

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PERFIL LIPÍDICO SÉRICO E DE ÁCIDOS GRAXOS DO TECIDO ADIPOSEO
EM CADELAS COM TUMORES MAMÁRIOS: UM ESTUDO
CASO-CONTROLE**

FABIANE APARECIDA SABINO

Botucatu – SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PERFIL LIPÍDICO SÉRICO E DE ÁCIDOS GRAXOS DO TECIDO ADIPOSEO
EM CADELAS COM TUMORES MAMÁRIOS: UM ESTUDO
CASO-CONTROLE**

FABIANE APARECIDA SABINO

Dissertação apresentada junto ao programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Botucatu, para obtenção do título de Mestre na área de Biotecnologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Nereu Carlos
Prestes

Botucatu – SP
2014

Nome do autor: Fabiane Aparecida Sabino

Título: PERFIL LIPÍDICO SÉRICO E DE ÁCIDOS GRAXOS DO TECIDO ADIPOSEO EM CADELAS COM TUMORES MAMÁRIOS: UM ESTUDO CASO-CONTROLE

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Nereu Carlos Prestes

Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Profa. Dra. Maria Denise Lopes

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Profa. Dra. Maria Isabel Mello Martins

Membro

Departamento de Clínica Veterinária – Teriogenologia de Pequenos Animais
UEL – Londrina/PR

Data da Defesa: 24 de junho de 2014.

“Antes de ter amado um animal, parte da nossa alma permanece desacordada.”

Anatole France

“Devemos ser grato a Deus pelos pequenos detalhes.

Nos detalhes descobrimos o valor de uma realidade.

Olhar as miudezas da vida faz a diferença.”

Padre Fábio de Melo

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a **Deus** por estar sempre a frente iluminando e abençoando meu caminho, pela proteção durante minhas inúmeras viagens, pelas pessoas maravilhosas que colocou na minha vida, por todo amor e amparo nos momentos difíceis, pela sua compaixão e infinita misericórdia. Obrigada, Senhor.

Aos meus pais, **José Carlos e Claudete**, por todo apoio, compreensão e orações para que eu conquistasse mais essa etapa da minha vida. Pela paciência, confiança, amor e carinho de sempre. Tudo o que tenho em minha vida não seria possível sem vocês ao meu lado. Obrigada pelo exemplo de fé, dedicação, humildade e benevolência. Vocês são tudo para mim. Amo vocês.

Ao meu namorado **Thiago**, por ter acreditado no nosso amor desde o princípio. Juntamente com o início de uma nova fase da minha vida profissional, Deus fez nossos caminhos se encontrarem, e o namoro que já começou a distância só se fortificou durante esses anos. Obrigada pelo amor, paciência, apoio, carinho, companheirismo e confiança. Obrigada por encarar essa nova jornada que estamos iniciando na nossa vida.

A minha avó **Hilda** que foi morar com Deus durante o meu mestrado. Sua alegria e carinho fazem muita falta. Não pude dizer adeus, até porque eu acreditava que ainda não nos deixaria, mas sei que sua linda missão foi cumprida e precisava descansar nos braços do Pai. Obrigada por tudo vó, descanse em paz. *“E o que separa o frio do calor é a emoção de saber que vou poder te reencontrar um dia, eternamente te encontrar.”*

A minha cachorrinha **Winnie**, foram 16 anos ao lado da minha pequena, e até agora ainda não me acostumei com sua ausência. Quase que ela conseguiu ver mais essa etapa concluída, só precisava ter aguentado mais um pouquinho. Winnie, você foi uma guerreira, a melhor amiga que eu poderia ter. Ser médica veterinária e ter estudado tanto até aqui valeu muito a pena por poder ter cuidado melhor de você. O seu lugar é insubstituível. *“Eles vivem menos porque já nascem sabendo amar de um jeito que levamos a vida inteira para aprender.”*

AGRADECIMENTOS

O mestrado foi mais uma grande conquista na minha vida, uma etapa de suma importância como médica veterinária e como pessoa. Foram dois anos longe de casa, mas retornando a uma antiga casa, onde pude reencontrar velhos amigos e também conhecer pessoas especiais. A oportunidade de poder trabalhar ao lado de colegas extraordinários foi uma bagagem muito importante, única e de grande valia.

Agradeço à **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP Botucatu**, pela grata oportunidade de poder fazer parte do corpo docente dessa renomada Universidade.

Ao meu orientador, **Prof. Nereu Carlos Prestes**, por ter me aceitado e confiado em meu trabalho. Obrigada pela oportunidade, auxílio e ensinamentos. Espero ter correspondido as suas expectativas.

Ao meu professor e amigo da graduação e residência, **Prof. Daniel Bartoli de Sousa**, por ter me apoiado na decisão de realizar o mestrado. Muito obrigada por todo o aprendizado e exemplo de grande profissional.

A **Prof^ª Maria Denise Lopes** por todo auxílio e apoio no meu projeto de pesquisa. A **Prof^ª Fabiana Ferreira de Souza**, que desde a graduação me influenciou a gostar da reprodução animal de pequenos animais, e que tive o grande prazer de poder conviver novamente durante o meu mestrado, me ajudando em mais essa conquista.

A **Prof^ª Carmen Josefina Contreras Castillo** e ao **Prof. Severino Matias de Alencar** por terem aberto a porta de seus laboratórios permitindo a realização do meu projeto. Ao Dr. **Jair Pinto** e a técnica **Ivani Moreno** por todo ensinamento, paciência e confiança. A **ESALQ** pela estrutura e grandes profissionais.

Ao meu querido amigo de residência e mestrado, **Rodrigo Volpato**, profissional o qual confio inteiramente. Muito obrigada Rô pela ajuda e amizade. Sem você eu estaria perdida.

A minha amiga, companheira de casa e colega de profissão **Camila Ackmerman** por ter sido o meu braço direito durante o mestrado e ter me ajudado em todos os momentos. E ao seu namorado **Eduardo Trevizol** pela amizade e auxílio na realização do meu projeto. E claro, a **Ursa** por ser a cachorra mais querida e inteligente que conheço.

A **Thays de Campos Trentin** pelo auxílio na realização das análises séricas. A **Bruna Miatelo, Beatriz Menegali, Katyri Pagganoti, Ana Carolina Gonçalves e Kathelyn Guimarães** pela grande ajuda nas análises e amizade durante a minha estadia em Piracicaba.

Agradeço ao meu irmão **Fábio**, minha cunhada **Andressa** e minha linda sobrinha **Maria Júlia** pelo grande apoio nessa etapa, por terem deixado sempre as portas abertas de sua casa para que eu pudesse descansar no meio das correrias do dia a dia e das viagens. Foi muito fortalecedor para mim saber que vocês estavam perto. Maju obrigada por sempre ter ajudado a “Tia Bi” a repor as energias. Foi muito gostoso poder ter acompanhado seu crescimento e estar presente na sua vida. Você é a maior riqueza de Deus em nossas vidas.

Aos amigos feitos durante esse período, que mais do que companheiros de profissão se tornaram pessoas especiais: **Paulinha, Guta, Carlos Renato, Yatta, Carol Scott, Rosiara, Midyan, Carol Destro, Gabriele, Adriana e Michele**. Aos antigos amigos que pude reencontrar após 10 anos de saudade: **Rodrigo e família, Larissa, Natália, Bel, Tia Eliane, Rafael e Guilherme**.

Aos colegas do REPAS – **Carla Regina, Lucas, Leda, Jorge, Carmen**; aos residentes, principalmente ao **Endrigo, Sidnei, Luis Fernando e Felipe** pelo grande auxílio no ambulatório e centro cirúrgico; aos demais **professores e funcionários** do departamento que contribuíram direta e indiretamente para a realização do meu projeto. Meu muito obrigada.

A **CAPES** pela concessão da bolsa durante o mestrado.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Concentração recomendada de gordura e ácidos graxos em rações para cães (em 1Kg de matéria seca).....17

TABELA 2 - Estadiamento clínico dos tumores mamários em cadelas, sistema TNM..30

TABELA 3 - Dados da avaliação geral das cadelas do grupo controle (G.C.) e do grupo tumor de mama (T.M.). Botucatu, 2014.....33

TABELA 4 - Níveis séricos de colesterol e triglicérides de cadelas do grupo controle (G.C.) e do grupo tumor de mama (T.M.). Botucatu, 2014.....35

TABELA 5 – Níveis dos ácidos graxos do tecido adiposo de cadelas do grupo controle (G.C.) e do grupo tumor de mama (T.M.). Botucatu, 2014.....35

TABELA 6 - Diagnóstico histopatológico das biópsias mamárias e estadiamento clínico tumoral das cadelas do grupo com tumor de mama. Botucatu, 2014.....40

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Síntese de eicosanoides pelo AA e AEP através da ação enzimática de LOX (lipoxigenase) e COX (ciclo-oxigenase).....18
- FIGURA 2 - Amostra de tecido adiposo de cadelas submetidas à OSH e mastectomia armazenada em criotubo.....26
- FIGURA 3 - Amostra final após extração pelo Método de Folch et al. (1957) modificado26
- FIGURA 4 - Comparação das características prevalentes das cadelas do grupo controle (G.C.) e grupo com tumor de mama (T.M.), com relação ao histórico reprodutivo: animais inteiros, frequência deaios, número de crias, uso de hormônios e frequência de pseudogestação.....32
- FIGURA 5 - Comparação do perfil de ácido mirístico (C 14:0) (porcentagem em relação ao conteúdo total de ácidos graxos) de cadelas do grupo controle (G.C.) e grupo com tumor de mama (T.M.). Sendo apresentado o valor da média (traço maior) e o desvio padrão (traço inferior e superior). Botucatu, 201434
- FIGURA 6 - Comparação do perfil de ácido palmítico (C 16:0) (porcentagem em relação ao conteúdo total de ácidos graxos) de cadelas do grupo controle (G.C.) e grupo com tumor de mama (T.M.). Sendo apresentado o valor da média (traço maior) e o desvio padrão (traço inferior e superior). Botucatu, 201434
- FIGURA 7 - Comparação do perfil de ácido palmitoleico (C 16:1) (porcentagem em relação ao conteúdo total de ácidos graxos) de cadelas do grupo controle (G.C.) e grupo com tumor de mama (T.M.). Sendo apresentado o valor da média (traço maior) e o desvio padrão (traço inferior e superior). Botucatu, 201435

- FIGURA 8 - Comparação do perfil de ácido esteárico (C 18:0) (porcentagem em relação ao conteúdo total de ácidos graxos) de cadelas do grupo controle (G.C.) e grupo com tumor de mama (T.M.). Sendo apresentado o valor da média (traço maior) e o desvio padrão (traço inferior e superior). Botucatu, 201435
- FIGURA 9 - Comparação do perfil de ácido oleico (C 18:1) (porcentagem em relação ao conteúdo total de ácidos graxos) de cadelas do grupo controle (G.C.) e grupo com tumor de mama (T.M.). Sendo apresentado o valor da média (traço maior) e o desvio padrão (traço inferior e superior). Botucatu, 2014.36
- FIGURA 10 - Comparação do perfil de ácido cis-linoleico (C 18:2) (porcentagem em relação ao conteúdo total de ácidos graxos) de cadelas do grupo controle (G.C.) e grupo com tumor de mama (T.M.). Sendo apresentado o valor da média (traço maior) e o desvio padrão (traço inferior e superior). Botucatu, 201436
- FIGURA 11 - Comparação do perfil de ácido alfa-linolênico (C 18:3) (porcentagem em relação ao conteúdo total de ácidos graxos) de cadelas do grupo controle (G.C.) e grupo com tumor de mama (T.M.). Sendo apresentado o valor da média (traço maior) e o desvio padrão (traço inferior e superior). Botucatu, 201437

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1. Neoplasias mamárias	9
2.1.2. Fatores hormonais.....	11
2.2. Fatores nutricionais e tumores mamários.....	14
2.2.1. Obesidade	14
2.2.2. Lipídios.....	15
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo geral	23
3.2. Objetivos específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Anamnese	25
4.2. Avaliação sérica de colesterol e triglicérides	25
4.3. Perfil de ácidos graxos do tecido adiposo	26
4.3.1. Obtenção das amostras	26
4.3.2. Extração lipídica	26
4.3.3. Identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos	28
4.4. Análise histológica.....	28
4.5. Classificação clínica da neoplasia	29
4.6. Estatística	30
5. RESULTADOS	32
5.1. Características das amostras	32
5.2. Avaliação sérica de colesterol e triglicérides	34
5.3. Perfil ácidos graxo do tecido adiposo	34
5.4. Análise histológica e estadiamento clínico	38
6. DISCUSSÃO	41
7. CONCLUSÕES.....	52
8. REFERÊNCIAS	54
TRABALHO CIENTÍFICO	68
Anexos.....	84

SABINO, F.A. **Perfil lipídico sérico e de ácidos graxos do tecido adiposo em cadelas com tumores mamários: um estudo caso-controle.** Botucatu, 2014. 97p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi analisar de forma comparativa o perfil lipídico sérico e de ácidos graxos do tecido adiposo entre cadelas controle e com tumores mamários. Foram utilizados 20 cadelas hígdas, não castradas, sem evidência à palpação de nódulos mamários, e 20 cadelas com neoplasia mamária já sugerida pelo exame de citologia aspirativa por agulha fina. Todos os animais foram submetidos à anamnese geral e específica do histórico nutricional e reprodutivo. Foi realizado o exame físico para a determinação do escore corporal, e no grupo com tumor de mama a classificação clínica (TNM) e o exame histopatológico dos tumores mamários. Para a avaliação do perfil lipídico sérico foi realizada a dosagem do colesterol total e triglicérides. Foi utilizada a cromatografia gasosa para a identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos do tecido adiposo abdominal das cadelas submetidas à cirurgia. Os ácidos graxos foram expressos em porcentagem da fração lipídica de cada ácido graxo em relação ao conteúdo total de ácidos graxos da amostra de cada animal. Os dois grupos avaliados eram alimentados, em sua maioria (80%), por ração comercial e alimento caseiro. A alimentação caseira, em sua maior parte, era a mesma preparada para os proprietário, em sua maioria foi relatado o uso de óleo de soja e a carne mais fornecida era a bovina. Houve uma número maior de animais que recebiam alimentação caseira preparada com óleo de soja no grupo de cadelas com tumores mamários. Não houve uma associação da obesidade e dos níveis séricos de colesterol total e triglicérides com o risco de desenvolvimento de tumores mamários em cadelas. A quantificação relativa dos níveis de ácido alfa-linolênico (C 18:3) e cis-linoleico (C18:2) não apresentaram diferença quando comparado o grupo controle e com tumor de mama. A relação de ômega-6/ômega-3 no grupo controle foi 21:1 e no grupo com tumor de mama de 23:1. Nenhuma correlação foi encontrada entre o perfil de ácidos graxos do tecido adiposo das cadelas com os tipos histopatológicos e estadiamento tumoral. Novos estudos são

necessários para correlacionar a alta ingestão e ômega-6 e baixa de ômega-3 com o risco do desenvolvimento de tumores mamários em cadelas.

