desnutrição e juntamente com doenças que culminam na deficiência de absorção de nutrientes (JAIN et al., 2011; CONTIN et al., 2015).

2.2.4 Haptoglobina (Hp)

A Hp é uma proteína de fase aguda moderada em cães. Possui peso molecular de 81 kDa. É produzida pelo tecido adiposo, baço, rins e pulmão após o estímulo desencadeante (SOLTER et al., 1991).

Suas funções são diversas e a maioria de suas atividades estão relacionadas a formação do complexo hp-hemoglobina, pois se liga a hemoglobina livre no plasma dos animais, evitando danos oxidativos aos tecidos. Além disso, essa ligação minimiza a quantidade de ferro do grupo heme disponível para os microorganismos e facilita

sua remoção da corrente sanguínea, possuindo efeito bacteriostático (ECKERSALL, 2008; CECILIANI et al., 2012).

As alterações em sua concentração podem ocorrer frente a diversos fatores, incluindo os raciais. Em cães da raça Greyhound sadios, os níveis de haptoglobina se encontraram fisiologicamente mais baixos, quando comparados a cães de outras raças (COUTO et al., 2009).

A haptoglobina canina é sensível ao uso de glicocorticóide. Desta maneira, se o animal for tratado com uso de corticóide, será observado a elevação desta PFA. Cães diagnosticados com hiperadrenocorticismismo apresentaram valores aumentados desta (MARTÍNEZ-SUBIELA; 2004).

2.2.5 Amilóide sérica A (ASA)

A ASA é uma PFA com peso molecular de 15kDa. Possui três isoformas, ASA1, ASA2 e ASA3. As duas primeiras são produzidas pelo fígado logo após o estímulo que gera a resposta de fase aguda. A ASA3 é sintetizada de maneira extra-hepática como na glândula mamária de vacas acometidas por mastite, além de adipócitos (quando há hiperglicemia), medula óssea, rins e intestino. A elevação em sua concentração é relatada em diferentes espécies, servindo como um marcador biológico de inflamação (CECILLIANI et al., 2012).

Em cães, a ASA é considerada uma importante PFA pois apresenta aumento em sua concentração e rápido declínio após a resolução do fator desencadeante da resposta de fase aguda (CERÓN et al., 2005).

Tem como função inibição dos linfócitos, da proliferação de células endoteliais, agregação plaquetária e na adesão de linfócitos T na proteína da matriz celular (URIELI et al., 2000).

Dabrowski et al. (2007), relataram que a avaliação conjunta da ASA e da PCR em cadelas pode ser útil na monitoração pós-operatória das fêmeas diagnosticadas com piometra. Segundo esses autores, há elevações consideráveis nos níveis destas duas PFA's resultantes da produção de citocinas por macrófagos e neutrófilos.

2.2.6 Alfa -1- antitripsina (α 1-Atp)

A α 1-Atp possui peso molecular de 60kDa e em cães são consideradas proteínas de moderada resposta. É produzida no fígado durante a resposta inflamatória e possui como característica principal sua atividade antiprotease, ou seja, são responsáveis pela remoção das proteases liberadas por células fagocíticas, minimizando o dano tecidual (ECKERSALL, 2008).

Em cadelas saudáveis quando comparadas às não castradas, foi verificado que as não ovariectomizadas possuíam valores fisiológicos de alfa-1-antitripsina mais elevados. Esta PFA não diferiu entre animais saudáveis e hospitalizados. Cães submetidos a cirurgia de enxerto em aorta abdominal, não tiveram a concentração desta proteína elevada (HUGHES et al., 1995). Já os que passaram por procedimento de colecistectomia, tiveram os valores de alfa-1- antitripsina elevados quando comparado com humanos submetidos ao mesmo procedimento. Isso poderia ser explicado pelo fato de humanos possuírem alfa-1- antiquimiotripsina e esta estar ausente em canídeos domésticos (CONNER et al., 2006).

2.2.7 Transferrina (Trf)

A Trf é considerada uma PFA negativa, de 76kDa que possui sua concentração reduzida em 25% mediante um processo inflamatório, infeccioso ou traumático. Esta redução pode ocorrer em 24h ou de maneira gradual. O mecanismo de como ela ocorre ainda não está bem caracterizado (ECKERSALL, 2008).

É responsável pelo transporte de ferro no sangue e seus valores tem sido utilizado na avaliação da hemostasia e metabolismo do ferro nos cães. Baixas concentrações podem indicar dano em hepatócitos, inflamação crônica ou aguda, leucemias e doenças renais (ECKERSALL, 2008). Diante de quadros onde a absorção do ferro é afetada, haverá síntese de transferrina, com aumento de sua concentração sanguínea, e conseqüentemente o ferro livre não estará disponível para ser utilizado por patógenos. Desta maneira, esta PFA demonstra possuir características antivirais e antimicrobianas (CONTIN et al., 2015).

Em humanos não está bem definido os efeitos nutricionais e os da doença no que diz respeito às alterações na concentração de proteínas de fase aguda. Uma

hipótese seria que a resposta de fase aguda teria efeito mais incisivo do que o nutricional nas concentrações de albumina e transferrina. Desta maneira, baixas concentrações de transferrina seriam mais indicativas de resposta de fase aguda do que de uma dieta pobre (CERÓN et al., 2005).

2.2.8 Albumina (Alb)

A albumina constitui cerca de 35 a 50% das proteínas encontradas no plasma de cães saudáveis. É considerada a mais abundante nesta espécie, além de ser a PFA negativa mais importante. É essencial na manutenção da pressão osmótica, pois atua na correta distribuição de líquidos corporais entre os compartimentos intravascular e extravascular. Além disso, é a maior fonte de aminoácidos que pode ser utilizada pelo organismo animal (CERÓN et al., 2005; GRUYS et al., 2005).

Sua produção ocorre no fígado e após sua síntese, cerca de 40 a 50% da albumina fica retida no espaço intravascular e a outra parte é destinada à musculatura esquelética. A excreção se dá pelo trato gastrointestinal e pelos rins (GRUYS et al., 2005).

Alterações em suas concentrações sanguíneas podem ocorrer frente a diversos fatores, tais como estado de hidratação do paciente, alimentação, catabolismo protéico, doença renal e hepática, parasitismo, síndrome da má absorção intestinal, queimaduras graves, além de processos que culminam com inflamação, como em doenças infecciosas, trauma e neoplasias (CAMPOS, 2010; GRUYS et al., 2005).

Em medicina veterinária, as alterações séricas das proteínas de fase aguda culminam, na maioria das vezes, com a diminuição sérica de albumina, podendo ser observadas frente diversas patologias, como em cadelas acometidos por neoplasias mamárias (BATTISTI et al., 2013), cães com espirocercose, neoplasia esofágica (NIVY et al., 2014), erliquiose e parvovirose (KOCATURK et al., 2010).

Segundo Caldin et al. (2009) cães diagnosticados com hiperadrenocorticismismo que possuíam infecção associada, apresentaram concentrações séricas de albumina reduzidas, quando comparados aos animais saudáveis e aqueles que não apresentavam comorbidades.

Em pacientes oncológicos não é incomum observar síndrome paraneoplásica como a caquexia. Esta condição também pode ocorrer nos animais, o que causaria alterações na concentração de albumina sanguínea, sendo observado uma

diminuição da mesma (CAMPOS, 2010).

2.2.9 Complemento C3

O sistema complemento é composto por mais de 30 proteínas que podem ser solúveis no plasma ou componentes da membrana de diversos tipos celulares, tais como macrófagos e monócitos. Sua ativação ocorre por três diferentes vias: a via clássica, a via alternativa e a via das lectinas. Estas vias são ativadas por mecanismos diferentes, mas todas convergem objetivando a formação do complexo de ataque à membrana (MAC) (CECHIM, 2012).

O complemento C3 é a fração mais abundante das proteínas do sistema complemento. Sua síntese ocorre predominantemente nos hepatócitos e em menor grau por monócitos, macrófagos e células dendríticas (BOTTO et al., 1992).

Diversas são as funções atribuídas a esta proteína e seus fragmentos. O C3a, podem atuar como anafilatoxinas, induzindo a desgranulação de mastócitos e basófilos que irão liberar principalmente histamina. Já o fragmento C3b é classificado como opsonina, possuindo a capacidade de se ligarem aos receptores do complemento de células fagocíticas, aumentando a fagocitose dessas. Além disso, atua na solubilização de imunocomplexos e no processo de hemocaterese (GORGANI et al., 2008). O C3c é capaz de contribuir com a liberação de neutrófilos pela medula óssea (HONCZARENKO et al., 2005).

Irie et al. (1974) relataram que as células tumorais apresentam-se recobertas de proteínas do sistema complemento. Este fato implica tanto no reconhecimento destas células pelo sistema imune, quanto no mecanismo de resistência à resposta imunológica do hospedeiro. Cechim, (2012) relata que a adaptação das células neoplásicas aos mecanismos de resposta inata, representa o escape inicial e eficaz à resposta imune antitumoral.

2.2.10 Apolipoproteína A1(ApoA-1)

A ApoA1 faz parte da família das apolipoproteínas e é o principal constituinte protéico estrutural da lipoproteína de alta densidade (HDL). Desempenha importante papel na proteção contra doenças cardiovasculares, no transporte do colesterol, na imunidade, no combate a infecções virais e bacterianas. Possui ainda efeito

anticoagulante e antiagregação plaquetária, que potencializa o efeito cardioprotetor desta proteína (MANGARAJ et al., 2016).

A ação antitumoral da ApoA-1 é relatada por Gao et al. (2011). Segundo este autor, esta PFA atua inibindo a formação de vasos tumorais e induzindo um microambiente que é capaz de impedir a progressão tumoral. Em camundongos, a ApoA-1 injetada expressou redução no tamanho dos tumores palpáveis e metástase já desenvolvidas, além de modular o sistema imunológico do animal (NEALE, 2013).

Segundo Mangaraj et al. (2016), recentemente foi descrita a participação antitumoral desta PFA em vários modelos de câncer de pulmão, câncer de ovário, leucemia linfoblástica e melanoma, porém, eles destacam que a eficiência da Apolipoproteína A1 no setor oncológico necessita de mais estudos experimentais.

2.3 Eletroforese de proteínas séricas

Em medicina e medicina veterinária, a eletroforese das proteínas séricas é uma ferramenta com grande potencial prognóstico, sendo realizada há mais de 40 anos. É considerado um método de identificação de diversas proteínas em diferentes tipos de amostras. Embora não seja muito utilizada para diagnóstico de uma determinada enfermidade, é considerada um excelente método na detecção de processos inflamatórios de caráter agudo e crônico e mais de 200 proteínas já foram identificadas por essa técnica (ALPER et al., 1974; ECKERSALL, 2008; CRAY et al., 2009).

A técnica de eletroforese de proteínas consiste na deposição de diversos materiais biológicos (previamente preparados) como soro, plasma, urina ou líquido em uma malha de gel fino, que pode ser de agarose ou acrilamida. Corrente elétrica é aplicada, o que culmina com a migração das proteínas pelo gel, de acordo com sua carga e tamanho. O movimento destas proteínas gera bandas que podem ser quantificadas por densitometria (CALAZANS et al., 2009).

Apesar da existência de kits comerciais baseados em ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) disponíveis no mercado objetivando mensurar de maneira rápida e prática as PFA's, estes só permitem a identificação de proteínas específicas, tais como a ASA, PCR e Haptoglobina e são métodos caros (JAIN, et al., 2011).

A eletroforese tem como vantagem ser um método barato, que requer poucos microlitros da amostra a ser analisada, o resultado fica disponível em algumas horas e podem ser realizadas várias amostras ao mesmo tempo (CRAY et al., 2009).

Schmidt et al. (2011) utilizaram o método de separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamina contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), em cadelas que foram submetidas ao procedimento de OH. Em seus estudos, observaram que houve redução na concentração de ceruloplasmina, após o procedimento cirúrgico. Já Alves et al. (2010) também se beneficiaram da técnica de SDS-PAGE ao identificarem 29 proteínas no proteinograma sérico de gatas que também foram submetidas a OH, mas elas foram divididas em dois grupos distintos; aquelas que passaram por videolaparoscopia e as que foram ovariectomizadas com a técnica cirúrgica convencional. Os autores observaram elevação de ceruloplasmina, haptoglobina e alfa-1-glicoproteína ácida nas gatas que passaram por procedimento convencional.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o proteinograma sérico por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em cadelas híidas e diagnosticadas com neoplasia mamária e relacionar as proteínas encontradas com o estadiamento histopatológico dos tumores, objetivando compreender o papel dessas proteínas envolvidas no processo da doença.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar e quantificar as proteínas séricas em cadelas que apresentaram tumor de mama e as híidas.
- Avaliar os parâmetros hematológicos, bioquímicos séricos (ureia, creatinina, ALT, AST, FA, proteína total e frações), e histopatológicos destes animais.
- Verificar a relação entre as proteínas séricas e o grau histopatológico das fêmeas com neoplasia mamária.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comissão de ética

O presente trabalho bem como o seu delineamento experimental foi submetido a Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV e aprovado sob o nº 64/2018 (anexo I) e posteriormente registrado na Pró Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação sob o número 196002. Para a realização deste estudo experimental foram seguidas todas as Normas de Condutas para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do Departamento de Veterinária (DVT) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) vigentes.

4.2 Os animais

Para a realização deste estudo, foram utilizadas 69 amostras de sangue de cadelas com idade e raças aleatórias, em dois momentos de coleta, diagnosticadas com neoplasia mamária, com ou sem comorbidades associadas, e atendidas no Hospital Veterinário da UFV (HVT- UFV), além de 15 amostras de fêmeas híginas, em dois momentos de coleta, que buscaram o atendimento no HVT-UFV para a cirurgia de OH eletiva. Para a coleta do sangue destes animais, os tutores assinaram o termo de consentimento (anexo II).

4.3 Delineamento experimental

O estudo foi composto por cadelas atendidas no Hospital Veterinário da UFV, nos anos de 2018 e 2019, que foram diagnosticadas com neoplasias mamárias e também por aquelas fêmeas caninas híginas que passaram pelo procedimento de ovariectomia eletiva.

Todos os animais passaram por consulta prévia realizada por médicos veterinários residentes da UFV, onde foram avaliados clinicamente e amostras de sangue foram avaliadas laboratorialmente (hemograma completo, ureia, creatinina, ALT, AST, FA, proteína total, albumina e globulina). Para os animais que apresentavam nodulações palpáveis em região mamária, foi preenchida uma ficha oncológica pelo residente e o animal foi estadiado conforme classificação TNM. Para isso, as fêmeas passaram por avaliação radiográfica da região torácica (três

projeções: lateral direita, lateral esquerda e ventro dorsal) objetivando a pesquisa de metástases pulmonares. Após ser traçado o risco anestésico e cirúrgico, essas fêmeas foram encaminhadas para a realização de mastectomia, conforme a técnica estabelecida pelo cirurgião responsável do dia, ou OH, no caso das cadelas híginas.

No dia do procedimento cirúrgico, os animais e seus tutores foram recebidos pelo médico veterinário residente anestesista. Neste momento, assinaram o termo de esclarecimento sobre os riscos anestésicos e cirúrgicos do procedimento a qual seus animais seriam submetidos. Assinaram também, após esclarecimentos sobre este projeto, o termo de livre consentimento, autorizando que fosse coletado uma amostra de sangue antes da cirurgia e 10 dias depois, no momento da retirada dos pontos cirúrgicos.

Esta coleta foi realizada no momento que antecedeu a entrada do animal ao bloco cirúrgico, na sala de preparação da referida instituição de ensino, acima citada. Para a venopunção, todos os animais foram devidamente contidos, objetivando minimizar os riscos aos profissionais envolvidos. Foi realizada a antisepsia e procedeu-se a venopunção da jugular, cefálica ou safena, utilizando seringa e agulhas descartáveis. O sangue coletado foi transferido para tubos de 4 mL contendo EDTA 10% e para tubos de 4 mL sem nenhum adicional ao frasco e encaminhados ao Laboratório de Análises Clínicas da UFV. As amostras de sangue sem EDTA, após a coagulação completa, foram centrifugadas a 3000 rotações por minuto (rpm), durante 10 minutos. Em seguida, alíquotas de soro foram separadas e congeladas a -20°C para posterior análises bioquímicas e eletroforéticas.

Os animais foram divididos em três grupos experimentais: grupo controle (GC) composto por cadelas híginas; grupo 1 (G1) composto por animais que apresentaram apenas neoplasia, sem nenhuma comorbidade associada; grupo 2 (G2), composto por animais com neoplasia e que possuem alguma comorbidade associada. Para todos os grupos experimentais, a coleta do sangue foi realizada em dois momentos distintos; o primeiro (M0) foi imediatamente antes do animal entrar no bloco cirúrgico para ser submetido ao procedimento de mastectomia ou OH; e o segundo momento (M1) foi realizado 10 dias depois do procedimento cirúrgico, durante a retirada dos pontos que compuseram a dermorrafia.

4.4 Análises laboratoriais

4.4.1 Hemograma

Para a realização do hemograma, foi utilizado o contador automático de células (URIT 300®) e a contagem diferencial dos leucócitos foi realizada pelo método manual, após realização de esfregaço sanguíneo, com uso de coloração tipo Romanowsky e posterior leitura no microscópio ótico. O processamento das amostras ocorreram no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFV.

4.4.2 Análises bioquímicas

Os parâmetros bioquímicos séricos (uréia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT) aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), proteína total (PT), albumina e globulina), foram obtidos através da espectrofotometria em analisador bioquímico automático (HumaStar 300®) utilizando reagentes comerciais específicos.

4.4.3 Análise radiográfica

Visando o estadiamento clínico, todas as cadelas que foram acometidas por neoplasias mamárias passaram por procedimento de radiografia torácica em três projeções (lateral direita, lateral esquerda e ventrodorsal), com os devidos valores de KV e mAs previamente calculados de acordo com o tamanho do animal, objetivando pesquisa de metástases pulmonares visíveis e avaliação de estruturas torácicas.

4.4.4 Histopatologia

Logo após o procedimento cirúrgico, as nodulações coletadas das mamas das cadelas foram identificadas, acondicionadas e fixadas em solução de formol 10%. Sendo posteriormente encaminhadas ao Laboratório de Patologia da UFV, onde passaram pelo processamento de desidratação, diafanização e inclusão em parafina, emblocamento, microtomia, coloração (hematoxilina e eosina), e montagem das lâminas com resina.

A leitura destas lâminas e o laudo histopatológico foram realizadas por dois patologistas experientes.

4.4.5 Obtenção das proteínas totais

A obtenção das concentrações das proteínas totais no soro das cadelas foi definido através do método de Biureto, utilizando reagentes comerciais específicos. A leitura foi realizada no espectrofotômetro automático.

4.4.6 Eletroforese de proteínas séricas em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)

Objetivando o fracionamento dos diferentes constituintes protéicos do soro, foi realizada corrida eletroforética, utilizando o sistema vertical de eletroforese (PROTEAN II XI - VERTICAL ELETROPHORESIS CELLS® BIO-RAD) com amostras de soro previamente descongeladas, em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), de acordo com a técnica descrita por Laemmli (1970) modificada.

Neste estudo foi utilizado o gel de empilhamento a 4% e gel de separação a 10%. No preparo das amostras e fracionamento das proteínas, foram adicionados em um frasco eppendorf 10 µL de soro de cada amostra, outro frasco contendo 10 µL soro controle (proteínas identificadas por MALDI-TOF) e outro eppendorf contendo 10 µL albumina sérica bovina (BSA). Para cada amostra, foram ainda adicionados 30 µL de tampão-fosfato (PBS) e 20 µL de gel mix. Em outro frasco foi adicionado 25µL do marcador de peso molecular (Broad Range, Bio-Rad® 6,5 – 200KD). Esta mistura foi homogeneizada e aquecida sobre água em ebulição por 10 minutos e posteriormente centrifugada a 1800rpm, por 1 minuto. Uma alíquota de 10µL de cada amostra foi colocada em fossos pré-estabelecidos no gel de separação. Após, o conjunto da cuba foi submetido à corrente elétrica inicial de 100 V. Cerca de 30 minutos do início da corrida, a voltagem foi aumentada para 150 V e depois de mais 30 minutos, houve um novo aumento, para 200V, permanecendo nesta voltagem até o final da corrida, que tinha duração aproximada de 6h.

Imediatamente após o término da corrida, a fonte elétrica foi desligada e o gel retirado da placa. O mesmo foi transferido cuidadosamente para um pote de plástico e nele, foi adicionado solução de azul de Coomassie 0,2% sob agitação horizontal constante para uma coloração uniforme, por 1h. Em seguida, o corante foi retirado e o gel foi submerso em solução descorante a base de metanol para retirar o excesso de corante e melhor nitidez das bandas, por 12hs, sempre mantido em agitação

constante. Após, ele foi transferido para solução de ácido acético 5%, onde permaneceu por 16hs.

Para a determinação dos pesos moleculares e as concentrações das frações protéicas, os géis foram escaneados e as imagens submetidas ao programa de densitometria computadorizada (Software LabImage 1D, Loccus®). Para o cálculo do peso molecular serão utilizados marcadores de pesos moleculares de 116, 66.2, 45, 35, 25, 18.4 e 14.4kDa, além do um soro controle que foi previamente submetido à espectrometria de massas (MALDI-TOF) para identificação das proteínas nele presente. Visando a avaliação densitométrica das bandas protéicas, confeccionaram-se curvas de referência a partir da leitura do marcador padrão.

4.4.7 Digestão enzimática das bandas no gel e preparo da amostra para análise por espectrometria de massas

Para realizar a digestão enzimática, um gel foi preparado utilizando soro de cães. Após a corrida eletroforética por SDS-PAGE, houve separação das proteínas caninas e as bandas mais evidentes foram excisadas, picotadas em pequenas partes com o auxílio de uma lâmina de bisturi e transferidas para um eppendorf. Este processo foi feito para cada banda individualmente. Posteriormente, foi adicionado tripsina pancreática suína (TPCK), referência T-6567 Sigma Aldrich, EUA, indicada para utilização em proteômica.

A técnica de digestão das proteínas caninas foi realizada conforme descrita por Shevchenko et al. (2007), com solução de tripsina na concentração de 25 ng/ μ L, da qual foram adicionados 40 μ L em cada amostra. Com o término do processo de digestão, os peptídeos trípticos de cada eppendorf foram secos com o auxílio de uma centrífuga à vácuo, modelo AG-22331 (Eppendorf, Alemanha). Após, foram ressuspensos em 10 μ L de solução de ácido trifluoracético 0,1% e dessalinizado em ZipTip® (Millipore, USA), os quais foram eluídos em 3 μ L de acetonitrila 50 %, acidificada com ácido trifluoracético 0,1 %. Foram aplicados 1 μ L da solução de peptídeo eluído com 1 μ L de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico-HCCA (Bruker Daltonics, Alemanha), a qual foi solubilizada na mesma solução de eluição dos peptídeos, na concentração de 10 mg/mL. A calibração do método de análise MS1 foi realizada por peptídeos padrões (Peptide Calibration Standard II) (Bruker Daltonics, Alemanha), aplicados junto com a matriz nas mesmas condições.