Palavras-chave: cães, lipídios, neoplasia mamária, ômega-3, ômega-6.

SABINO, F.A. **Serum lipid profile and adipose tissue fatty acids in bitches with mammary tumors: a case-control study**. Botucatu, 2014. 97p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze comparatively the lipid profile in serum and fatty acid profile in adipose tissue from dogs with and without mammary tumors. Twenty bitches, all healthy, none spayed, and that had non mammary tumor evidence during palpation (control group) and twenty bitches with mammary tumor, already diagnosed using fine needle aspiration cytology, were used in this study. All animals were submitted to anamnesis, general and specific to nutritional and reproductive history. A physical exam was performed in order to determine the body condition of those animals, and in the group of animals with neoplasia, a clinical (TNM) and a histopathology exam were performed in the tumors. To evaluate the serum lipid profile the triglycerides and total cholesterol were measured. Gas chromatography was used to identify methyl esters from fatty acid obtained from abdominal adipose tissue from the dogs during surgery. All fatty acids were expressed in percentage of lipid fraction of each fatty acid in relation to total content in each sample from each animal. Both groups (80%) were fed with commercial dog food adding homemade food. When homemade food was used, usually it was the same prepared for the human consumption, most of them used soy oil to prepare and beef was the most provided kind of protein. None association between obesity, serum total cholesterol levels and triglycerides increasing the risk of development mammary tumors were observed in this study. Total cholesterol and triglycerides serum levels average had higher values in animals that were overweight or morbid obese. Alfa-linoleic (C 18:3) and cis-linoleic acid (C 18:2) levels did not had any difference when comparing control group and tumor group. The proportion of omega6/omega3 in control group was 21:1 and in tumor group it was 23:1. None correlation was found between the fatty acid profile in the adipose tissue with histopathology classification of tumors and tumor staging. More researches must be conducted to search a relationship between high ingestion of omega-6 and low ingestion of omega 3 with the risk of development of mammary tumors in bitches.

Keywords: dogs, lipids, mammary tumor, omega-3, omega-6.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

O conhecimento científico sobre nutrição de animais de companhia tem aumentado de forma contínua devido à importância que os cães e os gatos assumiram na vida das pessoas. Observa-se que há um grande direcionamento de pesquisas quanto ao uso de nutrientes para animais de companhia, visando entender o papel da nutrição na promoção da saúde, do bem-estar e da longevidade (CARCIOFI; JEREMIAS, 2010).

A busca por novidades no setor *pet food*, combinada com uma tendência permanente da antropomorfização dos animais de companhia, tem levado ao aumento da procura por alimentos diferenciados (SAAD; FRANÇA, 2010), fazendo com que as decisões alimentares dos proprietários se assemelhem às que adotam para seus animais (CARCIOFI; JEREMIAS, 2010).

A nutrição é apontada como um dos principais fatores relacionados com a manutenção da saúde de cães e gatos (APTEKMANN et al., 2013). A dieta não pode ser considerada somente como fonte de nutrientes, pois há várias substâncias em sua composição que podem promover ou inibir o processo da carcinogênese. Apesar dos estudos que relacionam o tipo de dieta e o desenvolvimento dos tumores em animais serem escassos, alguns dados são baseados em estudos da medicina, nos quais se estima que a dieta possa predispor cerca de 20 a 30% de todas as neoplasias na espécie humana em países economicamente desenvolvidos (RODASKI; PIEKARZ, 2008).

Acredita-se que há uma maior exposição da sociedade moderna a fatores ambientais, químicos, hormonais e nutricionais que são potencialmente carcinogênicos e juntamente com esse novo estilo de vida, há a interferência do homem nos hábitos alimentares dos animais e no seu ambiente, podendo estar correlacionados ao aumento de casos de neoplasias em animais de companhia (MOULTON, 1990).

Cães e gatos desenvolvem tumores espontâneos com comportamento biológico e histológico semelhantes aos que ocorrem em humanos, sendo os tumores mamários as neoplasias mais frequentemente diagnosticadas em mulheres e cadelas. Os tumores mamários são comuns em animais de meia-idade e possuem padrão metastático semelhante ao das mulheres, tornando o cão um dos melhores modelos experimentais para estudos do câncer de mama (MACEWEN, 1990). Mas com a escassez de dados que relacionam os nutrientes com o desenvolvimento de tumores mamários em cadelas,

nota-se que linhas de pesquisas da medicina tornaram-se modelos para o estudo desse tipo de neoplasias em cães.

Fatores nutricionais, tais como a obesidade e ingestão de lipídios, e a elucidação de seus mecanismos na carcinogênese estão sendo amplamente estudados. A obesidade em mulheres está diretamente associada a maiores concentrações dos níveis de estrógeno, aumentando assim, os riscos do desenvolvimento de tumores de mama (STOLL, 2002; HAKKAK et al. 2005). A dieta rica em lipídios também pode influenciar o crescimento de tumores de mama por atuarem como combustível metabólico das células tumorais e possuem ação que pode aumentar a taxa de proliferação celular, mas em grande parte os mecanismos indutores da carcinogênese dependem do tipo e quantidade de lipídios na dieta (ESCRICH et al., 2001).

Os diferentes tipos de eicosanoides sintetizados pelos ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-6 e ômega-3 podem ter uma influência indutora ou protetora na carcinogênese. Atualmente, a dieta ocidental, rica em ácidos graxos ômega-6, contém uma grande desproporção na relação entre os ácidos graxos ômega-6 e ômega-3, sendo o alvo de estudos como possível causa do aparecimento de tumores, principalmente neoplasias mamárias em mulheres (BERQUIN et al., 2008. MENDES, 2008; OLIVO-MARSTON et al., 2008).

A hipótese de nosso estudo é de que a obesidade e o maior consumo de ácidos graxos ômega-6 influenciam o desenvolvimento de tumores mamários em cadelas.

REVISÃO DE LITERATURA

2. Revisão de literatura

2.1. Neoplasias mamárias

O aumento da incidência de neoplasias na medicina veterinária ao longo dos anos pode ter relação com o aumento da longevidade dos pacientes, devido à melhora da qualidade de vida dos animais, que também acarreta na maior ocorrência de doenças crônicas. O mesmo tem sido observado em humanos (MOULTON, 1990; RICHARDS et al., 2001; DE NARDI et al., 2002).

Os tumores neoplásicos mamários em cadelas são de duas a três vezes mais frequentes do que nas mulheres. A etiologia e os fatores que predispõem os tumores mamários em mulheres e em cadelas, principalmente a ação hormonal de estrógenos e progesterona, mostram a grande importância no estudo de tumores mamários caninos para uma melhor compreensão e auxílio no estudo do câncer de mama em mulheres (MISDORP et al., 1999; MISDORP, 2002; FERRI, 2003).

A carcinogênese é um processo que ocorre em múltiplas etapas, e gradativamente as células adquirem características de malignidade. Ao longo dos anos, notou-se que o câncer tem origem em uma única célula e por meio de múltiplas mutações genéticas ocorre um acúmulo de anormalidade no DNA. Essas mutações podem causar crescimento celular desordenado e determinar o aparecimento de células com capacidade de gerar metástases (RODASKI; PIEKARZ, 2008).

A etiologia do câncer de mama é multifatorial, com participação de fatores genéticos, ambientais e principalmente hormonais (SILVA et al., 2004). Apesar de ainda não ser clara, a ação dos hormônios esteroides sexuais femininos, a prolactina e seus receptores em associação com fatores de crescimento e vários agentes cancerígenos, desempenham papel essencial no desenvolvimento de tumores mamários nas cadelas, bem como aqueles relacionados à nutrição (MISDORP, 2002; ASHBECK et al., 2007; VERSTEGEN; ONCLIN, 2006; RIVERA et al., 2009).

As neoplasias mamárias são os tumores mais comuns que acometem fêmeas caninas não castradas (MOULTON, 1990; SONREMO, 2003). Cerca de 41% a 53% dos tumores são malignos (BRODEY et al., 1983; MOE, 2001; RUTTEMAN et al., 2001; KRISTIENSEN, 2013), sendo que, assim como na mulher, há fortes indícios de que tumores benignos em cadelas possuem grande risco de se tornarem malignos, mas

os fatores que levam os tumores benignos a malignidade ainda não foram estudados em cães (SONREMO et al., 2009; KRISTIENSEN, 2013).

As modificações hormonais que ocorrem durante as fases do ciclo estral em cadelas, principalmente nos primeiros dois anos de vida, estão intimamente relacionadas com o desenvolvimento de tumores mamários. O risco da ocorrência de tumores mamários é de 0,5% em cadelas castradas antes da puberdade, 8% para cadelas castradas após um ciclo estral, e 26% para as castradas após dois ou mais ciclos (SCHNEIDER et al., 1969; JOHNSTON, 1993; MACEWEN; WITHROW, 1996; O'KEEFE, 1997; FONSECA; DALECK, 2000; ZUCCARI et al., 2001; DE NARDI et al., 2008).

De acordo com Kristiansen (2013), a ovariosalpingohisterectomia (OSH) auxilia no controle do aparecimento de novos tumores mamários em cadelas diagnosticadas com tumores mamários benignos. Já a realização da OSH durante a exérese cirúrgica do tumor mamário maligno, não é um fator preventivo de recidivas da neoplasia, não inibe o desenvolvimento de metástases e não está correlacionada com o prolongamento da sobrevida dos pacientes (MORRIS et al., 1998).

Há uma maior incidência dos tumores de mamas em cadelas de meia idade (9 a 11 anos), e predisposição em algumas raças como poodle, pastor alemão, spaniels, dachshund, além dos animais sem raça definida (MACEWEN; WITHROW, 1996; DE NARDI et al., 2008). Moe (2011), observou que a incidência de neoplasias mamárias em cadelas da raça Boxer foi de 35,47%.

Os tumores de mama em cadelas afetam principalmente as glândulas mamárias inguinais e abdominais (MISDORP, 2002; SONREMO et al., 2009), sendo que, aproximadamente 60% de todos os tumores mamários ocorrem nas mamas inguinais. A razão desta ocorrência é desconhecida, e pode estar relacionada com o maior volume de parênquima mamário nessas glândulas e com as correspondentes alterações proliferativas em resposta ao estrógeno (MOULTON, 1990; QUEIROGA; LOPES, 2002; DE NARDI et al., 2008; SHAFIEE et al., 2013).

Observa-se que 50 a 70% das cadelas com tumores de glândulas mamárias, apresentam tumores múltiplos, e diferentes tipos de tumores podem ocorrer em um único animal sendo que a maioria são carcinomas e menos de 5% são sarcomas (MACEWEN; WITHROW, 1996; MISDORP, 2002; SONREMO et al., 2009).

As metástases dos tumores mamários caninos ocorrem por via linfática (gânglios linfáticos axilares e inguinais) ou venosa, sendo que a via linfática parece ser a mais importante nos carcinomas mamários (ENGSTRÖM et al., 1989, QUEIROGA; LOPES, 2002). Segundo Mialot (1988), a incidência dos tumores mamários produzirem metástase é de 25% a 50% em um ano após a remoção cirúrgica, as metástases geralmente se desenvolvem nos pulmões e a sobrevida dos animais pode variar, dependendo do tipo neoplásico e tratamento realizado.

2.1.2. Fatores hormonais

Os hormônios esteroides sexuais femininos, principalmente o estrógeno, desempenham papel fundamental na carcinogênese mamária em mulheres e cadelas. Tanto a glândula mamária normal quanto a neoplásica, secretam hormônios esteroides, sendo esse um fator relacionado com o desenvolvimento de tumores. Além dos hormônios esteroides sexuais, a prolactina, hormônio do crescimento (GH), fatores de crescimento e os hormônios tireoidianos também estão relacionados ao desenvolvimento de tumores mamários em mulheres (NOGUEIRA; BRETANI, 1996; FONSECA; DALECK, 2000; MISDORP, 2002; PEÑA et al., 2003; SILVA et al., 2004; VERSTEGEN; ONCLIN, 2006).

Os hormônios esteroides induzem a proliferação celular, e a cada ciclo estral as cadelas ficam mais susceptíveis à carcinogênese. O estrógeno promove o crescimento ductal e possui um papel importante na carcinogênese por estimular a liberação do fator de crescimento tumoral alfa (TGF- α) e do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), que estimulam o crescimento das células tumorais, além de inibir o fator de crescimento beta (TGF- β). A progesterona atua no desenvolvimento lóbulo-alveolar das glândulas mamárias promovendo a hiperplasia das células secretoras e mioepiteliais. Durante a fase lútea de cada ciclo estral, a cadela é exposta a uma grande concentração de progesterona, e sua ação proliferativa no processo de carcinogênese mamária inclui a *up-regulation* da produção do GH, o qual pode ter envolvimento nas primeiras etapas da carcinogênese (RUTTEMAN, 1990; MACEWEN; WITHROW, 1996; FONSECA; DALECK, 2000; SILVA et al., 2004; SLEECKX et al., 2011).

A prolactina tem sido considerada essencial para o desenvolvimento do epitélio mamário e vários estudos tem apontado a forte correlação positiva entre os níveis de

prolactina e de hormônios esteroides no desenvolvimento de tumores mamários. Sua ação está intimamente ligada à maior sensibilização celular aos efeitos do estrógeno e aumento no número de seus receptores (FONSECA; DALECK, 2000; QUEIROGA et al., 2005).

Segundo Brennan (1975), animais submetidos à terapia com hormônios esteroides levam um longo período de tempo para desenvolverem tumores mamários. Acredita-se que os hormônios não sejam iniciadores, mas que exerçam ação como promotores no desenvolvimento de neoplasias mamárias. Geralmente as neoplasias induzidas por hormônios esteroides são dependentes de altos níveis de hormônios para sua multiplicação. Com o seu desenvolvimento, os tumores induzidos por hormônios, apresentam uma propensão de se tornarem autônomos, sendo característico de tumores hormônios-dependentes. Nessa fase já houve perda das características de diferenciação celular da linhagem de origem e, morfológicamente, as células tumorais tornam-se indiferenciadas.

As concentrações de andrógenos e estrógenos séricos em tecidos mamários são mais elevadas em cadelas com tumores mamários malignos, com maiores concentrações hormonais no carcinoma inflamatório, com exceção do estrógeno sérico, quando comparado aos tumores mamários malignos não inflamatórios (MORRISSON, 1998; PEÑA et al., 2003; ILLERA et al., 2006).