4.4.8 Aquisição de espectros de massas de MS e MS/MS por MALDI TOF/TOF

Logo após as amostras passarem pelo processo de secagem, os espectros de MS1 e MS2 foram adquiridos em espectrômetro MALDI-TOF/TOF, modelo Ultraflex III (BrukerDaltonics). Objetivando a obtenção dos dados de MS1, foi utilizada o modo refletivo e positivo, com um intervalo de detecção de 500-3400Da. Já para a realização de MS2, usando o método LIFT no modo positivo, foram selecionados os íons com maior intensidade em relação à razão massa carga (m/z).

Os dados obtidos foram gerenciados pelo software Flex control, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha), sendo os espectros gerados das análises MS1 e MS2 processados com o auxílio do aplicativo Flex Analysis, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha). As listas de picos de MS2 foram fornecidas no formato mascot generic format (mgf) pelo aplicativo BioTools, versão 3.2 (Bruker Daltonics, Alemanha).

A identificação das proteínas caninas foram confirmadas com o Software BioTools versão 3.2 (Bruker Daltonics) e Mascot Daemon (Matrix Science, Londres, Reino Unido) contra a base de dados de proteínas para a subespécie *Canis lupus familiaris* obtida do banco de dados Uniprot (<http://www.uniprot.org>).

4.4.9 Identificação das proteínas

As listas de massas obtidas foram confrontadas contra os bancos de dados de proteínas dos táxons *Canis lupus familiaris* (download em 17/09/2018, com 29.589 entradas) ambos depositados no UNIPROT, utilizando o aplicativo MASCOT, versão 2.4.0 (Matrix Science, London, UK). Os parâmetros usados para a pesquisa foram: digestão enzimática pela tripsina com uma clivagem perdida ;permitindo uma tolerância de erro para o íon parental de 0,2 Da e para os fragmentos de 0,5 Da; carbamido metilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável.

O resultado gerados pelo MASCOT foi validado estatisticamente pelo aplicativo SCAFFOLD, versão 3.6.4 (Proteome Software INc, Portland, OR). Com o intuito de validação dos peptídeos identificados, foi aplicado o algoritmo Peptide Prophet e para as proteínas o algoritmo Protein Prophet. Como critério de aceitação foram adotados os parâmetros com o mínimo de 90% de probabilidade para a identificação, tanto das

proteínas quanto dos peptídeos, com a presença de pelo menos um peptídeo único para cada proteína identificada.

As proteínas caninas que foram identificadas pelo MASCOT e validadas pelo SCAFFOLD, denominadas como “Uncharacterized” foram analisadas usando outro software, o BLAST (Basic LocalAlignmentSearchTool), versão 2.4.0. Desta maneira foi possível identificar quais as proteínas depositadas no banco de dados protein non-redundant (nr) do NCBI apresentaram maior identidade com as sequências das proteínas “Uncharacterized”.

Os processamentos de todas as amostras desta etapa ocorreram no Núcleo de Biomoléculas (NuBioMol), localizado na UFV.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão expressos em média, com respectivo desvio-padrão e/ou em mediana, com valor máximo e mínimo. A normalidade dos dados foi verificada pelo Teste de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados que se apresentarem dentro da normalidade foram avaliados por análise de variância (ANOVA). Em seguida foi aplicado o teste paramétrico *post hoc* de Tukey quando necessário, com o objetivo de determinar diferenças significativas para cada momento de amostragem. Casos onde não tenha sido verificada normalidade, foi realizado o teste não paramétrico de Friedman. Um valor de $p < 0,05$ será considerado significativo. Foi empregado o pacote estatístico Minitab® (2019).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, foram avaliados 67 animais e um total de 84 amostras de sangue de cadelas com idades e raças variadas, híidas e com tumorações mamárias, em dois momentos de coleta. Destas, 56 cadelas foram diagnosticadas com neoplasias mamárias e 11 eram híidas (GC). Das fêmeas caninas acometidas por câncer de mama, 36 apresentavam apenas a neoplasia mamária (G1) e 20 apresentavam alguma comorbidade associada (G2), conforme demonstrado no anexo III.

Hemograma e parâmetros bioquímicos séricos de triagem pré operatória de todos os animais foram avaliados e observou-se diferenças estatísticas em parte dos parâmetros do hemograma e os grupos e entre os momentos que compõe este estudo (tabela 5).

Tabela 5. Média e desvio-padrão dos parâmetros do hemograma e bioquímica sérica

	GC (n=11)	G1 (n=36)	G2 (n=20)
Parâmetros	M0	M0	M0
Hemácias (milhões/mm³)	6,1±0,86	5,55±1,38	5,59±1,3
Hemoglobina (g/dl)	13,83±2,12	12,57±2,96	12,95±3,04
VG (%)	40,77±6,14	37,15±8,47	37,52±8,93
Proteína Total	7,27±0,83	7,43±0,78	7,47±0,74
VCM (fl)	66,81±3,82	66,80±4,49	67,17±3,64
HGM (pq)	22,62±1,82	22,93±2,27	22,98±1,42
CHCM (g/dl)	34,32±1,98	34,04±1,62	35,96±8,47
Plaquetas (x10³/mm³)	217,64±103,26	260,91±103,80	320,75±193,26
Leucócitos (/mm³)	10590,91±2660,62	10886,96±7185,36	14400±11078,52
Neutrófilos	7944±2372,57	8169,00±6861,49	11476,60±10111,96
Linfócitos	1852,28±942,00	1553,30±814,96	1422,80±587,32
Monócitos	253,82±201,93	403,96±296,75	596,75±642,50
Eosinófilos	506,18±482,58	480,00±485,86	555,95±420,70
Bastonete	150,09±213,36 ^A	179,87±368,25 ^B	344,05±599,09 ^B
Basófilo	0,0±0,0 ^B	30,22± 107,35 ^B	150,09 ± 213,36 ^A

Uréia	36,99±14,00	31,69±17,56	42,83±21,29
Creatinina	0,99±0,27	0,94±0,4	1,01±0,37
ALT	57,36±35,45	46,41±18,85	79,20±174,73
AST	64,09±46,88	49,70±9,69	49,73±26,26
FA	119,38±88,85	170,59±144,39	258,16±336,34
Proteína total(g/dl)	6,77±0,66	10,11±14,62	6,84±0,79
Albumina (mg/dl)	4,01±1,61	2,88±0,47	2,63±0,36
Globulina (mg/dl)	3,21±0,73 ^A	4,11±1,09 ^B	4,1±0,8 ^B
Relação Albumina/ Globulina	1,1±0,33 ^A	0,73±0,27 ^B	0,65±0,17 ^B

Letras maiúsculas e diferentes na mesma linha indicam diferença de M0 entre grupos

No organismo animal os tumores podem causar manifestações sistêmicas que não se restringem ao local do câncer, dentre elas destacam-se as síndromes paraneoplásicas. Estas são caracterizadas por alterações clínicas que ocorrem em locais distantes do tumor primário ou de suas metástases. Podem estar associados à liberação de fatores de crescimento, citocinas, hormônios e substâncias vasoativas, alterando a fisiologia em diferentes locais. As manifestações clínicas e laboratoriais nos animais consistem, de maneira geral, em hipercalcemia, caquexia, coagulação intravascular disseminada (CID), anemia, hipoglicemia, trombocitopenia e leucocitose neutrofílica (DUDA et al., 2017).

Alterações laboratoriais de origem paraneoplásica podem ser identificadas em diversos tipos de câncer em cães, porém, são escassos os estudos que as correlacionam com o estadiamento tumoral em cadelas acometidas por neoplasias mamárias (DUDA et al., 2017).

Segundo Bergman et al. (2013) a anemia não regenerativa leve a moderada, normocítica e normocrômica em cães é um dos sinais clínicos paraneoplásicos mais frequentes. Seu mecanismo de ação está associado à liberação de citocinas, como IL-1 e TNF- α oriundo das células tumorais. Essas citocinas diminuem a meia vida dos eritrócitos, sequestram o ferro e reduzem a liberação de eritropoietina.

Silva et al. (2014) avaliaram 161 cadelas portadoras de neoplasias mamárias e observaram que as principais alterações hematológicas foram anemia normocítica normocrômica e leucocitose neutrofílica, sendo mais frequentes nos estágios avançados da doença. Garrido et al. (2015) também observaram diminuição do

volume globular e presença de leucocitose neutrofilica em fêmeas caninas com câncer de mama. Esses dados diferem do presente trabalho pois não houve diferença estatística nos valores de hematócrito e leucócitos totais, mas notou-se aumento significativo nos valores absolutos médios de bastonetes e basófilos do grupo G1 e G2, quando comparados ao grupo controle, conforme mostra a tabela 5.

Anemia, aumento do número de leucócitos e neutrófilos estão relacionadas à cronicidade e ao estadiamento clínico da doença (SILVA et al., 2014). Em nosso estudo, não foi possível realizar a classificação TNM das fêmeas com o intuito de estadiar clinicamente, sendo realizado apenas o estadiamento histopatológico do tumor. Desta maneira, podemos supor que as fêmeas, mesmo aquelas com tumores malignos, não se encontravam em estágios mais avançados do câncer, e por isso, não apresentavam características de anemia crônica, também conhecida como anemia da inflamação, comumente encontrada em pacientes caninos com câncer (CHILDRESS, 2012).

Uma evidência que o processo inflamatório estava presente, seria a diferença observada nos níveis de bastonetes entre o G1 e G2, quando comparados aos do GC, e associados à hiperglobulinemia. Os níveis foram maiores nos grupos com câncer e comorbidades. Estes dados podem ser justificado pois cadelas que possuem neoplasias mamárias apresentam neutrofilia que é atribuída à inflamação e necrose tecidual, causados pela presença do tumor na glândula mamária. Cães que apresentam tumores malignos possuem maior liberação de fatores de crescimento hematopoiéticos, IL-1 e TNF- α causando aumento na produção de neutrófilos (CHILDRESS, 2012).

Os basófilos são células produzidos na medula óssea e sua presença é rara na circulação sanguínea dos cães. Possuem histamina e heparina, que desempenham papel nas reações de hipersensibilidade e ação anticoagulante em animais que apresentam processos inflamatórios (COELHO, 2016).

A basofilia pode estar associada a eosinofilia (JAIN, 1993). Duda et al. (2017) observaram em seus estudos a incidência de 33,3% de eosinofilia nos animais com tumor de mama, sem aumento na concentração de basófilos, pois este é um achado incomum em pacientes oncológicos. Quando observado, geralmente está associado a tumores de mastócitos (CHILDRESS, 2012), pois compartilham a mesma célula progenitora (COELHO, 2016). Não há relatos sobre sua atuação no tumor de mama, portanto mais estudos sobre a influência destas células e sua relação com o câncer,

são necessários.

Alterações nos valores de proteínas plasmáticas são achados comuns em pacientes acometidos por câncer, sendo o aumento nos níveis de globulina resultado de um processo inflamatório (CHILDRESS, 2012).

A hiperglobulinemia observada nos grupos G1 e G2 em relação GC, como exemplificado na tabela 5, pode ser justificada pois a elevação destas proteínas são achados comuns em doenças que cursam com inflamação sistêmica aguda ou crônica, de diversas etiologias, além de representarem uma resposta de fase aguda que está ocorrendo no animal (ECKERSALL, 2008). Segundo Zhang et al. (2016) níveis aumentados de globulina tem potencial para servirem como marcadores de resposta crônica à inflamação e reflete uma exposição de maneira cumulativa de várias citocinas pró-inflamatórias.