O receptor de estrógeno (ER) atua como um importante estimulador da proliferação de células epiteliais mamárias, e sua expressão fisiológica está intimamente associada aos receptores de progesterona (KLOPFLEISCH et al., 2011). A estimulação dos receptores de estrógenos ou diferenças nos níveis de expressão, podem contribuir para o crescimento e comportamento clínico dos tumores mamários caninos, como ulceração da pele, aderência à pele e aos tecidos subjacentes (QUEIROGA et al., 2005; KLOPFLEISCH et al., 2011).

A ação dos receptores hormonais como mediadores de estimulação da proliferação celular no tumor de mama ocorre após a ligação do estrógeno e da progesterona a seus receptores proteicos específicos localizados no citoplasma da célula alvo do tumor. O complexo esteroide-receptor move-se em direção ao núcleo da célula, onde ocorre a ligação à cromatina, ocasionando o aumento na síntese de RNA mensageiro, de RNA ribossômico e síntese proteica, alterando a função celular. Além da proliferação celular ocorre a produção de receptores citoplasmáticos adicionais,

incluindo a proteína receptora de progesterona (PR) (BRENNAN, 1975; JOHNSTON, 1993; FONSECA; DALECK, 2000; ZUCCARI, 2008).

A redução da dependência hormonal e maior autonomia das células neoplásicas, que é vista na progressão e aumento da malignidade dos tumores de mama em cadelas, demonstram que, apenas uma parte das neoplasias malignas apresenta receptores hormonais e em concentrações menores, piorando o prognóstico. Além da baixa expressão dos receptores de hormônios esteroides, nota-se também uma maior proliferação celular nos tumores mamários malignos em cadelas, diferentemente do que é encontrado em tumores benignos, os quais apresentam maior expressão dos receptores de estrógeno e progesterona, além de apresentarem uma baixa proliferação celular (CASSALI, 2000; THURÓCZY et al., 2007; GERALDES et al., 2000; RAMOS et al., 2012).

A progesterona ou progestágenos sintéticos como o acetato de medroxiprogesterona, induzem o desenvolvimento completo do lóbulo-alveolar da glândula mamária, com hiperplasia de elementos secretórios e mioepiteliais, ao passo que o estradiol estimula o crescimento ductal. Os progestágenos injetáveis utilizados para prevenir o estro em cadelas tem proporcionado aumento na incidência de tumores benignos, embora também seja relatado um aumento da incidência de tumores malignos tardios. Já a administração prolongada de estrógenos não tem demonstrado um aumento da incidência de tumores mamários. No entanto, o risco de ocorrência de neoplasias malignas foi maior após um longo período de administração experimental de estrógenos combinados com progestágenos (MISDORP, 2002; SONREMO, 2003; DE NARDI et al., 2008).

Apesar de haverem divergências quanto à relação da pseudociese com neoplasias mamárias, acredita-se que cadelas com pseudogestação recorrente possuem uma maior predisposição para a formação de tumores mamários. O leite retido cronicamente pode conter compostos químicos que podem ter um efeito carcinogênico sobre o epitélio adjacente. Mas ainda não há estudos que afirmem a influência da pseudogestação no desenvolvimento dos tumores mamários em cadelas (RUTTEMAN, 1990; MARTINS; LOPES, 2005; ZUCCARI et al., 2001, SLEECKX et al., 2011).

2.2. Fatores nutricionais e tumores mamários

2.2.1. Obesidade

A obesidade é caracterizada como uma deposição excessiva de tecido adiposo no corpo, levando a alterações de diversas funções corporais. É o distúrbio nutricional mais comum em animais de companhia e sua prevalência, observada através estudos anteriores em diversos países, varia de 22,4 a 40% (MCGREEVY et al., 2005; GERMAN, 2006; DIEZ; NGUYEN, 2007). No Brasil dados mostram que 16,5% da população de cães na cidade de São Paulo-SP são obesos (JERICÓ; SCHEFFER, 2002). Segundo Zoran (2010), a incidência da obesidade em cães aumenta à medida que a obesidade humana na população geral também aumenta.

Em cães a obesidade é causada principalmente pela ingestão excessiva de energia alimentar e redução da atividade física. Deve-se buscar um equilíbrio entre a ingestão e o gasto energético, mas existem muitos fatores, tanto ambientais e genéticos, que influenciam este equilíbrio (GERMAN, 2006; BLAND et al., 2010; ZORAN, 2010).

Após a utilização de um indutor químico para o desenvolvimento de tumores de mama em ratas obesas, 68% dos animais obesos e 32% dos magros foram diagnosticados com tumores mamários, sendo que, nas ratas obesas o desenvolvimento dos tumores foi mais rápido do que nos animais magros (HAKKAK et al., 2005).

Em estudos recentes, o alto ganho de peso em períodos posteriores da vida adulta na mulher, bem como o elevado excesso de gordura corporal após a menopausa, aumenta o risco de câncer de mama na pós-menopausa (BOEING, 2013).

Em cadelas castradas, notou-se que a obesidade na idade jovem aumentou o risco de tumores mamários, sugerindo que os fatores nutricionais no início da vida do animal, estão envolvidos no aparecimento desse tipo de neoplasia (SONNENSCHNEIN et al., 1991; PÉREZ-ALENZA et al., 2000).

Segundo Pérez-Alenza et al. (1998), a idade avançada, obesidade no primeiro ano de idade, maior percentual de consumo de carne vermelha, principalmente bovina e suína, e uma maior proporção de consumo de comida caseira foram, independentemente, associados ao maior risco de tumores mamários em cães. Com base

nesse estudo, a dieta numa fase precoce da idade do animal não pode ser excluída de influenciar a tumorigênese mamária.

A obesidade na mulher pode aumentar o risco de desenvolvimento do câncer de mama por diferentes mecanismos, tais como a produção de estrógeno pela aromatização de andrógenos no tecido adiposo e também pela resistência à insulina. Postula-se que a hiperinsulinemia induz uma resposta para o crescimento de células tumorais via receptor de insulina, diminuição da globulina ligadora de hormônios sexuais, que é um importante regulador plasmático de hormônios esteroides sexuais, aumentando a circulação de estrógeno livre, promovendo *up regulation* na produção de andrógenos e estrógenos pelos ovários (DEL GIUDUCE et al., 1998; STOLL, 2002; JEE et al., 2005; CARVALHEIRA; SAAD, 2006; GARMENDIA et al., 2007; PICHARD et al., 2008) .

Em cães a obesidade também está associada à resistência insulínica, a diminuição da sensibilidade periférica à insulina foi vista em animais alimentados com dietas ricas em gorduras e obesos (KAYALA et al., 1999).

A produção de estrógeno pela aromatização de andrógenos no tecido adiposo ocorre pela atividade da aromatase P450, enzima mitocondrial envolvida nas primeiras etapas da esteroidogênese. A obesidade aumenta a transcrição da aromatase P450 na gordura subcutânea, estimulada pela insulina e cortisol nos pré-adipócitos (células estromais) e adipócitos, ocasionando na maior conversão da androstenediona em estrona (WAJCHENBERG, 2000; CARVALHEIRA; SAAD, 2006).

2.2.2. Lipídios

A gordura da dieta é a fonte mais concentrada de energia sendo importante também para oferecer a palatabilidade e textura mais aceitável aos alimentos dos cães. O triglicerídeo é o principal componente lipídico da dieta e fonte de ácidos graxos que são utilizados para a síntese de outros lipídios importantes como os fosfolipídios. Existem duas classes de ácidos graxos poli-insaturados essenciais: ômega-6 (n-6; $\omega 6$) e ômega-3 (n-3; $\omega 3$), os quais não podem ser sintetizados pelos animais, devendo ser oferecidos na dieta (BURGER, 1987; TREVISAN; KESSLER, 2009; CASE et al, 2011).

Em 1929 foram realizados os primeiros estudos que comprovaram a necessidade dietética de ácidos graxos poli-insaturados para animais de sangue quente. A

importância da associação de ômega 3 e 6 na dieta foi relacionada, principalmente, com a saúde da pele (ZIBOH et al, 2000). Na medicina veterinária a aplicação prática da suplementação com ácidos graxos essenciais está embasada no tratamento de doenças da pele, mas estes nutracêuticos têm sido largamente utilizados para tratar problemas de articulações, doenças cardiovasculares, neoplasias, hiperlipidemia, doenças gastrointestinais e renais (SAAD et al., 2003; LENOX; BAUER, 2013).

Nos cães o precursor do ômega-6 é o ácido graxo cis-linoleico (AL; 18:2n-6), o qual é metabolizado pela dessaturação e alongação sintetizando assim os ácidos graxos essenciais derivados: ácido dihomo-gama-linolênico (ADGL; 20:3n-6) e o ácido araquidônico (AA; 20:4n-6) (CARCIOFI et al., 2002; GLEISSMAN et al., 2010; LENOX; BAUER, 2013). O ácido cis-linoleico pode ser encontrados em óleos vegetais e em algumas gorduras animais. O óleo de semente de girassol pode apresentar entre 65 a 70%, o óleo de soja e milho tem cerca de 50% e o óleo de oliva contém cerca de 5 a 8% desse ácido graxo (HOLME, 1987; BERQUIN et al., 2008).

O ômega-3 tem como precursor o ácido alfa-linolênico (AAL; 18:3n-3), que pela ação das enzimas dessaturase e elongase sintetizam o ácido eicosapentanóico (AEP; 20:5n-3) e ácido docosahexaenoico (ADH; 22:6n-3) (CARCIOFI et al., 2002; GLEISSMAN et al., 2010; LENOX; BAUER, 2013). Mas em mamíferos o AAL, que é encontrado nos produtos vegetais, tais como óleo de linhaça e canola (que também são ricos em AL), não é eficientemente convertido em ADH e AEP. Acredita-se que em humanos a conversão seja menor que 10%, e que em cães também seja bastante limitada. O óleo de peixe, principalmente de origem marinha, como sardinha e salmão, atualmente é considerado a melhor fonte de ADH e AEP nas dietas (MARTIN et al., 2006; BAUER, 2007; BERQUIN et al., 2008; LENOX; BAUER, 2013).

Segundo dados da ANFALPET de 2008, as fontes de óleo de origem vegetal utilizadas nas rações para cães e gatos são: óleo de abacate, óleo de alecrim, óleo de arroz, óleo de linhaça (bruto ou cru), óleo de palma, óleo de girassol, óleo de soja (bruto ou cru), óleo de soja degomado, óleo de soja refinado e lecitina de soja. E os de origem animal são óleo de aves, óleo de peixes, gordura bovina e gordura suína. Mas a composição total de ácidos graxos do produto alimentar final é composta por outras fontes de gordura, como ovos, músculos e miúdos (FRANÇA et al., 2011).

Há uma competição entre as enzimas dessaturase que convertem o ácido graxo cis-linoleico em ácido araquidônico, e o ácido alfa-linolênico em ácido

docosahexaenoico e ácido eicosapentanóico. No entanto, essas enzimas tem uma predileção em converter os ácidos graxos ômega-3. Dietas com grandes quantidades de ômega-6 podem interferir na conversão de ômega-3 para obtenção de ADH e AEP. Alguns autores recomendam a razão ômega-6/ômega-3 de 2:1 e 3:1, acreditando um bom equilíbrio na conversão dos ácidos graxos ômega 3 e 6. Nas últimas décadas, com a industrialização e as mudanças nas dietas da população, a relação ômega-6/ômega-3 estão entre 10:1 a 20:1, com descrições de proporções mais elevadas de 50:1 (MASTERS, 1996; MARTIN et al., 2006; SIMOPOULOS, 2008).

Segundo dados do *National Research Council* (NRC) (2006), apenas as exigências de AL é suficientemente documentada para todas as categorias de cães, o mínimo de 1% de AL deve ser incluída na ração de cães. São sugeridas exigências específicas de AL, ALA, AA e para AEP somado ao ADH para cães em crescimento, mas para cães em manutenção e reprodução o AA não apresenta sua exigência definida, como demonstrado na Tabela 1 (CARCIOFI et al., 2002; TREVISAN; KESSLER, 2009).

TABELA 1: Concentração recomendada de gordura e ácidos graxos em rações para cães (em 1Kg de matéria seca).

Item	Valor recomendado		
	Filhotes, crescimento	Cão adulto, manutenção	Fêmea gestante e em lactação
Gordura Total (g)	85	55	85
Ácido cis-linoleico (g)	13	11	13
Ácido alfa-linolênico (g)	0.8	0.44	0.8
Ácido araquidônico (g)	0.3	-	-
Ácido Eicosapentanóico (+)	-	0.44	0.5
Ácido Docosahexaenoico (g)	0.5	-	-

Fonte: Adaptado de NRC, 2006

Diversos estudos têm evidenciado a participação de grupos de ácidos graxos das séries ômega 3 e 6 influenciando as respostas inflamatórias em cães e gatos (TREVISAN; KESSLER, 2009). Os ácidos graxos poli-insaturados possuem um importante papel em diversas funções celulares, atuando principalmente como fonte de

energia, componentes estruturais de membranas e como precursores de eicosanoides, que incluem prostanóides (prostaglandinas e tromboxanos), leucotrienos e lipoxinas, que atuam como mediadores inflamatórios (CARCIOFI et al., 2002; MARTIN et al., 2006; SIMOPOULOS, 2008; LENOX; BAUER, 2013).

Os ácidos graxos de cadeia longa (AA, ADH e AEP) produzem diferentes tipos de eicosanoides. Muitos estudos apontam que os produtos metabólicos de eicosanoides pelo AA, apesar de participarem de inúmeros processos inflamatórios no organismo, apresentam ações pró-inflamatórias e são formados em quantidades maiores do que os metabólicos decorrentes do ADH e AEP, os quais possuem propriedades anti-inflamatórias (Figura 1). Essa produção excessiva dos produtos metabólicos gerados pelo ômega-6 está relacionada com doenças cardiovasculares, alterações inflamatórias e desordens imunológicas, sendo assim, recomenda-se uma maior ingestão de ômega-3, a fim de, aumentar a produção de eicosanoides de ação anti-inflamatória (MARTIN et al., 2006; SIMOPOULOS, 2002; SIMOPOULOS, 2008; LENOX; BAUER, 2013).

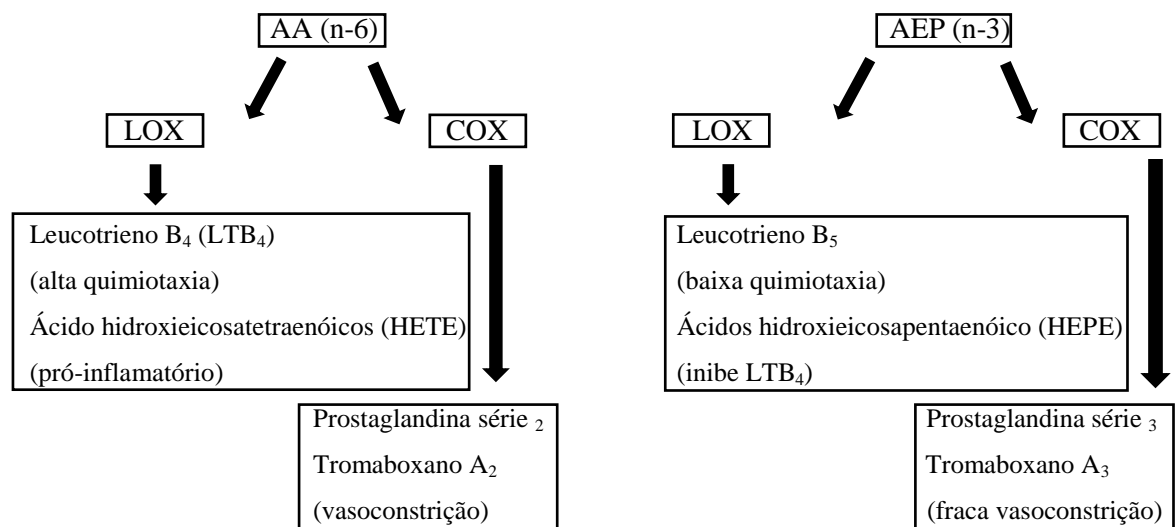


FIGURA 1: Síntese de eicosanoides pelo AA e AEP através da ação enzimática de LOX (lipoxigenase) e COX (ciclo-oxigenase). Adaptado de CARCIOFI et al., 2002.

Após oferecimento de dietas experimentais, com a relação de ômega-6/ômega-3 de 5:1, 10:1, 25:1, 50:1 e 100:1, a produção de eicosanoides da série ômega-3 em cães teve uma resposta significativa em animais alimentados com a proporção ômega-6/ômega-3 de 5:1 e 10:1. Os cães desses grupos sintetizaram 30 a 33% a menos de leucotrienos B₄ e 370 a 500% a mais de leucotrienos B₅ (VAUGHN et al., 1994).

A dieta rica em lipídios pode influenciar no crescimento de tumores de mama em mulheres. Os mecanismos de ação dessa influência pode estar associado ao fato das células tumorais requererem lipídios como combustível metabólico. Ao bloquear a ação de enzimas que participam da síntese de ácidos graxos em células de tumores de mama, notou-se a indução da apoptose e redução no crescimento do tumor. Associado a isto, dietas ricas em lipídios podem exercer ações sobre o desenvolvimento do tumor de mama por mecanismos específicos: modificação da estrutura e função das membranas celulares, biossíntese de eicosanoides, modulação da expressão de genes específicos, aumento da taxa de proliferação celular e efeitos imunossupressores. Esses mecanismos dependem, em grande parte, do tipo e quantidade de lipídios da dieta (ESCRICH et al., 2001).

Porém, estudos sugerem que a quantidade de gordura total da dieta não é tão influenciável na carcinogênese quanto à qualidade dos ácidos graxos da dieta. Acredita-se que os ácidos graxos saturados, o ácido cis-linoleico e uma alta relação ômega-6/ômega-3 geram maior risco no desenvolvimento de tumores mamários, sendo inverso com relação aos ácidos graxos monoinsaturados e da família de ácido alfa-linolênico, que apresentam uma ação mais protetora ao risco de tumores mamários (MENDES, 2008).

Após alimentar animais de laboratórios com dieta sem nenhum tipo de ácido graxo, observou-se que, apesar da redução da incidência tumoral e de sua latência, não houve diferença na taxa do crescimento tumoral quando comparados a animais alimentados com dieta tradicional. Acredita-se que a redução de ácidos graxos na dieta em humanos pode oferecer uma proteção na tumorigênese, mas não depois do aparecimento do tumor (ROSSINI et al., 2013).

A análise dos efeitos do óleo de girassol (70,0% ômega-6 e 0,1% ômega-3), óleo de soja (50,0% ômega-6 e 5,0% ômega-3) e o óleo de perila (15,0% ômega-6 e 65,0% ômega-3) sobre a tumorigênese, evidenciou-se que, o óleo de perila previne o desenvolvimento de tumores de mama em ratos e camundongos (MATSUBA et al., 1998).

Apesar do ácido araquidônico, derivado da dieta com n-6, induzir a apoptose das células tumorais, por desencadear a liberação de proteínas pró-apoptóticas, o AA também é convertido pelas atividades catalíticas da enzima COX, LOX e citocromo p450 em eicosanoides que possuem ação pró-inflamatória e modulam a expressão de

vários oncogenes e anti-oncogenes, atuando na ativação da carcinogênese ou promotores de tumores, participando assim no desenvolvimento do tumor de mama (ABOU-EL-ELA et al., 1988; OGILVIE et al., 2000; COMBA et al., 2010).

Em cadelas, a expressão de COX-2 é mais frequente e mais intensa em tumores malignos quando comparados com tumores benignos. Observou-se que a imunomarcagem de COX-2 foi particularmente mais intensa em tipos histológicos de classificação associados com alta malignidade (DORÉ et al., 2003; MOHAMMED et al., 2004; QUEIROGA; LOPES, 2007).

As alterações no metabolismo do estrógeno, devido a maior atividade da aromatase p450 são estimuladas pela ação da prostaglandina E2, derivada do AA. Em contrapartida, a prostaglandina E3, produto do metabolismo de AEP, não ativa a aromatase p450. Acredita-se que uma maior ingestão de AEP, possa estimular a maior produção de prostaglandina E3, aonde possa diminuir a conversão do estrógeno, prevenindo o risco do crescimento tumoral de células hormônio-dependentes. Mas ainda não há estudos sobre a ação na redução de estrógeno endógeno, através da maior ingestão de AEP, em humanos (NOBLE et al., 1997; LARSSON et al., 2004).

O fornecimento de dietas de baixo teor de gordura contendo ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 a ratas pré-pubescentes, promoveu redução da proliferação de células mamárias, aumento da apoptose, e redução do risco de desenvolvimento de tumores mamários na fase adulta. Já animais que foram alimentados com alto teor de ácidos graxos ômega-6, o efeito foi oposto, aumentando a susceptibilidade de desenvolverem tumores mamários na fase adulta. Conclui-se que a proteção dos animais expostos à dieta de baixo teor de gordura ômega-3 foi associada com uma *up-regulation* de genes antioxidantes, que possuem função de proteger as células contra danos ao DNA, enquanto o aumento da tumorigênese de animais com a dieta de alto teor de ômega-6 foi associada a uma *up-regulation* de genes que induzem a proliferação celular e *down-regulation* de genes que reparam danos no DNA e que induzem a apoptose (OLIVO-MARSTON et al., 2008).

Segundo Mendes (2008), os ácidos graxos poli-insaturados da dieta também podem ter uma ação na carcinogênese devido à peroxidação lipídica. Essa reação gera metabólitos altamente tóxicos que podem lesionar células do organismo, estimulando assim, a proliferação celular, promovendo à carcinogênese.

Estudos apontaram o ômega-3, com sua ação anti-inflamatória, como potencial coadjuvante no tratamento quimioterápico (PARDINI, 2006). Em cães com linfoma, notou-se que o grupo suplementado com dieta rica em ômega-3 obteve uma normalização do ácido-láctico, aumentando o intervalo livre de doença e tempo de sobrevivência (OGILVIE et al., 2000).

Muitos são os efeitos benéficos do ômega-3, mas pesquisas demonstraram que dietas com uma baixa relação ômega-6:ômega-3 (1.4:1) foram correlacionadas com à redução de resposta imune mediada por células em cães, além de um aumento da peroxidação lipídica e baixa concentração de vitamina E. É indicado a suplementação dietética de 10UI (unidades internacionais) de vitamina E para cada grama de óleo de peixe incluído na dieta de cães (WANDER et al., 1997; CARCIOFI et al., 2002).

Apesar dos dados de pesquisa em animais e *in vitro* evidenciaram que o n-3, em especial o EPA e ADH, podem inibir a carcinogênese, os dados epidemiológicos da maior ingestão de óleo de peixes e a proteção no risco de desenvolvimento do tumor de mama ainda não foram evidentes. Novos estudos são necessários para avaliar e verificar a ação da maior ingestão do n-3 como protetor do desenvolvimento de neoplasias (LARSSON et al., 2004).

A hipótese de que a obesidade e o consumo de lipídios podem estar correlacionados com o desenvolvimento de tumores mamários em cadela ainda foi pouco estudada, com escassos dados de pesquisas apresentados. O consumo de lipídios da população canina apresenta pouca diferença quando comparado em dois grupos atendidos de forma aleatória na rotina clínica, pelo fato das fábricas nacionais de alimentos industrializados utilizarem-se das mesmas fontes lipídicas e por não haver um controle da ingestão de alimentos pelos proprietários, que acabam oferecendo alimentos para o consumo próprio e petiscos a seus animais. Mas os dados do perfil lipídico sérico e dos ácidos graxos do tecido adiposo de cães no Brasil são necessários para traçar os níveis lipídicos da população canina, auxiliando na comparação entre grupos controle e com neoplasias.

OBJETIVOS

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar a ação da obesidade, perfil lipídico sérico e níveis de ácidos graxos poli-insaturados do tecido adiposo na tumorigênese mamária em cadelas.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar a obesidade e concentração sérica de colesterol e triglicérides do grupo controle e com tumor mamário.

Determinar o perfil de ácidos graxos do tecido adiposo de cadelas submetidas à castração e à mastectomia.

Avaliar se há uma diferença do perfil de ácidos graxos do tecido adiposo de cães com estudos anteriores.

Avaliar possíveis diferenças nos níveis de ácido cis-linoleico (C 18:2) e alfa-linolênico (C 18:3) do tecido adiposo do grupo controle com animais com tumores de mama.

Avaliar o perfil de ácidos graxos do tecido adiposo, principalmente a relação ômega-6:ômega-3 de animais do grupo controle e com tumor mamário.

Avaliar os fatores nutricionais consumidos com os dados obtidos pela análise sérica lipídica e do perfil de ácidos graxos do tecido adiposo de animais do grupo controle e com tumor mamário.

Avaliar a hipótese de cães com tumores mamários apresentarem perfil lipídico sérico e níveis de ácidos graxos poli-insaturados do tecido adiposo elevados.

MATERIAL E MÉTODOS

4. Material e métodos

Foram selecionadas 40 cadelas encaminhadas ao Ambulatório de Pequenos Animais do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/UNESP) campus Botucatu. A admissão para o projeto incluíam cadelas de diferentes faixas etárias, sem predileção racial que foram separadas em dois grupos de 20 animais, no qual um incluíam-se cadelas que apresentavam neoplasias mamárias, já sugeridas pelo exame de citologia aspirativa e outro grupo com cadelas híginas que eram levadas para castração eletiva, sem presença à palpação de nódulos mamários.

O presente estudo estava de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ UNESP Botucatu, recebendo o protocolo n° 91/ 2012-CEUA, além do consentimento esclarecido dos proprietários de cada animal participante do projeto.

4.1. Anamnese

Foi realizada a anamnese geral e específica do histórico reprodutivo e nutricional do animal. Foram levantados dados como fatores nutricionais e dietéticos ao longo da vida, avaliação da condição corporal, número de gestações, presença de pseudogestação, dentre outros. Esses dados foram anotados em fichas específicas (Anexo I).

4.2. Avaliação sérica de colesterol e triglicérides

No dia da cirurgia, com os animais em jejum alimentar de 12 horas, uma amostra de 5 mL de sangue total foi retirada por venopunção da veia jugular de cada animal de ambos os grupos. Foi centrifugado para a separação do soro, que foi transferido para tubo plástico tipo *ependorf*, identificado e armazenado em *freezer* a -20°C até o momento das análises para realização da dosagem de triglicérides e colesterol.

Os exames bioquímicos foram realizados no Laboratório Clínico do Hospital Veterinário da FMVZ UNESP Botucatu, por meio de kits comerciais e a leitura em espectrofotometria (Espectrofotômetro SB-190 CELM). Os triglicérides foram dosados

pelo método enzimático colorimétrico (Triglicérides-InVitro®) e o colesterol total pelo método enzimático colorimétrico (Colesterol Total-InVitro®).

4.3. Perfil de ácidos graxos do tecido adiposo

4.3.1. Obtenção das amostras

As amostras de tecido adiposo de ambos os grupos foram extraídas durante o procedimento cirúrgico realizado no Centro Cirúrgico do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ UNESP Botucatu. Foram coletados aproximadamente 1,0g de tecido adiposo de cada cadela do grupo controle e do grupo com tumor de mama. No grupo controle foram coletadas amostras de tecido adiposo abdominal de cadelas híginas submetidas à castração eletiva (OSH) e no grupo com tumor de mama foram extraídas durante a mastectomia. Todo o material coletado foi armazenado em criotubos (Figura 2) e mantido em nitrogênio líquido (-196° C) até o momento das análises.



FIGURA 2: Amostra de tecido adiposo de cadelas submetidas à OSH e mastectomia armazenada em criotubo.

4.3.2. Extração lipídica

As amostras foram extraídas e metiladas no Laboratório de Qualidade e Processamento de Carnes, no Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP – Piracicaba.

Para a extração dos lipídios totais foi utilizado o método de Folch et al. (1957) modificado. Foram pesados aproximadamente 300 mg do tecido adiposo, macerados com o auxílio de bastão de vidro em 6 mL de solução de clorofórmio:metanol (2:1). Após 3 minutos de descanso, a amostra foi filtrada com papel filtro para um tubo falcon, adicionando mais 6 mL de solução de clorofórmio:metanol e novamente filtrado para um tubo, adicionando 1,2 mL de solução de cloreto de sódio a 0,73%, homogeneizado em vórtex por 1 minuto e depois em vórtex a 2.400 rpm (rotações por minuto) durante 20 minutos. Foi desprezada a fase superior (60%), a parede do tubo foi lavada com 900 µl de Solução de Folch, esse processo foi repetido por três vezes. Cada amostra foi transferida para um novo tubo, previamente pesado, filtrada com 1 grama de sulfato de anidro. No tubo desprezado foi adicionado 4 mL de solução clorofórmio:metanol, e após uma leve agitação essa solução foi filtrada novamente no papel filtro para o tubo com a amostra final. A amostra foi levada ao Rota Vapor (55°) por 7 minutos, obtendo assim o óleo do tecido adiposo animal (Figura 3).