Foi relatada em cães acometidos por plasmocitoma, linfoma, leucemia linfocítica e mieloma múltiplo (OLIVEIRA et al., 2013). No que diz respeito ao câncer de mama, Bernardi et al. (2013) evidenciaram aumento nos níveis de globulina em uma cadela que apresentava osteopatia hipertrófica associada a metástase intratorácica de carcinoma mamário.

Lallo et al. (2016) observaram que a hiperglobulinemia foi uma alteração hematológica presente em seus estudos, que era composto por 246 cadelas com neoplasias mamárias e objetivava traçar o perfil hematológico das mesmas, o que corrobora com os nossos resultados.

A relação albumina/globulina (A/G) pode ser utilizada como indicador prognóstico em pacientes com câncer de esôfago, sendo que indivíduos com menor relação A/G apresentaram menor sobrevida (ZHANG et al., 2016).

Em nosso trabalho, notou-se diminuição da A/G nos grupos G1 e G2 quando confrontamos os valores com o GC. Lallo et al. (2016) encontraram resultados semelhantes ao nosso estudo, notando a diminuição desta relação em cadelas com câncer de mama maligno.

Em relação aos animais avaliados e as proteínas identificadas pela eletroforese (figura 2), notou-se diferença estatística entre os grupos e entre os momentos de cada grupo, relacionada às seguintes proteínas: complemento C3, albumina, transferrina, alfa-1-glicoproteína ácida, apolipoproteína A1 e haptoglobina (figura 3), conforme demonstrado nas tabelas 6 e 7.

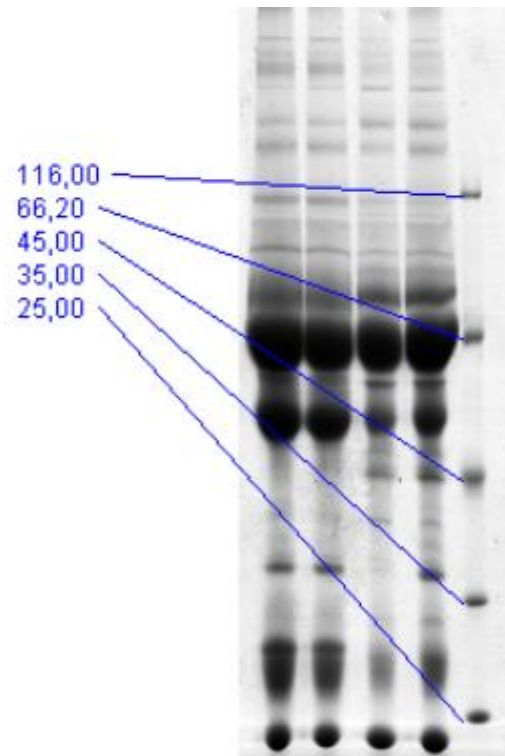
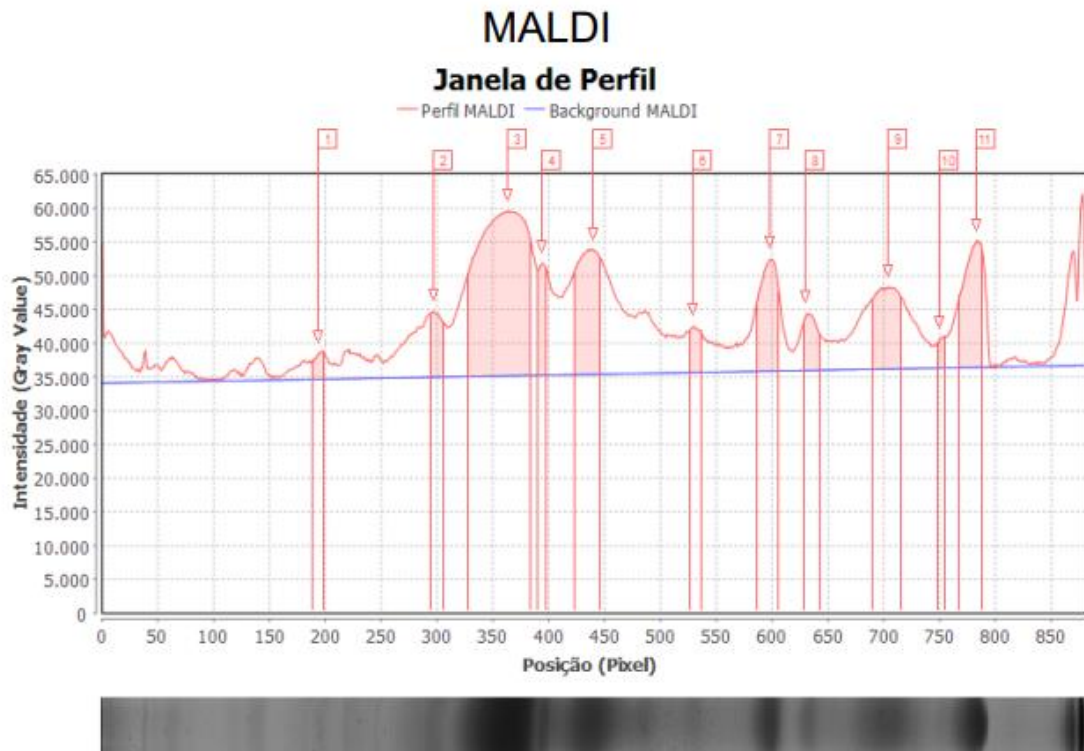


Figura 2. Traçado eletroforético das proteínas séricas de cadelas com neoplasia mamária e evidenciado o marcador de peso molecular.

Fonte: Acervo pessoal, 2019



Redução de Background: Linha de Base: 0,00, 34.093,03, 881,00, 36.718,67

Figura 3. Eletroforese das proteínas séricas. Durante a eletroforese, as bandas das proteínas se diferenciaram, geraram picos e valores de pesos moleculares que foram identificados e nominados. 1- complemento C3; 2- Transferrina; 3- albumina; 4- Alfa-1-antitripsina; 5- cadeia pesada da IgG; 6- Apolipoproteína A4; 7- Haptoglobina; 8- Glicoproteína ácida; 9- Cadeia leve da IgG; 10- pentaxina; 11- Apolipoproteína A1.

Fonte: Acervo pessoal, 2019.

Tabela 6. Concentração expressa em mediana, valor máximo e mínimo das proteínas séricas em cadelas acometidas por neoplasias mamárias e pelo grupo controle.

	GC (n=11)	G1 (n=36)	G2 (n=20)
PROTEÍNA (mg/dL)	M0	M0	M0
Proteína total	6900 (6000-8400)	7200 (6200-9600)	6700 (6200-9200)
Complemento C3 (116,99 kDa)	104,68 ^A (0-623,66)	32,20 ^B (0-858,33)	32,49 ^B (0-133,25)
Transferrina (82,80 kDa)	538,65 (333,16-1520,68)	527,84 (229,20-1045,18)	508,60 (272-29-1538,11)
Albumina (65,46 kDa)	3500 ^A (2700-8700)	2875 ^B (2100-3800)	2700 ^C (1700-3300)
α 1 Antitripsina (55,68 kDa)	345,95 (210,76-947,92)	315,76 (76,45-836,25)	344,56 (131,6-869,23)
Apolipoproteína A4 (40,76 kDa)	54,47 (0-803,08)	87,69 (0-855,43)	81,58 (0-377,32)
IgG (50,12 e 28,77 kDa)	2195,52 (732,47-2538,71)	2543,03 (228-2329,55)	2131,07 (441,93-2575,07)
Pentaxina (25,79 kDa)	0 (0-0)	0 (0-727,56)	0 (0-639,54)
Haptoglobina (36,25 kDa)	240,01 (0-1476,64)	286,30 (36,14-1156,27)	342,48 (197,67-1016,90)
Apolipoproteína A1 (22,41kDa)	1042,57 ^A (896,77-1846,68)	623,72 ^B (127,75-1622,92)	549,26 ^B (99,95-3188,43)
Glicoproteína ácida (33,96kDa)	291,66 ^A (0-820,34)	83,57 ^B (0-379,16)	64,41 ^B (0-355,87)

Letras maiúsculas e diferentes na mesma linha indicam diferença de M0 entre grupos

No que diz respeito ao complemento C3, os valores foram significativamente menores no momento M0 do G1 e no M0 do G2, quando comparados ao M0 do GC.

Não é inédito o papel do complemento na permeabilização das barreiras epiteliais, como nos epitélios renais e pulmonares. Além disso, há relatos da permeabilização do epitélio do plexo coróide, no contexto de metástase em humanos

(BOIRE et al., 2017). Boire et al. (2017) relataram a importância do complemento C3 em metástase de tumor de mama e pulmão em humanos, para o líquido cefaloraquidiano (LCR). Os autores observaram que o C3 interrompe a barreira hematoencefálica do LCR, permitindo a passagem de componentes, incluindo fatores de crescimento. Desta maneira, há modificação da composição inicial deste líquido, o que permite o desenvolvimento de células cancerígenas. Uma vez instalado o câncer, as células metastáticas leptomenígeas crescem no LCR e passam a secretar o complemento C3.

Neste mesmo estudo, os autores comprovaram por imunohistoquímica, que em mulheres acometidas por câncer de mama, há expressão elevada de C3 e que este correlacionou-se com o desenvolvimento de metástase leptomenígea clinicamente aparente. Este fato diverge do presente estudo, onde os valores encontrados em cadelas acometidas por câncer de mama, associados ou não a diferentes comorbidades, foram significativamente mais baixos do que aquelas que não possuíam a enfermidade.

Cechim (2010) relata que as células tumorais ficam frequentemente recobertas por proteínas do sistema complemento e isto é observado em diversos tipos histológicos de tumor. Markiewski et al. (2009) relatam presença destas proteínas, como as do complexo terminais C5b-9, na superfície das células de câncer de mama em humanos e no carcinoma papilífero da tireoide. Também houve ativação do complemento em pacientes com carcinoma colorretal e no líquido ascítico de mulheres acometidas por carcinoma de ovário.

Esta característica seria uma das responsáveis pela resistência destas células à resposta imune. Embora a deficiência sérica dos níveis de C3 não seja algo comumente observado nos pacientes oncológicos (CECHIM, 2010), pode-se dizer que em nossos resultados, os níveis menores encontrados em cadelas acometidas por neoplasias mamárias, antes do procedimento cirúrgico, seria atribuído a deposição do complemento sobre as células tumorais, conforme foi relatado por Irie et al. (1974).

Mariewski et al. (2009) relatam que a ativação do complemento é associada à deposição das proteínas do complemento na superfícies celulares microbianas ou em outras que necessitam de interferência imunológica. Em nosso trabalho foi observado diminuição significativa nas concentrações do complemento C3 em cadelas acometidas por câncer de mama, quando este estava correlacionado à alguma comorbidade. Diversas foram as doenças associadas, tanto de caráter agudo, crônico

ou neoplásico. Uma excessiva ativação do sistema complemento juntamente com a alta deposição das proteínas na superfície das células, poderiam justificar o nosso achado de baixas concentrações dessa proteína no soro destas cadelas.

No que diz respeito aos valores de albumina, os nossos resultados foram significativamente diferentes no M0 do GC em relação ao M0 do G1; no M0 do GC em relação ao M0 do G2 e por fim, no M0 do G2 quando comparamos ao M0 do G1.