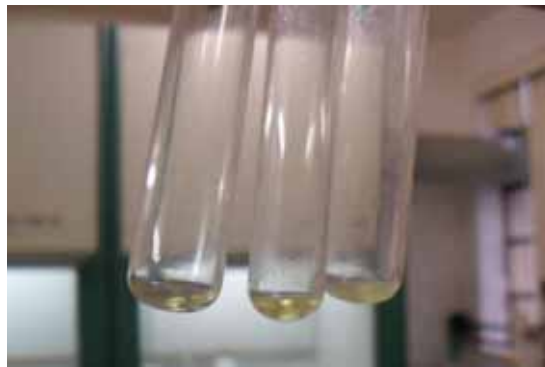


FIGURA 3: Amostra final após extração pelo Método de Folch et al. (1957) modificado.

Para o preparo de ésteres metílicos de ácidos graxos foi utilizado o Procedimento Operacional Padrão (POP) do Laboratório de Óleos e Gorduras do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP – Piracicaba. O método baseia-se na saponificação e esterificação da amostra de óleo segundo Hartman e Lago (1973), com adaptações baseadas no métodos AOCS (*American Oil Chemists Society*) Ce 1b-89.

Foram pesados 30 mg de amostra do óleo obtido pela extração, e adicionados 2 mL do reagente de saponificação, após os tubos foram agitados vigorosamente em

vórtex e aquecidos em banho-maria a 70° durante 5 minutos. Após resfriados em água corrente, foi adicionado 2,5 mL do reagente de esterificação, e novamente os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex e aquecidos em banho-maria a 70° durante 5 minutos e resfriados em água corrente. Foram adicionados 5 mL de n-hexano (grau HPLC), agitados em vórtex, e adicionados 5 mL de solução salina saturada e agitados manualmente, para evitar a formação de emulsão. Após a separação das fases, foi coletado a fase superior e transferidas para um tubo com 5 mL de água destilada, após a separação das fases novamente, a fase superior foi recolhida e transferida para um tubo com 0,5 g de sulfato de sódio anidro. Os ésteres metílicos foram transferidos para um tubo do tipo *ependorf*, mantidos em *freezer* a -20°C até o dia seguinte.

4.3.3. Identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos

Foi utilizada a cromatografia gasosa para a identificação dos ésteres metílicos dos ácido graxos. As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP - Piracicaba. Foi utilizado o Cromatógrafo HP 5890, Série II, utilizando o Software: GC Solutions, Shimadzu, nas seguintes condições: detector FID 280°C, coluna SUPELCO 2560 100m x 0,25mm x 0,2µm. O padrão de referência para comparação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos utilizado foi F.A.M.E Mix C8-22 (Sigma-Aldrich®). Os resultados foram expressos em porcentagem da fração lipídica em relação ao conteúdo total de ácidos graxos da amostra de cada animal do grupo controle e com tumores mamários.

4.4. Análise histológica

Após a realização da mastectomia, foram enviados ao Laboratório de Histopatologia do Serviço de Patologia Veterinária do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ UNESP Botucatu as amostras do tumor mamário e linfonodo sentinela da cadeia mamária, onde foram processados rotineiramente para análise histológica.

4.5. Classificação clínica da neoplasia

Foi realizado o estadiamento clínico das neoplasias mamárias nas cadelas do grupo com tumor mamário, com o objetivo avaliar o tamanho do tumor primário, o comprometimento dos linfonodos regionais e a presença de metástases à distância, principalmente no pulmão. O estadiamento foi realizado seguindo o sistema TNM (tumor, linfonodo e metástases), proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Tabela 2).

Sendo considerado para a classificação clínica da neoplasia, no casos de multicentricidade, o diâmetro do maior tumor e em tumores bilaterais utilizou-se o tumor em estágio mais avançado.

TABELA 2: Estadiamento clínico dos tumores mamários em cadelas, sistema TNM.

T: tumor primário

T₁: menor que 3 cm de diâmetro

T₂: entre 3 e 5 cm de diâmetro

T₃: maior que 5 cm de diâmetro

N: linfonodos regionais

N₀: sem envolvimento neoplásico

N₁: com envolvimento neoplásico

M: metástases a distância

M₀: ausência de metástases a distância

M₁: presença de metástases a distância

Estádios:

I: T₁, N₀, M₀

II: T₂, N₀, M₀

III: T₃, N₀, M₀

IV: Qualquer T, N₁, M₀

V: Qualquer T, qualquer N, M₁

Fonte: Adaptado de Owen, 1980; De Nardi et al., 2008.

4.6. Estatística

Os dados foram analisados por meio de estatística descritiva. Não houve uma homogeneidade com relação à idade, peso, raça, fatores ambientais e dietéticos, por serem selecionados animais da rotina de atendimento do Hospital Veterinário da FMVZ Botucatu, além de que os dados obtidos pelo questionário com os proprietários serem subjetivos. Os resultados das dosagens do perfil lipídico sérico e dos ácidos graxos poli-insaturados foram descritos em forma de média e desvio padrão e comparados de forma numérica entre si.

RESULTADOS

5. Resultados

5.1. Características das amostras

Os dados gerais do grupo controle (G.C.) e do grupo de cadelas com tumor de mama (T.M.) são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3: Dados da avaliação geral das cadelas do grupo controle (G.C.) e do grupo tumor de mama (T.M.). Botucatu, 2014.

Variáveis	G.C.	T.M.
Idade (\bar{x})	06	10
Raças		
<i>Raças puras</i>	09	13
<i>Sem raça definida</i>	11	07
Categoria animal		
<i>Toy e miniatura</i>	08	10
<i>Médio</i>	09	03
<i>Grande e gigante</i>	03	07
Peso (\bar{x})	13,5	16
Avaliação corporal*		
<i>Magro</i>	05	09
<i>Ideal</i>	10	05
<i>Acima do peso</i>	04	06
<i>Obeso mórbido</i>	01	-
Alimentação		
<i>Comida caseira</i>	-	01
<i>Ração</i>	04	03
<i>Ração e comida caseira</i>	16	16

*Critérios utilizados pela Hills (1999).

No grupo controle (n = 20) foram estudados animais de 2 a 10 anos, com média de idade de 6 anos, das raças beagle (n = 1), border collie (n = 2), fox paulistinha (n = 1), labrador (n = 1), weimaraner (n = 1), poodle (n = 3) e sem raça definida (n = 11). No grupo tumor de mama (n = 20) os animais tinham de 8 a 14 anos, média de 10 anos, das

raças boxer (n = 1), cocker spaniel (n = 1), dachshund (n = 1), labrador (n = 1), fila brasileiro (n = 1), pinscher (n = 1), weimaraner (n = 1), west highland white terrier (n = 1), poodle (n = 5) e sem raça definida (n = 7).

As fêmeas do grupo controle foram alimentadas, na sua maioria, com ração (n= 11) até 01 ano de idade, comida caseira e ração (n = 7) e dois proprietários não souberam informar o dado. O escore corporal até 01 ano de idade dos animais desse grupo foi muito magro (n = 2), magro (n = 9), normal (n = 7), sobrepeso (n = 1), e um proprietário não soube informar.

No grupo tumor de mama a alimentação até 01 ano de idade foi comida caseira (n = 2), ração (n = 6), comida caseira e ração (n = 9) e proprietários que não souberam informar (n = 3). Até 01 ano de idade os animais apresentaram escore corporal magro (n = 6), normal (n = 8), sobrepeso (n = 3) e 3 animais os proprietários não souberem informar o dado.

O histórico reprodutivo dos animais do grupo controle e com tumores mamários são apresentados e comparados na Figura 4.

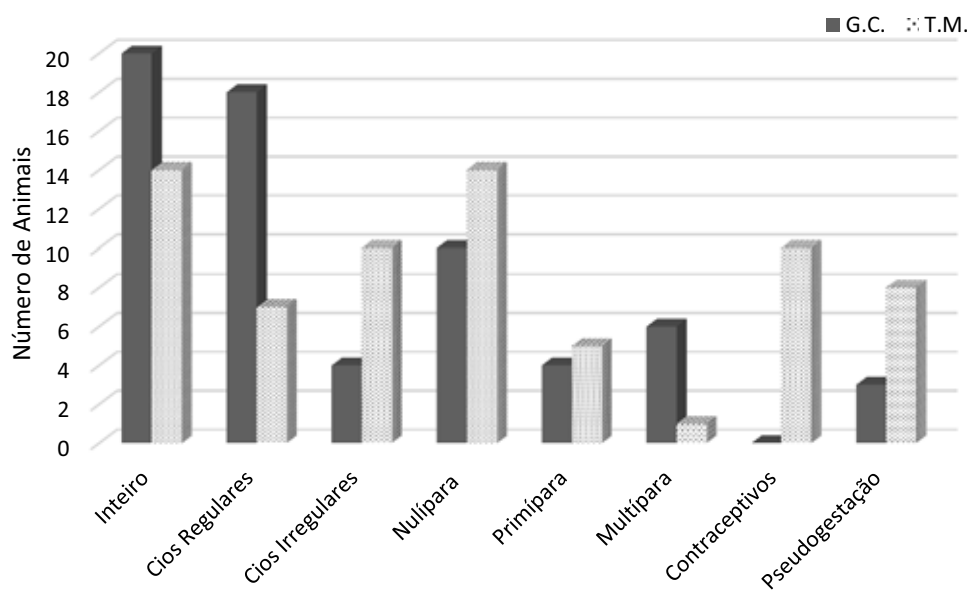


FIGURA 4: Comparação das características prevalentes das cadelas do grupo controle (G.C.) e grupo com tumor de mama (T.M.), com relação ao histórico reprodutivo: animais inteiros, frequência de cios, número de crias, uso de hormônios e frequência de pseudogestação. Botucatu, 2014.

5.2. Avaliação sérica de colesterol e triglicérides

Os resultados referentes às análises séricas de colesterol total e triglicérides do grupo controle e do grupo com tumor de mama estão apresentados na Tabela 4.

TABELA 4: Níveis séricos de colesterol total e triglicérides de cadelas do grupo controle (G.C.) e do grupo tumor de mama (T.M.). Botucatu, 2014.

Variáveis	G.C.*	T.M.*
Colesterol Total (mg/dL)	163,7 ± 46,3	164,6 ± 54,05
Triglicérides (mg/dL)	113,0 ± 27,83	96,98 ± 32,00

*- Valores expressos em média ± desvio padrão.

5.3. Perfil ácidos graxo do tecido adiposo

Foram identificados 7 ácidos graxos no tecido adiposo dos animais de ambos os grupos: ácido mirístico (C 14:0), ácido palmítico (C 16:0), ácido palmitoleico (C 16:1), ácido esteárico (C 18:0), ácido oleico (C 18:1), ácidos cis-linoleico (C 18:2) e ácido alfa-linolênico (C 18:3) (Tabela 5). A relação ômega-6/ômega-3 no grupo controle foi 21:1 e no grupo com tumor de mama foi de 23:1.

TABELA 5: Níveis dos ácidos graxos do tecido adiposo de cadelas do grupo controle (G.C.) e do grupo tumor de mama (T.M.). Botucatu, 2014.

Variáveis	G.C.*	T.M.*
Ácido Mirístico (C 14:0)	3,06 ± 1,01	2,16 ± 1,25
Ácido Palmítico (C 16:0)	19,28 ± 4,34	17,16 ± 4,32
Ácido Palmitoleico (C 16:1)	6,98 ± 2,46	7,09 ± 2,11
Ácido Esteárico (C 18:0)	5,44 ± 2,16	4,42 ± 1,30
Ácido Oleico (C 18:1)	43,14 ± 4,74	45,04 ± 4,41
Ácido Cis-linoleico (C 18:2)	21,42 ± 2,10	23,43 ± 0,38
Ácido Alfa-linolênico (C 18:3)	0,69 ± 0,20	0,70 ± 0,17

*- Valores expressos em média ± desvio padrão.

Os valores dos ácidos graxos identificados foram comparados entre os dois grupos nas Figuras 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11.

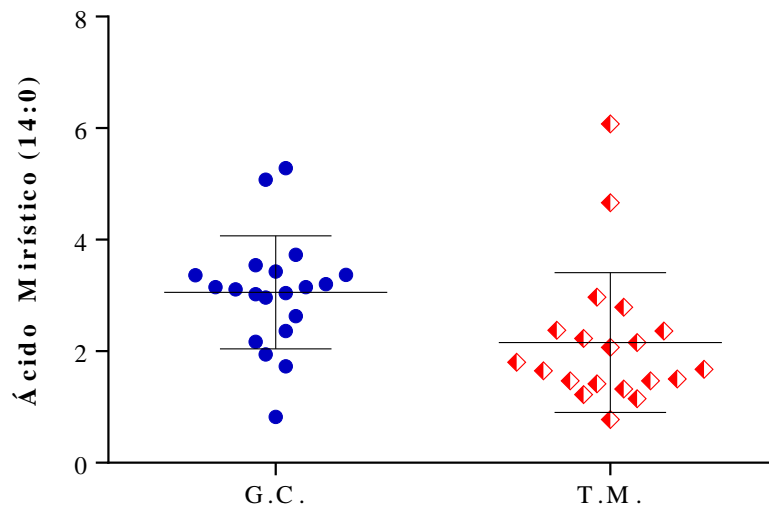


FIGURA 5: Comparação do perfil de ácido mirístico (C 14:0) (porcentagem em relação ao conteúdo total de ácidos graxos) de cadelas do grupo controle (G.C.) e grupo com tumor de mama (T.M.). Sendo apresentado o valor da média (traço maior) e o desvio padrão (traço inferior e superior). Botucatu, 2014.

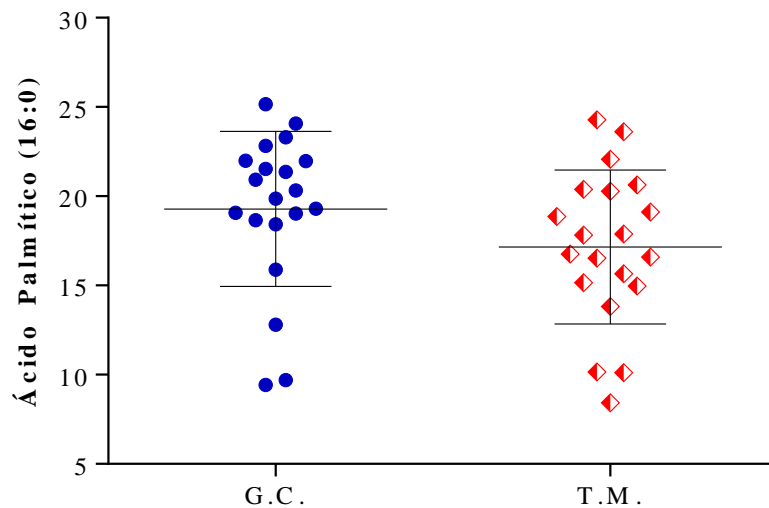


FIGURA 6: Comparação do perfil de ácido palmítico (C 16:0) (porcentagem em relação ao conteúdo total de ácidos graxos) de cadelas do grupo controle (G.C.) e grupo com tumor de mama (T.M.). Sendo apresentado o valor da média (traço maior) e o desvio padrão (traço inferior e superior). Botucatu, 2014.

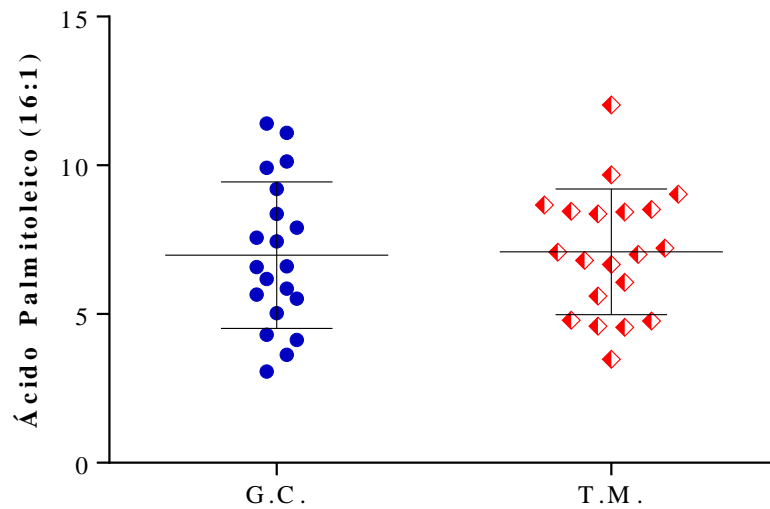


FIGURA 7: Comparação do perfil de ácido palmítico (C 16:1) (porcentagem em relação ao conteúdo total de ácidos graxos) de cadelas do grupo controle (G.C.) e grupo com tumor de mama (T.M.). Sendo apresentado o valor da média (traço maior) e o desvio padrão (traço inferior e superior). Botucatu, 2014.

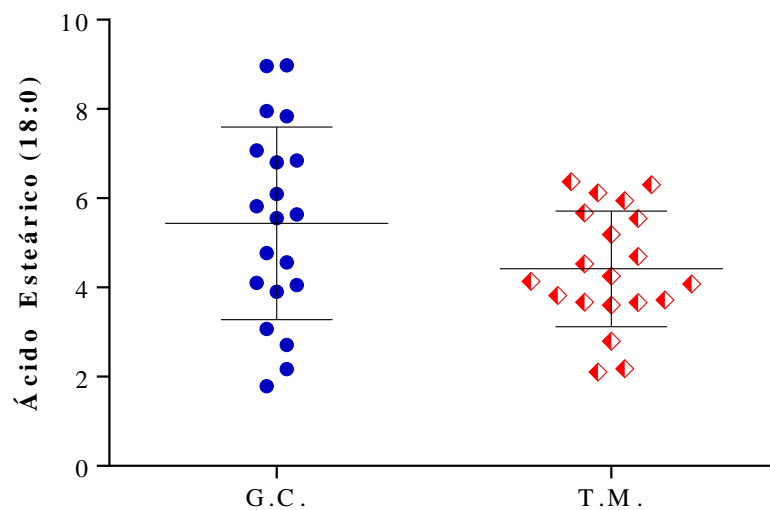


FIGURA 8: Comparação do perfil de ácido esteárico (C 18:0) (porcentagem em relação ao conteúdo total de ácidos graxos) de cadelas do grupo controle (G.C.) e grupo com tumor de mama (T.M.). Sendo apresentado o valor da média (traço maior) e o desvio padrão (traço inferior e superior). Botucatu, 2014.

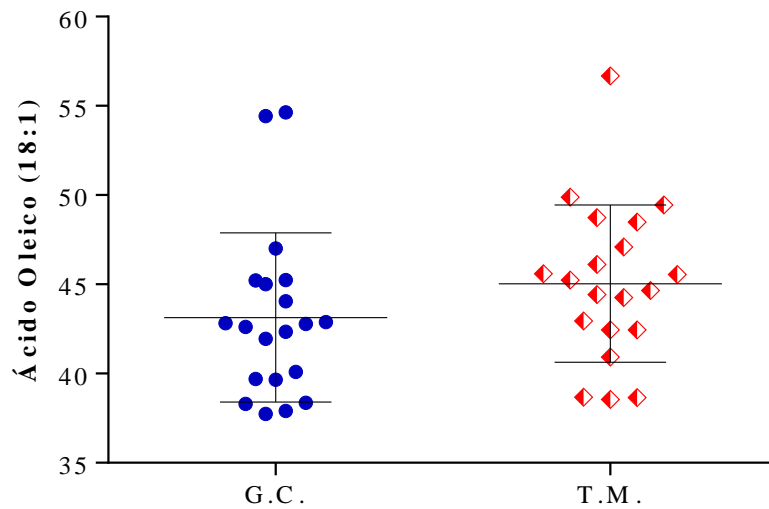


FIGURA 9: Comparação do perfil de ácido oleico (C 18:1) (porcentagem em relação ao conteúdo total de ácidos graxos) de cadelas do grupo controle (G.C.) e grupo com tumor de mama (T.M.). Sendo apresentado o valor da média (traço maior) e o desvio padrão (traço inferior e superior). Botucatu, 2014.

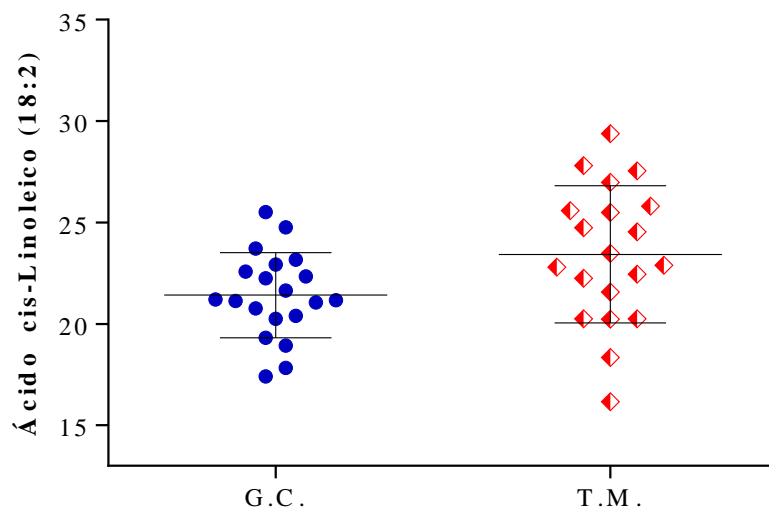


FIGURA 10: Comparação do perfil de ácido cis-linoleico (C 18:2) (porcentagem em relação ao conteúdo total de ácidos graxos) de cadelas do grupo controle (G.C.) e grupo com tumor de mama (T.M.). Sendo apresentado o valor da média (traço maior) e o desvio padrão (traço inferior e superior). Botucatu, 2014.

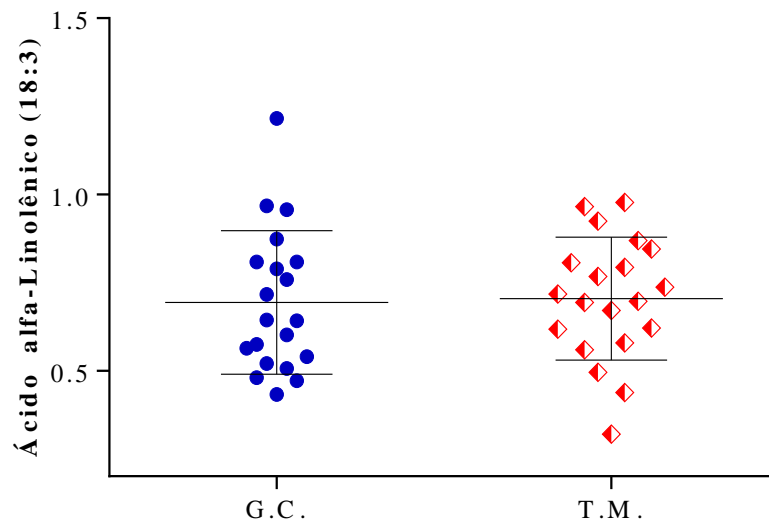


FIGURA 11: Comparação do perfil de ácido alfa-linolênico (C 18:3) (porcentagem em relação ao conteúdo total de ácidos graxos) de cadelas do grupo controle (G.C.) e grupo com tumor de mama (T.M.). Sendo apresentado o valor da média (traço maior) e o desvio padrão (traço inferior e superior). Botucatu, 2014.

5.4. Análise histológica e estadiamento clínico

No grupo com tumor de mama 18/20 animais apresentavam nódulos múltiplos, principalmente bilateral ($n = 12/18$). As mamas mais acometidas foram as abdominais ($n = 26$) e inguinais ($n = 17$), levando em consideração o número total de nódulos em cadelas com tumores múltiplos. O exame histológico evidenciou a metástase em linfonodos sentinelas em 4 cadelas. Com relação à taxa de crescimento, foi relatado pelos proprietários que 50% dos animais apresentaram crescimento tumoral nos últimos 12 meses.

Os resultados das análises histológicas e do estadiamento clínico (I a V) das cadelas do grupo com tumores mamários estão apresentados por ordem de estadiamento na Tabela 6.

TABELA 6: Diagnóstico histopatológico das biópsias mamárias e estadiamento clínico tumoral das cadelas do grupo com tumor de mama. Botucatu, 2014.

Animal	Diagnóstico Histopatológico	Estadiamento Clínico
01	Carcinoma tubular	I
02	Carcinoma em tumor misto	I
03	Carcinoma em tumor misto / adenoma mamário	I
04	Carcinoma tubular	I
05	Carcinoma em tumor misto	I
06	Carcinoma complexo / hiperplasia ductal	I
07	Carcinoma papilar / carcinoma em tumor misto	I
08	Carcinoma tubular	II
09	Carcinoma em tumor misto	II
10	Carcinoma em tumor misto	III
11	Carcinoma complexo	III
12	Carcinoma tubular	III
13	Carcinoma complexo	III
14	Carcinoma complexo / adenoma	III
15	Carcinoma em tumor misto	III
16	Carcinoma em tumor misto / carcinoma complexo	III
17	Carcinoma tubular / tumor misto benigno	IV
18	Carcinoma em tumor misto / carcinoma papilar	IV
19	Carcinoma tubular	IV
20	Carcinoma complexo	IV

DISCUSSÃO

6. Discussão

O tumor de mama é uma das neoplasias mais diagnosticada em cadelas e em mulheres, e compartilham de importantes fatores epidemiológicos, clínico-patológicos e bioquímicos, tornando assim os cães um importante modelo para o estudo da biologia do câncer em humanos (ZUCCARI et al., 2008). Atualmente, apesar de diversos estudos sobre a influência dos fatores hormonais no desenvolvimento dos tumores mamários, os fatores nutricionais, como o lipídio, tem ganhado grande destaque no estudo da sua possível influência na tumorigênese mamária em mulheres (STOLL, 2002; HAKKAK et al. 2005), tornando um linha de pesquisa importante também para o estudo da neoplasia em cadelas.

A diferença de idade entre os dois grupos, no qual a média de cadelas do grupo controle era de 6 anos e do grupo com tumor de mama de 10 anos, mostra a alta incidência do diagnóstico de tumor mamário em cadelas de meia idade, como encontrado também em dados epidemiológicos de estudos anteriores (DALECK et al., 1998; DE NARDI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003; SONREMO et al., 2009; FILHO et al., 2010).

No grupo controle houve uma quantidade maior de animais sem raça definida (SRD) (55%) e no grupo com tumor de mama 65% eram cadelas de raças puras, sendo que 5 animais eram da raça poodle. Dados anteriores dos aspectos epidemiológicos da região de Botucatu-SP, também relataram os poodles como a raça pura mais diagnosticada com neoplasias mamárias (BURINI et al., 2006). Nota-se que a maior prevalência dessa raça é uma influência regional e do perfil da população atendida no Hospital Veterinário da FMVZ de Botucatu, no qual a maioria dos animais de raça puras atendidos em todos os setores da rotina clínica-cirúrgica são poodles.

As cadelas do grupo com tumor de mama foram castradas antes do aparecimento da neoplasia, mas a OSH foi realizada após os 3 anos de idade, demonstrando o aumento do risco da ocorrência de tumores mamários após dois ou mais ciclos estrais e que a influência hormonal no desenvolvimento do tumor mamário em cadelas é um dos fatores com maior importância, tornando a OSH precoce o único método de prevenção (FONSECA; DALECK, 2000; VERSTEGEN; ONCLIN, 2006).

Verificou-se neste estudo que 70% das cadelas com neoplasia mamária eram nulíparas e apenas um animal teve mais de duas crias. Ainda não há uma afirmação

sobre o efeito protetor da gestação no risco de desenvolvimento de tumores mamários, contudo notou-se uma maior incidência da patologia em cadelas nulíparas quando comparadas a cadelas com maior número de crias (KOHLI et al., 1998).

Apesar das controvérsias com relação à influência da pseudogestação na tumorigênese mamária, segundo dados dos proprietários, houve um número maior de relatos de pseudogestação no grupo com tumor de mama. Ainda há a necessidade de novos estudos sobre a pseudogestação predispor a formação de tumores mamários, acredita-se que a patologia possa estar correlacionada também com a maior malignidade dos tumores (RUTTEMAN, 1990; ZUCCARI et al., 2001, OLIVEIRA et al., 2003; SLEECKX et al., 2011). Apesar disso, segundo Morrison (1998), fatores como a pseudogestação e ciclos estrais irregulares, que foi visto em maior número no grupo de cadelas com tumores mamários, não possuem influência na tumorigênese.

No presente estudo o uso de contraceptivos foi observado apenas em cadelas do grupo com tumores mamários, 50% dos proprietários informaram o uso de hormônios, mas não indicaram qual tipo de contraceptivo foi aplicado, limitando a discussão dos dados analisados. O uso de progestágenos e estrógenos associados a progestágenos tem demonstrado aumento da incidência de tumores mamários (MISDORP, 2002; SONREMO, 2003; DE NARDI et al., 2008). Segundo Oliveira et al. (2003), em um grupo de 85 cadelas com tumores mamário foi relatado o uso prévio de progestágenos em 44,4% dos animais.