Sabe-se que a albumina é uma das principais PFA's negativas em cães. Durante a resposta de fase aguda, sua concentração sanguínea diminui em 25% e esta queda pode ocorrer de maneira abrupta, em aproximadamente 24h, ou gradativa, levando dias (ECKERSALL,2008). Segundo Battisti et al. (2013), os níveis de albumina tendem a diminuir nos animais com câncer de mama, graças a estimulação dos tecidos, pelo tumor. Desta maneira, pode-se justificar o aumento encontrado no M0 do grupo controle quando comparado ao M0 das fêmeas caninas que possuíam apenas a tumoração mamária, ou com alguma comorbidade inflamatória associada.

Quando confrontamos os resultados encontrados no M0 dos animais que possuíam comorbidade associada ao câncer de mama com aqueles que possuíam apenas o tumor, notou-se uma diminuição significativa nas fêmeas que tinham doença associada. Tecles et al. (2009) avaliaram as concentrações séricas das PFA's em cadelas portadores de câncer de mama em diferentes estágios. Os autores observaram que a concentração sérica da albumina diminuiu nas fêmeas que apresentavam metástase. Este resultado poderia ser explicado pois os animais apresentariam uma estimulação e demanda maior de PFA, assim como aqueles que possuem associados à condição neoplásica alguma enfermidade inflamatória, conforme os animais do G1 e G2. Por ser uma proteína negativa, é esperado que seus valores diminuam conforme o estímulo progrida.

Outra possibilidade se daria através de mecanismos compensatórios. Reações inflamatórias peritumorais levam à ativação de macrófagos e liberação de citocinas pró-inflamatórias, que causariam diminuição da síntese de albumina e promoveria a produção de outras PFAs, como a PCR e a haptoglobina, que se apresentaram elevadas em cadelas com câncer de mama (BATTISTI et al., 2013). Juntamente, há aumento da permeabilidade vascular, com conseqüente saída para o espaço extravascular (PLANELLAS et al., 2009; BATTISTI et al., 2013). Desta maneira, as concentrações séricas destas proteínas estariam baixas no sangue dos animais, corroborando com os nossos resultados.

A alfa-1 glicoproteína ácida é uma proteína de resposta moderada que se altera devido a processos inflamatórios, aumentando a secreção de IL-1. Apresenta propriedades imunomoduladoras e atua na cicatrização dos tecidos (CERÓN et al., 2005).

Em nosso trabalho os níveis da alfa 1 glicoproteína ácida (AGP) aumentaram significativamente no momento M0 do controle, quando comparado ao momento M0 daquelas fêmeas que possuíam apenas o tumor e aquelas que apresentavam tumor com comorbidade. Cerón et al. (2005) relatam que a AGP possui a capacidade de se ligar a diversas drogas e agentes inespecíficos, desta forma, ao se ligarem a componentes infecciosos ou neoplásicos, a sua detecção no soro poderia estar diminuída, o que coincide com os resultados encontrados no nosso estudo.

Thougaard et al. (1999) verificaram que as concentrações séricas de AGP no soro de cães que apresentavam neoplasias mamárias benignas e malignas não apresentaram níveis mais altos quando comparados com os animais do grupo controle. Este resultado é similar ao encontrado em nosso estudo, onde os animais portadores de neoplasia e associados a comorbidades, apresentaram valores estatisticamente menores do que os do grupo controle. Segundo Cerón et al. (2005) a magnitude do seu aumento está relacionada com o tipo de estimulação e o não aumento nos níveis de AGP em animais com câncer de mama, poderia estar relacionado a baixa estimulação exercida pelas células tumorais no que diz respeito a esta proteína.

Kogika et al. (2003) trabalharam em seus estudos com cães infectados com o vírus causador da parvovirose canina que apresentavam sinais clínicos de gastroenterite hemorrágica aguda. No trabalho, verificaram níveis aumentados de AGP na circulação sanguínea dos animais e o pico desta elevação foi registrado cerca de três a quatro dias após o início do processo inflamatório e se manteve elevado por até 12 dias. Segundo o autor, esta PFA pode ser usada como parâmetro para avaliação de processos inflamatórios de caráter agudo, porém, a neoplasia mamária possui caráter crônico de estimulação, não sendo observado seu aumento no grupo doente.

Segundo Yuki et al. (2010), as concentrações séricas desta proteína em humanos pode diminuir em casos de insuficiência hepática e desnutrição, graças à fatores que prejudicam sua síntese, além de nefropatias, devido à excreção excessiva. Em contraste, cadelas que possuem câncer de mama, geralmente se encontram em

bom escore corporal (exceto no carcinoma inflamatório mamário) e no presente trabalho, não houve doenças hepáticas e renais que impactaram significativamente nestes animais.

Hayashi et al. (2001) relataram que animais ovariectomizados, os que realizaram osteossíntese ou cirurgia de gastrotomia percutânea mostraram valores de AGP aumentados. Este resultado diverge dos encontrados no nosso estudo, pois no momento pós-operatório do grupo controle e dos animais doentes, não houve diferença significativa (tabela 7), porém, os nossos valores pós cirúrgicos foram mensurados 10 dias após o procedimento e não imediatamente após o término da cirurgia, como no trabalho supracitado.

A apolipoproteína A1 (ApoA1) é o principal constituinte protéico da High Density Lipoproteins (HDL) e sua função está relacionada ao transporte do colesterol, o retirando das células e transportando-o até o fígado para excreção. Seu papel no câncer ainda necessita de mais investigação, mas foram observados níveis diminuídos desta lipoproteína no soro de pessoas com câncer de pâncreas, gástrico e de ovário (EHMANN et al., 2007; DIEPLINGER et al., 2009; LIN et al., 2017).

Existem evidências que a concentração de lipídeos no sangue e componentes de lipoproteínas influenciam no risco de desenvolvimento de câncer de mama em mulheres. Lin et al. (2017) compararam a presença de ApoA1 no plasma de 299 mulheres acometidas por neoplasia mamária e 200 saudáveis. Observaram que os níveis desta proteína foram mais baixos em mulheres com câncer em relação as saudáveis, e que estas mulheres eram mais propensas a terem linfonodos axilares com metástase e em estágios mais avançados da doença. Esses resultados corroboram com os encontrados em nosso estudo, onde foi observado índices maiores nas cadelas do grupo controle, quando comparada as que possuíam nodulações mamárias associadas ou não a outras enfermidades. Notou-se também que os níveis foram significativamente maiores no momento M1 das fêmeas que possuíam apenas tumor de mama, quando comparados ao MO, ou seja, antes da cirurgia de mastectomia, conforme demonstrado na tabela 7.

Estes resultados podem ser justificados pois a ApoA1 retarda o desenvolvimento do tumor através de dois mecanismos distintos. Ela é capaz de inibir a angiogênese associada ao tumor e também é responsável pela redução na expressão proteica da MMP9, que é responsável pela degradação da matriz necessária para a metástase (BAUVOIS, 2012). Além disso, Lee et al. (2017) relatam que ao mensurar

a quantidade de apolipoproteína A1 no tecido mamários, observaram que os normais secretavam maiores quantidades desta lipoproteína, desta maneira, é esperado que os níveis desta PFA sejam maiores em animais saudáveis em relação ao grupo doente.

Tabela 7. Concentração expressa em mediana, valor máximo e mínimo das proteínas séricas em cadelas acometidas por neoplasias mamárias e pelo grupo controle.

PROTEÍNA (mg/dL)	GC (n=11)		G1(n=36)	
	M0	M1	M0	M1
Proteína total	6900 (6000-8400)	6500 (6400-6800)	7200 (9600-6200)	7000 (6600-9000)
Complemento C3 (116,99 kDa)	104,68 (0-623,66)	40,63 (0-92,58)	32,20 (0-858,33)	38,72 (16,14-904,89)
Transferrina (82,80 kDa)	538,65 (333,16-1520,68)	595,01 (461,69-855,34)	527,84 ^a (229,20-1045,18)	726,04 ^b (525,58-962,25)
Albumina (65,46 kDa)	3500 (2700-8700)	3450 (3300-3800)	2875 ^a (2100-3800)	3400 ^b (2900-3700)
α 1 Antitripsina (55,68 kDa)	345,95 (210,76-947,92)	368,02 (190,82-406,92)	315,76 (76,45-836,25)	446,42 (253,4-564,08)
Apolipoproteína A4 (40,76 kDa)	54,47 (0-803,08)	365,22 (93,13-735,58)	87,69 (0-855,43)	119,40 (71,61-170,56)
IgG (50,12 e 28,77 kDa)	2195,52 (732,47-2538,71)	2149,95 (930,23-1547,16)	2543,03 (228-2329,55)	1181,06 (716,11-2373,44)
Pentaxina (25,79 kDa)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-727,56)	0 (0-0)
Haptoglobina (36,25 kDa)	240,01 (0-1476,64)	193,71* (0-1016,90)	286,30 (36,14-1156,27)	494,10* (213,07-939,29)
Apolipoproteína A1 (22,41kDa)	1042,57 (896,77-1846,68)	955,57 (933,26-1474,78)	623,72 ^a (127,75-1622,92)	1043,41 ^b (627,95-1363,10)
Glicoproteína ácida (33,96kDa)	291,66 (0-820,34)	0 (0-205,52)	83,57 (0-379,16)	61,08 (0-193,81)

Letras minúsculas e diferentes na mesma linha indicam diferença entre M0 e M1 de cada grupo
Asterisco(*) indicam diferença entre os M1 dos grupos

No presente trabalho observou-se diminuição significativa nos valores de albumina entre grupos e entre os momentos. Quando comparamos os momentos antes da intervenção cirúrgica (M0) e após o procedimento de mastectomia (M1) dos

animais que possuíam apenas tumor de mama (G1), notou-se a diminuição na concentração sérica no M0. Este fato pode ter ocorrido pois a presença da massa tumoral no tecido mamário gera um importante estímulo inflamatório que diminuiu conforme a massa tumoral foi retirada, e por se tratar de uma PFA negativa, é esperado que sua concentração sérica seja menor no M0.

Segundo Zhang et al. (2016) a hipoalbuminemia observada em pacientes oncológicos, não é apenas um indicador do estado nutricional do paciente, mas também está relacionada à inflamação crônica. Além disso, baixos valores de albumina podem ser resultantes da supressão imunológica por citocinas e, quando associada com a hiperglobulinemia, indica uma maior resposta inflamatória sistêmica, o que estaria associada à um pior prognóstico.

Fleck et al. (1985) relataram que em pacientes humanos, foi observado no pós cirúrgico a saída da albumina para o espaço extravascular aproximadamente sete horas após o procedimento. No presente trabalho, a avaliação pós cirúrgica foi realizada 10 dias após a cirurgia, supondo que este poderia ser um dos indícios dos nossos resultados encontrados no M1.

Por ser classificada como sendo uma PFA negativa, a transferrina (Trf) se comportou de maneira semelhante à albumina no presente trabalho, apresentando diminuição significativa entre os momentos M0 e M1 do grupo 1. Sabe-se que a Trf é uma proteína responsável pelo transporte de ferro plasmático e seus valores sanguíneos podem decrescer diante de vários fatores, tais como anemia, infecções crônicas, doenças hepáticas crônicas e neoplasias (GUERRA, 2008). Neste contexto, pode-se justificar que em condições neoplásicas, como a dos animais do G1, e devido a estimulação inflamatória que o tumor exerce na glândula mamária, espera-se uma diminuição na concentração da Trf no momento 0, ou seja, antes da retirada da massa tumoral. Além disso, a má ingestão de alimento é uma condição comum em pacientes oncológicos, o que contribuiria para a diminuição dos níveis encontrados, pois a transferrina atua no controle da absorção do ferro intestinal e sua distribuição pelo organismo animal, porém, nosso estudo não avaliou o escore corporal dos animais.