Houve uma maior localização dos tumores de mama nas glândulas abdominais e inguinais (82%), além da maior ocorrência de tumores bilaterais (60%). Os dados corroboram com a literatura que mostra que 51,8% a 61,1% dos tumores mamários em cadelas estão localizados nas glândulas abdominais e inguinais, acredita-se que o maior volume de parênquima mamário nessas glândulas e as correspondentes alterações proliferativas em resposta ao estrógeno possam influenciar a maior localização dos tumores nessa região (MOULTON, 1990; MISDORP, 2002; QUEIROGA; LOPES, 2002; OLIVEIRA et al., 2003; DE NARDI et al., 2008; SONREMO et al., 2009; FILHO et al., 2010; SHAFIEE et al., 2013).

Com relação ao grupo com tumor mamário a maioria dos animais incluídos na pesquisa apresentavam tumores com mais de 3 cm e em estágios mais avançados, notando que há a necessidade de uma melhor conscientização dos proprietários em buscar precocemente o diagnóstico e tratamento das cadelas ao detectarem aumento de

volume nas mamas. Dentre os tipos histológicos o carcinoma em tumor misto foi o mais diagnosticado, corroborando com dados do último consenso brasileiro de que é o tipo de tumor mais frequentemente diagnosticado em cadelas (CASSALI et al., 2011).

Fatores como a obesidade e alimentação na idade jovem (até 1 ano) foram correlacionados com o maior risco de desenvolvimento dos tumores mamário em cadelas (SONNENSCHNEIN et al., 1991; PÉREZ-ALENZA et al., 2000). Com relação ao histórico alimentar até 1 ano de idade, 55% dos animais do grupo controle foram alimentados apenas com ração, enquanto no grupo com tumor de mama o mesmo número de animais tiveram incluídos em sua alimentação a comida caseira. Com relação à obesidade na idade jovem a maioria dos animais eram magros ou com peso ideal. Notando apenas no presente trabalho, a possível influência do consumo da comida caseira e sua atuação na tumorigênese mamária.

Em ambos os grupos a maioria dos proprietários que ofereceram ração industrializada para os animais na idade jovem, optaram por rações industrializadas de baixo custo e inclusão de comida caseira na vida adulta dos animais, notando uma preocupação maior com a alimentação dos seus animais apenas quando filhotes.

Dezesseis animais (80%) de cada grupo eram alimentados com dieta mista, composta de ração comercial e comida caseira. A carne mais adicionada a alimentação dos animais era a bovina, que estava presente em 65% dos cães alimentados com comida caseira, de ambos os grupos. O óleo mais frequentemente usado na alimentação do grupo controle foi o óleo de soja (50%), já no grupo com tumor de mama estava presente na alimentação de 65% dos animais. Mas a ingestão de comida caseira e carne vermelha não foi associada a maior prevalência de tumores mamários como foi relatado por Pérez-Alenza et al. (1998) e Burini (2002), principalmente porque a dieta de ambos os grupos estudados eram semelhantes.

Não houve uma relevância significativa da ocorrência da obesidade entre o grupo controle e com tumor de mama. Diversos estudos avaliaram a obesidade como um fator importante no risco do desenvolvimento de tumores mamários em mulheres e em cadelas, com relatos de obesidade em 83% dos animais doentes (SONREMO, 2003; BOEING, 2013), não sendo relatado o mesmo no presente trabalho.

Em uma análise geral dos dois grupos todos os animais alimentados apenas com ração apresentavam um escore corporal magro e ideal, já os animais acima do peso e com obesidade mórbida eram alimentados com ração e comida caseira, assim como foi

observado por Sloth (1992). Esses dados demonstram que não há um controle da ingestão alimentar em dietas mistas, dificultando o equilíbrio entre a ingestão e gasto energético, resultando em animais obesos.

Há um excesso de alimentação oferecida aos animais de companhia pelos seus proprietários e baixos níveis de exercícios, favorecendo o desenvolvimento da obesidade. Há uma dificuldade dos proprietários entenderem que o agrado oferecido aos cães por meio de alimentos caseiros e petiscos acaba influenciando de forma negativa a saúde de seus animais. O hábito alimentar do homem está intimamente ligado com o dos cães, pessoas obesas possuem uma tendência a terem cães obesos (MOROOKA et al., 2004; ZORAN, 2010).

No Brasil é comum alimentar os animais com excedentes de alimentos, o desbalanço nutricional é agravado quando oferecido petiscos e os animais que consomem dieta mista possuem altos níveis de glicose e colesterol sérico, sugerindo um maior consumo calórico nesse tipo de dieta e um maior risco de obesidade (GONZÁLEZ et al. 2003; PÖPPL; GONZÁLES, 2005).

No homem, o aumento dos níveis sérico de colesterol, fosfolipídios e triglicérides séricos, também chamado de dislipidemia, são comuns em pacientes obesos. Na medicina veterinária estudos relatam o aumento significativo nos níveis séricos de colesterol total e triglicérides em animais obesos (PEÑA et al., 2008; ZORAN 2010; XENOULIS, 2010).

Conforme os valores de referência de triglicérides (20 a 112 mg/dL) e colesterol total (130 a 270 mg/dL) descritos por Kaneko et al. (2009), o grupo de animais com aumento de peso e obesidade mórbida apresentavam níveis maiores de triglicérides e colesterol, quando comparados ao grupo de animais magros e com peso ideal. Notando que o único animal com hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia era o que apresentava obesidade mórbida, demonstrando a associação da hiperlipidemia em graus maiores de obesidade (BRUNETTO et al., 2011).

No presente estudo a dieta dos animais pouco influenciou nos níveis lipídicos séricos. Não foi observado diferenças no perfil lipídico séricos nos animais alimentados por ração. Os animais que estavam com os níveis séricos de lipídios dentro da normalidade em ambos os grupos, eram em sua maioria, alimentados por ração e comida caseira.

Quando comparados o grupo controle com o grupo com tumor de mama não houve diferença nos níveis séricos de colesterol total e triglicérides, explicado pelo fato desses níveis serem maiores em animais obesos, e a obesidade não foi um fator que teve diferença nos dois grupos, não sendo possível correlacionar os níveis séricos de colesterol total e triglicérides com o risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias.

Como a obesidade é um fator frequente em mulheres diagnosticadas com tumores mamários, nota-se também um aumento significativo dos níveis de colesterol total e triglicérides (RAY; HUSAIN, 2001). Segundo Potischman et al. (1991), em fases mais avançadas do câncer de mama o colesterol pode apresentar níveis mais baixos, sugerindo que os efeitos metabólicos do câncer possam diminuir os níveis séricos de colesterol total.

Os altos níveis de triglicérides podem estar envolvidos na carcinogênese mamária através da diminuição da globulina ligadora de hormônios sexuais, resultando em uma maior circulação de estrógeno livre (TAKATANI et al., 1991).

Para a obtenção do perfil de ácidos graxos do tecido adiposo foi escolhido para realizar a extração lipídica o método de Folch et al. (1957), a metodologia foi baseada nas modificações realizadas por Mendes (2008) mas foram necessárias adaptações na técnica pois a quantidade de tecido e óleo obtido no presente trabalho era muito pequena. Foram realizadas diversas modificações e testes até adequar a metodologia de extração (FOLCH et al., 1957), saponificação e esterificação (HARTMAN; LAGO, 1973) para obter a melhor identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos por cromatografia gasosa.

O perfil de ácidos graxos do tecido adiposo dos animais estudados permitiu a identificação dos ésteres metílicos dos seguintes ácidos graxos: ácido mirístico (C 14:0), ácido palmítico (C 16:0), ácido palmitoleico (C 16:1), ácido esteárico (C 18:0), ácido oleico (C 18:1), ácido cis-linoleico (C 18:2) e ácido alfa-linolênico (C 18:3). Os mesmos ácidos graxos também foram encontrados em estudos anteriores no tecido adiposo de cães, mas foi relatado a determinação de outros ácidos que não foram identificados no presente estudo, como o ácido araquidônico (MILLER et al., 1962, SIMOENS et al., 1995).

Os ésteres metílicos identificados no estudo foram os que apresentavam uma quantidade significativa quando comparado ao tempo de retenção dos ésteres metílicos do padrão de referência. Os picos foram selecionados e identificados permitindo assim

obter os resultados expressos em porcentagem da fração lipídica em relação ao conteúdo total de ácidos graxos do tecido adiposo de cada animal.

Para traçar o perfil de ácidos graxos dos animais o tecido adiposo foi escolhido por refletir com boa precisão a ingestão dietética de lipídios a longo prazo. A correlação entre os ácidos graxos da dieta com o do tecido adiposo é melhor para os ácidos graxos essenciais, sendo proporcional à quantidade ingerida na dieta (NIEL; BEYNEN, 1997; MAILLARD et al., 2002).

Observou-se que o perfil de ácidos graxos do grupo controle foi semelhante ao traçado em cadelas com tumores mamários. Segundo Mendes (2008), não foram vistas diferenças significativas nas análises dos mesmos ácidos graxos em mulheres com doença benigna da mama e com câncer de mama no Brasil. Notou-se uma pequena diferença numérica nos níveis do ácido cis-linoleico (C18:2), que estava discretamente maior em mulheres diagnosticadas com neoplasias mamárias. Dados semelhantes foram relatados por Maillard et al. (2002) em um estudo conduzido na França.

Comparando a média do perfil de ácidos graxos do tecido adiposo dos cães estudados com dados anteriores, nota-se uma grande diferença nos valores obtidos do ácido cis-linoleico (C 18:2). A média e desvio padrão relatado por Miller *et al.* (1962) foi de $13,3 \pm 3,0$, os quais são índices menores dos encontrados neste estudo, $22,4 \pm 3,0$.

A diferença nos valores do ácido cis-linoleico (C 18:2) pode ser justificada pela mudança do padrão de consumo alimentar dos animais nas últimas décadas. Assim como o homem, com a industrialização e urbanização, principalmente em países ocidentais, nota-se o consumo excessivo de gorduras saturadas e ácidos graxos ômega-6 e a baixa ingestão de ômega-3 (BARTSCH et al., 1999; MCENTEE; WHELAN, 2002).

As médias do perfil do ácido palmítico, oleico e cis-linoleico encontrados por Mendes (2008) em mulheres brasileiras foi muito semelhante aos do presente estudo em cadelas, notando que as fontes de lipídios da nutrição humana se assemelham muito com as dos animais no nosso país.

Segundo Apterkmann et al. (2013) a ração comercial é o alimento mais presente na alimentação dos cães, verificamos que 39 animais eram alimentados por ração, mas desses animais 82% dos proprietários também ofereciam comida caseira e petiscos. Geralmente, os animais que tinham incluso na sua alimentação a comida caseira, recebiam os alimentos preparados para o consumo dos moradores da casa. Mostrando que o perfil de consumo de lipídios da população brasileira é o mesmo oferecido a

muitos animais, podendo justificar a semelhança do perfil de ácidos graxos das duas espécies.

No Brasil, segundo Levy et al. (2012), o óleo de soja tem participação relativa de 9,7% no total de calorias, determinado pela aquisição alimentar domiciliar entre 2008 e 2009. Dentre os lipídios, os ácidos graxos poli-insaturados são os macronutrientes que mais participam na alimentação da população brasileira. O óleo de soja apresenta altos índices de ácido cis-linoleico (C 18:2) e baixos de ácido alfa-linolênico (C 18:3). Segundo Zambiasi et al. (2007), o óleo de soja produzido no Brasil tem média de 56,02% e 7,15% de ácido cis-linoleico e alfa-linolênico, respectivamente.

Com relação às rações produzidas no Brasil, os ingredientes vegetais, carne e subprodutos de animais, com exceção do óleo de peixe (salmão), em sua maioria possuem alto níveis de ácido cis-linoleico (C 18:2) e de seu derivado, o ácido araquidônico (AA), e baixo conteúdo de ácido alfa-linolênico (C 18:3) e seus derivados, o ácido eicosapentanoico (AEP) e ácido docosaheptaenoico (ADH) (TREVISAN; KESLLER; 2009).

Baseado nas fontes nutricionais das rações fabricadas no Brasil e no histórico nutricional dos animais que tinham incluídos em sua dieta comida caseira com maior presença do óleo de soja, justifica o alto índice do ácido cis-linoleico (C 18:2) e baixo do alfa-linolênico (C 18:3) nos animais estudados. Notando que, em ambos os grupos, o ácido alfa-linolênico (C 18:3) teve uma baixa proporção. Sendo justificado pela baixa inclusão de óleos e subprodutos ricos nesse tipo de ácido graxo poli-insaturado na alimentação dos cães desta pesquisa.

Os níveis de ácido alfa-linolênico (C 18:3) não apresentaram diferença quando comparado o grupo controle e com tumor de mama. Os baixos índices foram semelhantes aos encontrados em mulheres e cadelas em estudos anteriores (MILLER et al., 1962; SIMOENS et al., 1995; MAILLARD et al., 2002; MENDES, 2008).

Os dados obtidos do perfil de ácidos graxos corroboram com os encontrados por Pérez-Alenza et al. (1998), no qual também não foram observadas diferenças significativas entre o ácido graxo cis-linoleico (C 18:2) e alfa-linolênico (C 18:3) em cadelas controle e com tumores mamários.

Estudos mostram uma forte correlação entre o consumo de gorduras e o desenvolvimento de tumores mamários em mulheres. Dietas com alta proporção de ômega-6 e seu derivado, o ácido araquidônico, estão associadas na ativação da

carcinogênese ou na promoção de tumores, através da liberação de eicosanoides que possuem ações pró-inflamatórias (BARTSCH et al., 1999; ESCRICH et al., 2001; MAILLARD et al., 2002; COMBA et al., 2010).

O efeito protetor do ômega-3 e seus derivados, foram demonstrados em estudos que sugerem o aumento da produção de eicosanoides com ação anti-inflamatória, com ações associadas a *up-regulation* de genes antioxidantes, que possuem função de proteger as células contra danos ao DNA e aumento da apoptose, reduzindo o risco de desenvolvimento de tumores mamários em animais experimentais (MARTIN et al., 2006; OLIVO-MARSTON et al., 2008; SIMOPOULOS, 2008; LENOX; BAUER, 2013).

Com os resultados obtidos na presente pesquisa do histórico nutricional dos animais, altos níveis de ácido graxo cis-linoleico (C 18:2) e baixo de ácido graxo alfa-linolenico (C 18:3) na cadela nota-se que é válida a hipótese de que o homem vem ao longo dos anos interferido nos fatores ambientais e na alimentação de seus animais, e esses fatores podem estar correlacionados com o aumento da incidência de neoplasias em cães (MOULTON, 1990).