A hepcidina é uma proteína de fase aguda produzida principalmente pelos hepatócitos. Em condições fisiológicas é regulada pela concentração plasmática de ferro. Atua na regulação da absorção de ferro no duodeno, bem como sua liberação pelos macrófagos. Em situações patológicas como infecção e inflamação, há liberação de citocinas, principalmente a IL-6, que são capazes de estimular a produção de

hepcidina (GANZ, 2013). Portanto, altas concentrações desta proteína culminam com diminuição do ferro circulante. Já baixas concentrações resultam em aumento do ferro (ANTUNES; CANZIANI, 2016). Nosso estudo não avaliou os níveis de hepcidina nas cadelas, mas pode-se supor que por ela exercer influência no metabolismo do ferro e por ter suas concentrações aumentadas diante de processos inflamatórios crônicos, haveria uma diminuição do ferro circulante, conseqüentemente, diminuição dos valores de transferrina em cadelas acometidas por câncer de mama, porém, em medicina veterinária os estudos sobre essa PFA em pacientes oncológicos são escassos.

A haptoglobina é considerada uma PFA moderada em cães e tem sido usada como biomarcador inespecífico da inflamação (SCHMIDT et al., 2018).

Battisti et al. (2013) observaram em seus estudos valores aumentados da haptoglobina em cadelas que possuíam neoplasia mamária, independente se histologicamente foram classificadas como maligna ou benigna, quando comparadas ao grupo controle. De forma semelhante, Tecles et al. (2009) e Planellas et al. (2009) também encontraram resultados similares, ou seja, observaram diferença significativa nos valores da Hp em fêmeas com câncer de mama, porém, os níveis foram maiores naquelas que possuíam tumores malignos. Estes achados poderiam ser justificados pois a maior expressão de ciclooxigenase 2 (COX 2) no carcinoma mamário leva a maior produção da PFA, através da estimulação destes receptores, além da maior necrose tecidual provocada pelos tumores malignos (BASTTITI et al., 2013; TECLES et al., 2009; PLANELLAS et al., 2009).

Estes resultados diferiram do presente trabalho pois notou-se apenas diferença estatística quando comparamos o momento pós-cirúrgico do controle com o das cadelas que apresentavam apenas o tumor (G1), sem nenhuma comorbidade associada. No momento pré-cirúrgico, não houve diferença estatística.

Algumas condições são encontradas com frequência em cães com neoplasias, a hemólise é uma manifestação comumente observada nestes animais. Cadelas com carcinoma mamário podem apresentar anemia hemolítica microangiopáticas e imunomediadas (DUDA et al., 2017). Neste contexto a não diferença estatística no momento pré-operatório entre os grupos e entre os momentos pode ser atribuída à hemólise estimulada pelo tumor, através da secreção de citocinas como a IL-1, TNF- α , causando a diminuição da haptoglobina, pois a mesma estaria ligada a hemoglobina, formando um complexo protéico que será retirado da circulação

sanguínea graças a ação do sistema mononuclear fagocitário, onde ocorrerá a reciclagem do ferro, pelo processo de hemocaterese (DUDA et al., 2017; VIEIRA et al., 2013), equiparando seus valores com os animais do grupo controle. Segundo Menegazzo (2014), a formação deste complexo é capaz de reduzir drasticamente as concentrações sanguíneas de Hp. Desta maneira, podemos supor que mesmo não observando diferença estatística nos valores das células que compõem a linhagem vermelha do sangue, pequenas concentrações de hemoglobina livre já foram suficientes para diminuir os níveis desta PFA no soro das cadelas do nosso estudo.

É sabido que os níveis de Hp podem sofrer alterações frente ao trauma cirúrgico. Neste contexto, o pico observado tanto nos canídeos como em humanos, ocorre cerca de 120h após a cirurgia, com posterior declínio gradual. Cadelas ovariectomizadas devido a piometra que não tiveram alterações pós operatórias, apresentaram níveis de Hp semelhantes ao pré cirúrgico, já aquelas que apresentaram complicações, demonstraram elevação na concentração desta proteína (CONNER et al., 1988; DABROWSKI et al., 2009). Serin e Ulutas (2010) observaram que cadelas submetidas a OH tiveram aumento de sua concentração cerca de 48h a 72h após o procedimento. Já Dabrowski et al.(2007) relataram este aumento após 72h e 120h da cirurgia, quando comparado aos valores pré cirúrgicos.

De forma semelhante, Schimidt et al. (2018) avaliaram valores de Hp 24h, 48h e 7 dias após cadelas serem submetidas ao procedimento de OH usando a técnica convencional e minimamente invasiva. Os valores de haptoglobina foram maiores 24h e 48h após, e retornaram a normalidade 7 dias depois. Estes dados foram diferentes dos encontrados no presente trabalho que demonstrou aumento significativo 10 dias após a cirurgia de mastectomia. Pela Hp ser classificada como PFA moderada, este aumento poderia estar relacionado a resposta inflamatória acentuada, diante da magnitude do procedimento cirúrgico (Schmidt et al. 2018) e, portanto, houve maior resposta no que diz respeito a intensidade inflamatória.

Pela literatura, nota-se que o tempo de aumento desta PFA é muito variado e depende de diversos fatores, como por exemplo, o tipo de procedimento cirúrgico além da enfermidade relacionada, desta maneira, a investigação de mais momentos seria indicada.

7. CONCLUSÃO

Em nosso estudo o comportamento observado das proteínas foi variável. Alterações importantes nas concentrações de algumas proteínas, como as do complemento C3, albumina, transferrina, alfa-1-glicoproteína ácida, apolipoproteína A1 e haptoglobina nos animais do grupo que apresentavam tumor de mama e os que tinham alguma comorbidade associada, indicam ter havido resposta de fase aguda induzido pela doença. Contudo, deve-se ressaltar que os animais utilizados neste trabalho foram oriundos da rotina de atendimento do Hospital Veterinário da UFV e, devido a isto, vários foram os momentos de evolução do quadro neoplásico, não sendo possível traçar com precisão o início do processo inflamatório. Desta maneira, a avaliação clínica e a coleta foram realizadas em diferentes momentos, o que poderia refletir no comportamento das proteínas estudadas.

A albumina foi um importante marcador inflamatório quando comparamos os grupos e os momentos trabalhados, porém, um ensaio com um número maior de momentos pós cirúrgicos seria necessário, objetivando traçar um perfil prognóstico desta doença nos animais acometidos.

Não foi possível realizar uma comparação entre as proteínas e a classificação histopatológica dos tumores mamários, devido ao pequeno número de animais que apresentaram neoplasias benignas, reforçando assim a importância do câncer de mama na medicina veterinária.

8. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. R.; PEDROSA N. L.; LEITE J. B.; FLEMING T. R. P. Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 53 (3), p. 305-316, 2007.
- ALPER, C. A. Plasma Protein Measurements as a Diagnostic Aid New England. **Journal of Medicine**, v.291, p. 287-290, 1974.
- ALVES, A. E.; RIBEIRO A. P. C.; DiFILIPPO P. A.; APPARICIO M. F. Leucograma e concentrações séricas de proteínas de fase aguda de gatas submetidas à ovariectomia convencional ou por videolaparoscopia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 1, p. 86–91, 2010.
- ANDRIOLO, A. Marcadores tumorais bioquímicos circulantes. In: **1o Congresso Nacional de Saúde da Faculdade de Medicina da UFMG**, 2008.
- ANTUNES, S. A.; CANZIANI, M. E. F. Hcpidin: an important iron metabolism regulator in chronic kidney disease. **Jornal Brasileiro de Nefrologia** , v.38, p. 351-355, 2016.
- Bergman P.J. 2013. Paraneoplastic syndromes, p.83-97. In: **Withrow S.J., Vail D.M. & amp; Page R.L.** (Eds), **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 5th ed. Saunders Elsevier, St Louis.
- BERNARDI, C. A.; SANCHES O. C.; GOMES D. R.; YAMASAKI L. Osteopatia hipertrófica associada à metástase intratorácica de carcinoma mamário em cadela: relato de caso. **Colloquium Agrariae**, v. 9, n. 2, p. 90–102, 2013.
- BICALHO, S. R. **Quantificação sérica do marcador tumoral CA 15.3 em cadelas hípidas por quimioluminescência**. Dissertação (Mestrado) -Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 2012.
- BOIRE, A.; ZOU Y.; CHIEH J.; MACALINAO D. G. Complement component 3 adapts the cerebrospinal fluid for leptomeningeal metastasis. **Cell**, v. 168, n. 6, p. 1101-1113.e13, 2017
- BRENNAN, M. J. Endocrinology in Cancer of the Breast: Status and Prospects.

American Journal of Clinical Pathology, v. 64, n. 6, p. 797–809, 1, 1975.

BROADLEY, C.; HOOVER, R. L. Ceruloplasmin reduces the adhesion and scavenges superoxide during the interaction of activated polymorphonuclear leukocytes with endothelial cells. **The American Journal of Pathology**, v. 135, n. 4, p. 647–55, 1989.

CALAZANS, S. G.; DALECK C. R.; FAGLIARI J. J.; REPETTE C. F.; DE NARDI A. B.; CASTRO J. H. T.; FERNANDES S.C; CESAR J. R. F.; RODIGHIERI S. M. Proteinograma sérico de cães sadios e com linfoma obtido por eletroforese em gel de poli-acrilamida (SDS-PAGE). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1044–1048, out. 2009.

CALAZANS, S. G.; DALECK C. R.; FAGLIARI J. J.; REPETTE C. F.; GINNARDI A. B. Proteinograma sérico de cães sadios e com linfoma obtido por eletroforese em gel de poli-acrilamida (SDS-PAGE). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1044–1048, out. 2009.

CALDAS, S. A.; OLIVEIRA M. C.; OLIVEIRA L. C. Advantages of quadrantectomy in bitches with mammary neoplasm. **Revista Brasileira de Medicina Veterinaria**, v. 39, n. 3, p.190–197, 2017.

CAMPOS, C. L. **Avaliação de marcadores tumorais séricos em cadelas com e sem metástase em câncer de mama**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

CASSALI, G. D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors - 2013. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, 7 (2), 38-69 2014.

CASSALI, G. et al. Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary **Congress WSAVA 2009**, São Paulo 2009.

CASSALI, G.D.; FERREIRA, E.; CAMPOS, C.B. **Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo, SP: Medvet, 2017. 209 p.

CECHIM, G. **Síntese de proteínas do sistema complemento por células dendríticas derivadas de monócitos na presença de sobrenadante tumoral.** Dissertação. Universidade de São Paulo, 2010.

CECILIANI, F.; CERON J. J.; ECKERSALL P. D.; SAUERWEIN H. Acute phase proteins in ruminants. **Journal of Proteomics**, v. 75 p. 4207-4231, 2012.

CERÓN, J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: Current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 2, p. 85–99, 2005.

CHILDRESS, M. O. Hematologic abnormalities in the small animal cancer patient. **Veterinary Clinics of North America- Small Animal Practice**, v.42, p. 123-155, 2012.

COELHO, P. S. **Influência do tempo, temperatura e recipiente de estocagem nas características do hemograma de cães adultos hípidos.** Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Câmpus de Jaboticabal, 2006.

CONNER, J. G.; ECKERSALL P. D.; FERGUSON J.; DOUGLAS T. A. Acute phase response in the dog following surgical trauma. **Research in Veterinary Science**, v. 45, n. 1, p. 107–110, 1988.

CONTIN, C. M.; COELHO S.; OLIVEIRA J. Proteínas de fase aguda: revisão deliteratura. **Investigação**, v. 14, n. 2, 2015.

COUTO, C. G.; CERON J. J.; PARRA M.D. Acute phase protein concentrations in retired racing Greyhounds. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 2, p. 219–223, 2009.

CRAY, C.; ZAIAS, J.; ALTMAN, N. H. Acute phase response in animals: A review. **Comparative Medicine**, v. 59, n. 6, p. 517–526, 2009.

CROSSLEY, R.; COLOMA A.; RÍOS C.; GONZÁLES C. Determinación de proteína C-reactiva en hembras caninas con tumores mamarios benignos y malignos. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 42, n. 1, p. 101–105, 2010.

DABROWSKI, R.; WAWRON, W.; KOSTRO, K. Changes in CRP, SAA and haptoglobin produced in response to ovariohysterectomy in healthy bitches and those with pyometra. **Theriogenology**, v. 67, n. 2, p. 321–327, 2007.

DE NARDI, A. B.; FERREIRA, T. M. R.; DA ASSUNÇÃO, K. A. In: Neoplasias mamárias. **Oncologia em cães e gatos 2. ed.** Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 726-756.

DIAMOND, E. J.; KHAN S.; KOPRAK S.; HOLLANDER V. P. Inhibition of ovariectomy-induced rat mammary tumor regression by a mammosomatotropic tumor. **Cancer research**, v. 38, n. 8, p. 2239–45, 1978.

DUDA, N. C. B.; VALLE S. F.; MATHEUS P. J.; ANGELE C. N. Paraneoplastic hematological, biochemical, and hemostatic abnormalities in female dogs with mammary neoplasms. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 479–484, 1 maio 2017

ECKERSALL, P. D. Proteins, Proteomics, and the Dysproteinemias. In: **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6. ed. San Diego: Academic Press, p. 117–156, 2008.

ECKERSALL, P. D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **Veterinary Journal**, 2010. <doi: 10.1016/j.tvjl.2010.04.009>

ECKERSALL, P. D.; YOUNG F. J.; McCOMB C.; HOGARTH C. J.; SAFI S. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. **Veterinary Record**, v. 148, n. 2, p. 35–41, 2001.

ESTRALIOTO, B. L. C. T.; CONTI J. B. Câncer de mama em cadelas-atualidades do diagnóstico e prognóstico ao tratamento cirúrgico, **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 29, p.444, 2019.

FANTON, J.W., WITHROW, S.J. Canine mammary neoplasia: an overview. **California Veterinarian**, v. 7, p. 12-16, 1981.

FELICIANO M. A. R.; JOAO C.F.; CARDILLI D. J. Neoplasia mamária em cadelas-

revisão de literatura **Revista científica eletrônica de medicina veterinária-ISSN: 1679-7353**, 2012 .

FERREIRA, E.; BERTANGNOLLI A. C.; CAVALCANTI M. F.; SCHIMITT F. C.; CASSALI G. D. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, n. 4, p. 230–235, 2009.

FLECK, A.; HAWKER F.; WALLACE P. I. Increased vascular permeability: a major cause of hypoalbuminaemia in disease and injury. **The Lancet**, v. 325, n. 8432, p. 781–784, 1985.

FONSECA, C. S.; DALECK C. R. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovariectomia como terapia adjuvante. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 4, p. 731-736. 2000.

FOSSUM, T.W.; HEDLUND, C.S.; JOHNSON, A.L.; SCHULZ, K.S.; SEIM, H.B.; WILLARD, M.D.; BAHR, A.; CARROLL, G.L. **Cirurgia de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.1606p

FOURNIER, T.; MEDJOUBI-N, N.; PORQUET, D. Alpha-1-acid glycoprotein **Biochimica et Biophysica Acta. Protein Structure and Molecular Enzymology**, v 1482 p. 157-171, 2000.

GAHMBERG, C. G.; ANDERSSON, L. C. Leukocyte surface origin of human α 1-acid glycoprotein (orosomucoid)*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 148, n. 2, p. 507–521, 1978.

GANZ, T. Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. **Blood**, 102 (3), p. 783-788, 2003.

GARRIDO E.; CASTANHEIRA T. L. L.; VASCONCELOS R. O.; MACHADO R. Z. Alterações hematológicas em cadelas acometidas por tumores mamários. **PubVet**, v.9, p. 291-297, 2015.

GRUYS, E.; TOUSSAINT M. J. M.; NIEWOLD T. A.; KOOPMANS S. J. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University: Science**, v. 6 B,

n. 11, p. 1045–1056, 2005.

GUERRA L, T. **Transferrina e pré-albumina séricas como marcadoras da resposta do suporte nutricional em pacientes com câncer de esôfago**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul faculdade de medicina programa de pós-graduação em medicina: Ciências em Gastroenterologia, 2008.

HAGMAN, R. Serum α -1-acid glycoprotein concentrations in 26 dogs with pyometra. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 1, p. 52–59, 2011.

HAYASHI, S.; IGUCHI K.; SHIMIZU M.; SHIMADA T. A comparison of the concentrations of C-reactive protein and α 1 -acid glycoprotein in the serum of young and adult dogs with acute inflammation. **Veterinary Research Communications**, v. 25, n. 2, p. 117–126, 2001.

HELLMAN, N. E.; GITLIN, J. D. Ceruloplasmin metabolism and function. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 439–458, 2002.

HOCHEPIED, T.; BERGUER G. F.; BALMANN H.; LIBERT C. α 1-acid glycoprotein: An acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v.14 p. 25-34, 2003.

IRIE, K.; IRIE, R. F.; MORTON, D. L. Evidence for in vivo reaction of antibody and complement to surface antigens of human cancer cells. **Science**, v. 186, n. 4162, p. 454–456, 1974.

JABS, W. J.; LOGERING B. A.; GERKE P.; KREFT B. The kidney as a second site of human C-reactive protein formation in vivo. **European Journal of Immunology**, v.33 p. 152-161, 2003.

JACOBS, E. L.; HASKELL, C. M. Clinical use of tumor markers in oncology. **Current Problems in Cancer**, v. 15, n. 6, p. 301–350, 1991.

JAIN, C.N. **Essential of veterinary hematology**. Philadelphia: Febiger, 1993. 417p

JAIN, S.; GAUTAM, V.; NASEEM, S. Acute-phase proteins: as diagnostic tool. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 3 p. 118-127, 2011.

JOHNSTON S.D. Reproductive systems. In: Slatter D. (Ed). **Textbook of Small Animal Surgery**. 2nd edn. Philadelphia: Saunders, p. 2177-2199, 1993.

KOCATURK, M.; MARTINEZ S.; ERALP O.; CERON J. J. Prognostic value of serum acute-phase proteins in dogs with parvoviral enteritis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 51, n. 9, p. 478–483, 2010.

KURIBAYASHI, T.; SHIMIZU M.; SHIMADA K.; HONJYO T. YAMAMOTO Y. Alpha 1-acid glycoprotein (AAG) levels in healthy and pregnant beagle dogs. **Experimental Animals**, v. 52, n. 5, p. 377–381, 2003.

KUSHNER, I.; RZEWNICKI, D. L. The acute phase response: General aspects. **Bailliere's Clinical Rheumatology**, v. 8, n. 3, p. 513–530, 1994.

LALLO, M. A.; FERRARIAS T. M.; STRAVINO A.; RODRIGUEZ J. F. M.; ZUCARE R. L. C. Alterações hematológicas em cadelas portadoras de tumores demama. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 23, p. 3–8, 2016.

LANA, S. E., Rutteman, G. R., & Withrow, S. J. (2007). Tumors of the mammary gland. In S. J. Withrow & D. M. Vail (Eds.), Withrow & Mac Ewen's **Small animal clinical oncology** (4. ed., pp. 619-636). St. Louis: Saunders Elsevier.

LANGENBACH, A.; McMANUS P. M. Sensitivity and specificity of methods of assessing the regional lymph nodes for evidence of metastasis in dogs and cats with solid tumors. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 9, p. 1424–1428, 1, 2001.

LIN, Y.; RAJALA W. M.; BERGER J. P.; MOLLER E. D. Hyperglycemia-induced Production of Acute Phase Reactants in Adipose Tissue. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 45, p. 42077–42083, 2001.

LINDBLOM, A.; LILJEGREN, A. Tumour markers in malignancies. **British Medical Journal**, vol 320, p. 424-427, 2000.

MANUALI, E.; GIUSEPPE A.; FELIZIANI F.; FORTI K. CA 15-3 cell lines and tissue expression in canine mammary cancer and the correlation between serum levels and tumour histological grade. **BMC veterinary research**, v. 8, p. 86, 2012.

MARKIEWSKI, M. M.; LAMBRIS, J. D. Is complement good or bad for cancer patients? A new perspective on an old dilemma, **Trends Immunology**, 30 (6), p. 286-292, 2009.

MARTÍNEZ-SUBIELA S.; PARRA N.; CERON J. J. Principales aplicaciones de las proteínas de fase aguda en la clínica canina. **Medicina**, v.86, p. 75-86, 2004.

MARTÍNEZ-SUBIELA, S; TECLES, F; PARRA, N.D; CERÓN, J.J. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinária. **Anales Veterinaria**, v.17, p.97-114, 2001.

McGAVIN, M.D., ZACHARY, J.F. **Bases da Patologia em Veterinária**. ed.8. Editora Elsevier. Rio de Janeiro, 2016.

MENEGAZO, A. B.B.R. **Determinação do valor da haptoglobina sérica para diagnóstico de hemólise na síndrome HELLP**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Faculdade de Medicina de Botucatu. Programa de Pós Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, 2014.

MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Ames: Iowa State, p.788, 2002.

MIALOT, J. P. **Tumores Mamários da Cadela**. ed.9. Editora Elsevier. Porto Alegre, 2015.

MISDROP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E.; et al. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. In: **World Health Organization international histological classification of tumors of domestic animals 2ed. v.VII**. Washington, D.C. Armed Forces Institute of Pathology in cooperation with the American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology, 1999.

MOLINA, R.; BARAK V.; van DALEN A.; DUFF M. J. Tumor Markers in Breast Cancer - European Group on Tumor Markers Recommendations. **Tumor Biology**, v. 26, n. 6, p. 281–293, 2005.

MORRIS, J. S.; DOBSON J. M.; ROSTOCK D. E.; O'FARRELL E. Effect of ovariectomy in bitches with mammary neoplasms. **Veterinary Record**, v. 142,

n. 24, p. 656–658, 1998.

MOULTON, J.E. Tumors of the mammary gland. In: **MOULTON, J.E. Tumors in domestic animals**. 3 ed. University of California, 1990. p. 518-550

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: An overview. **Veterinary Journal**, v.168, n. 1, p. 28–40, 2004.

NAYARA, L. C.; NATIVIDADE R.; JOSÉ I. Metástasis óseas múltiples de cáncer de mama. Papel del CA 15.3 Y respuesta a la hormonoterapia. **Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología**, v. 77, n. 4, p. 291–295, 2012.

NIVY, R.; CALDIN M.; LAVY E.; SHAABON K. Serum acute phase protein concentrations in dogs with spirocercosis and their association with esophageal neoplasia - A prospective cohort study. **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 1–2, p. 153–159, 2014.

OLIVEIRA, K.; SILVA C. M. O.; HORTA R. S.; LAVOR M. S. L. Principais síndromes paraneoplásicas em cães e gatos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, p. 2073-2088, 2013

PELETEIRO, M.C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 89, n. 509, p. 10-28, 1994.

PEPYS, M. B.; HIRSCHFIELD, G. M. C-reactive protein: A critical update. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111 p. 1805-1812, 2003.

PLANELLAS, M.; BASSOLS A.; SIRACUSA C.; SACO Y.; GIMENEZ M. Evaluation of serum haptoglobin and C-reactive protein in dogs with mammary tumors. **Veterinary Clinical Pathology**, v.38, n. 3, p. 348–352, set. 2009.

POLAND, D. C. W.; KRATZ E.; VERMEIDEN P. W.; De GROOT S. M.; BRUYNEEL B. High level of alpha1-acid glycoprotein in human seminal plasma is associated with high branching and expression of Lewis groups on its glycans: Supporting evidence for a prostatic origin. **The Prostate**, v. 52, n. 1, p. 34–42, 2002.

RIVERA, P. Utilidad clínica de los marcadores tumorales. **Revista Mexicana de**

Patologia Clínica, v. 44, p. 245-258, 1997

SANTOS, I. F. C. DOS; ALBERTO, D. S. Proteínas de fase aguda em cães e gatos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 17, n. 1, 2015.

SARTIN, E. A.; BARNES S.; KWAPIEN R. P.; WOLFE L. G.; Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. **American journal of veterinary research**, v. 53, n. 11, p. 2196–200, 1992.

SCHMIDT, E. M. S.; RUBIO P.C.; THOMAS F.; FERREIRA C. P. J.; ECKERSALL D. P. Acute phase proteins in bitches subjected to conventional and minimally invasive ovariohysterectomy. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 38, n. 11, p. 2129–2132, 1 nov. 2018.

SCHNEIDER, R.; DORN, C. R.; TAYLOR, D. O. N. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 43, n. 6, p. 1249–1261, 1969.

SERIN, G.; ULUTAS, P. A. Measurement of serum acute phase proteins to monitor postoperative recovery in anoestrous bitches after ovariohysterectomy. **Veterinary Record**, v. 166, n. 1, p. 20–22, 2010.

SERIN, G.; ULUTAS, P. A. Measurement of serum acute phase proteins to monitor postoperative recovery in anoestrous bitches after ovariohysterectomy. **Veterinary Record**, v. 166, n. 1, p. 20–22, 2010.

SHEVCHENKO, A.; THOMAS H.; HAVLI J.; OLSEN J. V. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856–2860, 2007.

SILVA, A. H. C.; SILVA D. N.; RIBAS C. R. Alterações no hemograma de cadelas com neoplasia mamária. **Ciência Animal Brasileira**, v.15, p. 87–92, 2014.

SILVA, A. E.; SERAKIDES R.; CASSALI G. V. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio- dependentes. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p. 625–633, 2004.

SOLTER, P. F.; HOFFMANN W. E.; HUNGERFORD L. L.; Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 10, p. 1738–1742, 1991.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**. 33, 573-596 W.B. Saunders, 2003.

SOUZA, J. V. Marcadores mucinosos associados ao câncer. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, v. 46, n. 1-2, p. 70-83, 2002.

STOCKHAM, Steven L., Scott, Michael A. **Fundamentals of veterinary clinical pathology**. Blackwell Publishing, 2008.

TECLES, F.; CALDIN M.; ZANELA A.; CERON J. J. Serum acute phase protein concentrations in female dogs with mammary tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, n.2, p. 214–219, 2009.

VIEIRA, M.; SOBREIRA M. F. R.; GALVÃO A. L. B.; LEGA E.; SANTANA A. E. Proteínas de fase aguda em cães - revisão de literatura. **Nucleus Animalium**, v. 5, n. 2, p. 1, 2013.

VONDERHAAR, B.K. Prolactin involvement in breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v.6, p.389-404, 1999.

WITHROW, S.J.; VAIL, M. D. Hematopoietic Tumors. In: **Small animal clinical oncology**. 5. ed. St Louis: Saunders, p. 608, 2013.

YUKI, M.; ITOH H.; TAMURA K.; NISHII N.; TAKASE K. Isolation, characterization and quantitation of canine alpha-1- acid glycoprotein. **Veterinary Research Communications**, v. 32, n. 7, p. 533–542, 2008.

YUKI, M.; ITOH, H.; TAKASE, K. Serum alpha-1-acid glycoprotein concentration in clinically healthy puppies and adult dogs and in dogs with various diseases. **Veterinary Clinical Pathology**, Baton Rouge, v. 39, p. 65-71, 2010

ZHANG, F.; SUN P.; WANG Z. Q.; WANG D. S.; WANG D. Y. Low preoperative albumin-globulin score predicts favorable survival in esophageal squamous cell

carcinoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 21, p. 30550–30560, 2016.

ANEXO I



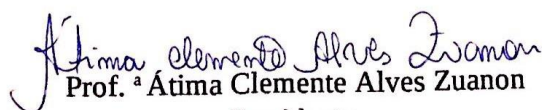
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
 PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
 Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-900- Telefone: (31) 3899-3783

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, CEUA/UFV, certifica que o Processo nº 64/2018, com o Projeto de Pesquisa intitulado, **“Eletroforese de proteínas séricas em cadelas acometidas por neoplasias mamárias”** coordenado pelo(a) professor(a) Leandro Abreu da Fonseca do Departamento de Veterinária, está de acordo com a legislação vigente, Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008, com as Resoluções Normativas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal, CONCEA e, apresenta especificidade, caracterizando *“A não utilização de animais vivos”*, portanto sendo aprovado por esta comissão em 26 de novembro de 2018.

CERTIFICATE

The Ethics Committee in Use of Animals of the University of Federal de Viçosa, CEUA-UFV, certify that the 64/2018 Process, with the Research Project titled, **“Serum protein electrophoresis in bitches afflicted with breast neoplasms”**, coordinated by the Leandro Abreu da Fonseca teacher of Department of Veterinary, is of according to current legislation, Law No. 11,794, of october 08, 2008, with the Normative Resolutions issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation, CONCEA and, presents specificity, characterizing "Non-use of live animals", therefore being approved by this commission in November 26, 2018.


 Prof.ª Atima Clemente Alves Zuanon
 Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O HVT-UFV

Eu, _____,
 portador de RG nº _____, telefone: _____,
 endereço _____, tutor /
 responsável pelo animal _____,
 espécie _____, raça _____, sexo _____, registrado
 no HVT sob o número _____, autorizo a participação do animal como sujeito de
 pesquisa para fins científicos pelo Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa.
 Após esclarecimentos prévios, estou ciente da participação do animal no projeto,
 “ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SÉRICAS EM CADELAS ACOMETIDAS POR
 NEOPLASIAS MAMÁRIAS”, assim como a utilização dos resultados dessa pesquisa em
 publicação de artigos científicos e divulgação em eventos científicos. Para fins de publicações
 apresentações científicas, a identidade do proprietário e do animal serão preservadas. Este
 estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UFV sob o protocolo
 nº _____.

Informo que a qualquer momento poderei suspender a participação do animal na pesquisa e
 que caso isso ocorra, o animal não sofrerá prejuízos em seu tratamento ou retorno a esta
 instituição. Estou ciente que não serei gratificado monetariamente e que não receberei
 qualquer outro benefício pela participação na pesquisa.

Poderei receber maiores informações sobre esta pesquisa caso deseje, e também poderei
 esclarecer minhas dúvidas com o pesquisador responsável.

Fui informado dos riscos ao animal específicos à realização do estudo em si e que todos os
 procedimentos serão realizados sob supervisão Médico Veterinário.

Concordo em seguir corretamente todas as recomendações dos profissionais do HVT-UFV
 durante e após a utilização do animal e, caso haja qualquer dano ao animal referente ao não
 cumprimento dessas recomendações, não responsabilizarei o HVT-UFV, tampouco seus
 servidores e estudantes, pelo evento.

Assinatura do Proprietário

ANEXO III

Laudo histopatológico e comorbidades em cadelas acometidas por neoplasias mamárias.

Laudo histopatológico	Comorbidades
Adenocarcinoma simples sólido tubulopapilar de alto grau	Obeso e cardiopata
Adenocarcinoma misto tubulopapilar grau II	Melanoma oral
Adenocarcinoma misto grau I	Hemangioma cavernoso em esterno
Adenocarcinoma misto grau II	Nódulo em baço
Adenocarcinoma misto/Metaplásico grau I	Ausentes
Adenocarcinoma sólido/Papilífero	Ausentes
Adenocarcinoma misto tubulopapilífero grau II	Cistite
Adenocarcinoma sólido grau I	Cistite
Adenocarcinoma tubulopapilar	Lipoma e tumor melanocítico de comportamento biológico indeterminado
Adenocarcinoma tubulopapilar grau II	Cisto folicular infundibular
Hiperplasia lobular da glândula mamária	Cardiopata
Tumor misto grau I	Ausentes
Adenoma com áreas de carcinoma in situ	Ausentes
Tumor misto maligno grau I	Neoformação em útero
Adenocarcinoma misto grau I e hiperplasia lobular	Cardiopata; Catarata
Adenocarcinoma misto grau I	Ausentes
Adenocarcinoma misto tubulopapilífero grau II	Estertor nasal
Adenocarcinoma papilar erosivo grau I	Ausentes
Carcinoma in situ baixo grau	Cardiopata
Hiperplasia lobular da glândula mamária	Piometra; Mucometra
Carcinoma metaplásico com áreas císticas	Cardiopata
Adenocarcinoma tubulopapilar grau I	Piometra
Adenocarcinoma tubular grau I	Ausentes
Tumor fusocelular maligno grau II ou mieloeptelioma maligno	Ausentes
Adenocarcinoma misto grau I	Dermatopatia e otite
Adenocarcinoma misto grau I	Ausentes
Tumor de misto baixo grau	Ausentes

Adenocarcinoma mamário	Ausentes
Adenocarcinoma misto com componentes de mioepitelioma	Ausentes
Carcinoma micropapilar invasivo de alto grau	Ausentes
Hiperplasia melanocítica de comportamento biológico indeterminado	Melanocitoma cervical
Adenocarcinoma misto grau I	Ausentes
Adenocarcinoma simples tubulopapilar, basalóide grau I	Ausentes
Adenocarcinoma misto tubulopapilar grau II	Ausentes
Adenocarcinoma tubulopapilífero; Tumor misto de baixo grau e hiperplasia lobular	Ausentes
Adenocarcinoma misto tubulopapilar e adenocarcinoma misto grau II	Ausentes
Tumor de baixo grau tubulopapilar	Ausentes
Mieloepitelioma maligno grau II	Ausentes
Adenose com área de hiperplasia atípica, carcinoma in situ	Ausentes
Tumor misto grau I	Ausentes
Adenocarcinoma misto tubulopapilar grau II	Carcinoma espinocelular
Adenocarcinoma misto grau I	Ausentes
Adenocarcinoma misto grau II	Mastocitoma
Hiperplasia lobular; Adenocarcinoma misto de alto grau	Hematoma fibroanexial
Adenocarcinoma tubulopapilífero grau II e adenocarcinoma misto grau II	Ausentes
Carcinoma intraductal papilar baixo grau e hiperplasia lobular da glândula mamária	Ausentes
Hiperplasia epitelial da glândula mamária	Ausentes
Carcinoma papilífero intracístico, hiperplasia lobular; Tumor misto de baixo grau	Ausentes
Adenocarcinoma misto grau I	Ausentes
Hiperplasia nodular da glândula mamária com ectasia ductal	Ausentes
Adenocarcinoma misto grau II	Ausentes
Adenocarcinoma misto grau II; Hiperplasia com atipia	Ausentes
Adenocarcinoma misto grau II; Hiperplasia com ectasia	Ausentes
Adenocarcinoma misto tubulopapilar grau II.	Ausentes
Hiperplasia da glândula mamária com ectasia e adenose	Ausentes
Carcinoma in situ	Ausentes