Diversas pesquisas sugerem que a alta razão de ômega-6/ômega-3 nas dietas proporcionam o desenvolvimento de diversas doenças, incluindo as neoplasias mamárias. Os valores recomendados da razão ômega-6/ômega-3 na dieta são de 2:1 a 10:1. Mas com a industrialização e alta taxa de inclusão de óleos ricos em ômega-6, há registros de proporções de 50:1 (MASTERS, 1996; MARTIN et al., 2006; SIMOPOULOS, 2002; SIMOPOULOS, 2008).

Segundo Vaughn et al. (1994), a produção de eicosanoides derivados do AEP foi melhor em dietas com proporção ômega-6/ômega-3 de 5:1 e 10:1. Sugerindo assim, que dietas com essa proporção possuem um efeito menor da ação pró-inflamatória dos eicosanoides sintetizados pelo AA, proveniente de dietas ricas em ômega-6.

A relação de ômega-6/ômega-3 no grupo controle foi 21:1 e no grupo com tumor de mama de 23:1, sugerindo que no grupo com neoplasia mamária os animais poderiam ter uma influência maior da ação carcinogênica do ômega-6 e seus derivados. Novos estudos são necessários para avaliar a correlação das proporções de ômega-6/ômega-3 e o desenvolvimento dos tumores de mama em cadelas.

Apesar da conversão em humanos e em animais do ômega-3 em seus derivados serem baixas, o equilíbrio entre a razão ômega-6/ômega-3 proporciona uma redução da

interferência do ômega-6 na conversão do ácido alfa-linolênico em ADH e AEP (MASTERS, 1996; MARTIN et al., 2006; BAUER, 2007; SIMOPOULOS, 2002; BERQUIN et al., 2008; LENOX; BAUER, 2013).

Mas a inclusão de óleos e alimentos ricos em ômega-3 não é tão importante quanto a de fontes prontas de ADH e AEP. Em dados experimentais, a manutenção de altos níveis de ADH, AEP e do total ômega 3 por suplementação com ácidos graxos da série ômega 3, através do óleo de peixe, foi mais importante do que a proporção ômega-6/ômega-3 do alimento total (HALL et al., 2006).

Dietas com uma maior inclusão de ácido oleico (C 18:1) e baixos níveis de ácido cis-linoleico (C 18:2) apresentaram uma redução no risco de desenvolvimento de tumores em animais. Mesmo em dietas com altos índices de gordura o ácido oleico teve um efeito protetor na carcinogênese (TAKESHITA et al., 1997). Mas não foi observada diferença nos níveis desse ácido graxo nas cadelas no grupo controle comparado ao grupo com tumor de mama, assim como observado por Pérez-Alenza et al. (1998).

Os níveis de colesterol total e triglicérides não foram associados a animais com maiores níveis de ácidos graxos no tecido adiposo nos dois grupos estudados. Em pesquisas anteriores animais que receberam dieta livre de ácidos graxos e dieta convencional também não apresentam diferenças nos níveis de colesterol sérico. Apenas o triglicérides sérico foi diretamente correlacionado com os níveis de ácidos graxos da dieta, fator não encontrado no presente trabalho devido a semelhança do perfil dietético de consumo de ácidos graxos dos animais (ROSSINI et al., 2013).

Devido ao tipo de dieta e ingestão de lipídios semelhantes nas cadelas do grupo com tumor de mama, o perfil de ácidos graxos do tecido adiposo das cadelas não apresentaram uma correlação com os tipos histopatológicos e com o estadiamento tumoral.

Cerca de um terço das pesquisas que estudaram a associação dos lipídios e o risco de desenvolvimento de tumores mamários, próstata, endométrio e ovário relataram uma redução do risco no maior consumo de ômega-3. Os demais estudos, ou encontraram uma situação inversa, que não foi estatisticamente significativa, ou não conseguiram encontrar qualquer associação, como ocorreu na presente pesquisa, mostrando que ainda são necessários mais pesquisas para poder elucidar a ação dos ácidos graxos no desenvolvimento do tumor de mama (LARSSON et al., 2004).

A hipótese de que cadelas com tumores mamários apresentam perfil lipídico sérico e níveis de ácidos graxos cis-linoleico (C 18:2) do tecido adiposo elevados não se concretizaram. Notou-se que o tipo de dieta do grupo controle e do grupo com tumor mamário era muito semelhante, não observando assim alterações nos níveis séricos lipídicos e do perfil de ácidos graxos do tecido adiposo. A pesquisa epidemiológica de animais da rotina clínica não apresenta dados tão consistentes como pesquisas em animais de laboratórios que possuem padronização de idade, raça, status corporal e dieta, mostrando a dificuldade ainda de elucidar melhor a ação dos lipídios na carcinogênese mamária, sendo necessária a realização de novas linhas de pesquisas para a melhor compreensão do papel dos nutrientes no desenvolvimento de tumores mamários, auxiliando assim na prevenção desse tipo de neoplasia.

CONCLUSÕES

7. Conclusões

Diante dos resultados obtidos, segundo as condições em que foi realizada a pesquisa, podemos concluir que:

- Não houve uma correlação da obesidade e concentração sérica de colesterol e triglicérides do grupo controle com o grupo com tumor mamário.

- Foi possível a identificação e quantificação do ácido mirístico (C 14:0), ácido palmítico (C 16:0), ácido palmitoleico (C 16:1), ácido esteárico (C 18:0), ácido oleico (C 18:1), ácidos cis-linoleico (C 18:2) e ácido alfa-linolênico (C 18:3) no tecido adiposo das cadelas de ambos os grupos estudados.

- Aumento significativo das concentrações do ácido cis-linoleico (C 18:2) no tecido adiposo de cães nos últimos anos.

- Os níveis de ácido cis-linoleico (C 18:2) e alfa-linolênico (C 18:3) não apresentaram diferença quando comparado o grupo controle e com tumor de mama.

- A relação ômega-6:ômega-3 do grupo com tumor de mama foi maior (23:1) do que os dos animais do grupo controle (21:1).

- O perfil de consumo lipídico dos dois grupos avaliados era semelhante, não sendo observada diferença dos fatores nutricionais com os níveis séricos lipídicos e do perfil de ácidos graxos do tecido adiposo dos animais do grupo controle e com tumor mamário.

- Não foram encontrados níveis aumentados do perfil lipídico sérico e de ácidos graxos poli-insaturados do tecido adiposo de cadelas com tumores mamários.

REFERÊNCIAS

8. Referências

ABOU-EL-ELA, S.H.; PRASSE, K.W.; CARROLL, R.; WADE, A.E.; DHARWADKAR, S.; BUNCE, O.R. Eicosanoid synthesis in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinomas in sprague-dawley rats fed primrose oil, menhaden oil or corn oil diet. *Lipids*, v.23, n.10, p. 948-954, 1988.

APTEKMANN, K.P.; MENDES-JUNIOR, A.F.; SUHETT, W.G.; GUBERMAN, U.C. Manejo nutricional de cães e gatos domiciliados no estado do Espírito Santo – Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.65, n.2, p.455-459, 2013.

ASHBECK, E.L.; ROSENBERG, R.D.; STAUBER, P.M.; KEY, C.R. Benign breast biopsy diagnosis and subsequent risk of breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, v.16, p.467-472, 2007.

BALINT, J.A.; KYRIAKIDES, E.C.; SPITZER, H.L.; MORRISON, E.S. Lecithin fatty acid composition in bile and plasma of man, dogs, rats, and oxen. *Journal of lipid research*, v.6, n.1, p.96-99, 1965.

BARTSCH, H.; NAIR, J.; OWEN, R.W. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis*, v.20, n.12, p.2209-2218, 1999.

BAUER, J.E. Responses of dogs to dietary omega-3 fatty acids. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.231, p. 1657-1661, 2007.

BERQUIN, I.M.; EDWARDS, I.J.; CHEN, Y.Q. Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids. *Cancer Letters*, v.269, p.363-377, 2008.

BLAND, I.M.; GUTHRIE-JONES, A.; HILL, T.J. Dog obesity: Veterinary practices' and owners' opinions on cause and management. *Preventive Veterinary Medicine*, v.94, p. 310-315, 2010.

BOEING, H. Obesity and câncer – The update. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v.27, p.219-227, 2013.

BRENNAN, M.J. Endocrinology in cancer of the breast: status and prospects. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 64, p. 797-809, 1975.

BRODEY, R.S.; GOLDSCHIMIDT, M.H; ROSZEL, J.R. Canine mammary gland neoplasms. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.19, p.61-69, 1983.

BRUNETTO, M.A.; NOGUEIRA, S.; SÁ, F.C.; PEIXOTO, M.; VASCONCELLOS, R.S.; FERRAUDO, A.J.; CARCIOFI, A.C. Correspondence between obesity and hyperlipidemia in dogs. *Ciência Rural*, v.41, n.22, p.266-271, 2011.

BUGER, I.H. Um guia simplificado das necessidades nutricionais. In: EDNEY, A.T.B. *Nutrição do Cão e do Gato: Um manual para estudantes, veterinários, criadores e proprietários*. Barueri: Manole, 1987. p. 15-36.

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

BURINI, C.H.P.; BANDARRA, E.P.; ANDRADE, F.H.E.; ROCHA, N.S.; LOT, R.F.E, MASSENO, A.P.B.; CROCE, G.B.; BATISTA, B.B.A.; LAGOS, M.S. Aspectos epidemiológicos de neoplasia mamária em cães. In: Mostra científica, 9^a, 2006, Botucatu. *Anais ... Botucatu: Unesp*, 2006.

CARCIOFI, A.C.; BAZOLLI, R.S.; PRADA, F. Ácidos graxos poliinsaturados ômega 6 e ômega 3 na alimentação de cães e gatos. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia CRMV-SP*, v.5, n.3, p.268-277, 2002.

CARCIOFI, A.C.; JEREMIAS, J.T. Progresso científico sobre nutrição de animais de companhia na primeira década do século XXI. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v.39, p.35-31, 2010.

CARVALHEIRA, J.B.C.; SAAD, M.J.A. Doenças associadas à resistência à insulina/ hiperinsulinemia, não incluídas na síndrome metabólica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v.50, n.2, p.360-367, 2006.

CASSALI, G.D.; LAVALLE, G.E.; DE NARDI, A.B.; FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A.C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, A.C.; DALECK, C.R.; SALGADO, B.S.; FERNANDES, C.G.; SOBRAL, R.A.; AMORIM, R.L.; GAMBA, C.O.; DAMASCENO, K.A.; AULER, P.A.; MAGALHÃES, G.M.; SILVA, J.O.; RAPOSO, J.B.; FERREIRA, A.M.R.; OLIVEIRA, L.O.; MALM, C.; ZUCCARI, D.A.P.C.; TANAKA, N.M.; RIBEIRO, L.R.; CAMPOS, L.C.; SOUZA, C.M.; LEITE, J.S.; SOARES, L.M.C.; CAVALCANTI, M.F.; FONTELES, Z.G.C.; SCHUCH, I.D.; PANIAGO, J.; OLIVEIRA, T.S.; TERRA, E.M.; CASTANHEIRA, T.L.L.; FELIX, A.O.C.; CARVALHO, G.D.; GUIM, T.N.; GUIM, T.N.; GARRIDO, E.; FERNANDES, S.C.; MAIA, F.C.L.; DAGLI, M.L.Z.; ROCHA, N.S.; FUKUMASU, H.; GRANDI, F.; MACHADO, J.P.; SILVA, S.M.M.S.; BEZERRIL, J.E.; FREHSE, M.S.; ALMEIDA, E.C.P.; CAMPOS, C.B. Consensus for the diagnosis, prognosis and

treatment of canine mammary tumors. *Brazilian journal of veterinary pathology*, v.4, n.2, p.153-180, 2011.

CASE, L.P.; DARISTOTLE, L.; HAYEK, M.; RAASCH, M.F. *Canine and feline nutrition, a resource for companion animal professionals*. 3 ed. Maryland Heights: Mosby Elsevier, 2011. p. 562.

CASSALI, G.D. *Estudos morfológicos, imunohistoquímicos e citométrico de tumores mamários da cadela – aspectos comparativos com neoplasias da mama humana*. 2000. 73f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

COMBA, A.; MAESTRI, D.M.; BERRA, M.A.; GARCIA, C.P.; DAS, U.N.; EYNARD, A.R.; PASQUALINI, M.E. Effect of omega-3 and omega-9 fatty acid rich oils on lipoxygenases and cyclooxygenases enzymes and on the growth of a mammary adenocarcinoma model. *Health and Disease*, v.9, p.112-123, 2010.

DALECK, C.R.; FRANCESCHINI, P.H.; ALESSI, A.C.; SANTANA, A. E.; MARTINS, M. I. M. Aspectos clínico e cirúrgicos do tumor mamário canino. *Ciência rural*, v.28, n.1, p. 95-100, 1998.

DE NARDI, A.B.; RODASKI, S.; ROCHA, N.S.; FERNANDES, S.C. Neoplasias mamárias. In: DALECK, C.R.; DE NARDI, A.B.; RODASKI, S. *Oncologia em cães e gatos*. São Paulo: Roca, 2008. p. 371-384.

DE NARDI, A.B.; RODASKI, S.; SOUSA, R.S.; COSTA, T.A.; MACEDO, T.R.; RODIGHERI, S.M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C.H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da universidade federal do Paraná. *Archives of Veterinary Science*, v.7, n.2, p.15-26, 2002.

DEL GIUDICE, M.E.; FANTUS, I.G.; EZZAT, S.; MCKEOWN-EYSSSEN, G.; PAGE, D.; GOODWIN, P.J. Insulin and related factors in premenopausal breast cancer risk. *Breast Cancer Research and Treatment*, v.47, p.111-120, 1998.

DIEZ M.; NGUYEN, P. Obesidad: epidemiologia, fisiopatologia y cuidados del perro obesos. In: PIBOT, P.; BOURGE, V.; ELIOTT, D.A. *Encyclopedia of Canine Clinical Nutrition*. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2007.

DORÉ, M.; LANTHIER, I.; SIROIS, J. Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumours. *Veterinary Pathology*, v.40, p.207-212, 2003.

ENGSTRÖM, W.; MÖLLERMARK, G.; KÄNGSTRÖM, L.E.; LARSSON, O. Some molecular characteristic of canine mammary tumors and their relationship to biological malignancy and prognosis. *Zoological Science*, v.6, p.15-18, 1989.

ESCRICH E.; SOLANAS, M.; SOLER, M.; DE VILLA, M.C.R.; SÁNCHEZ, J.A.; SEGURA, R. Dietary polyunsaturated n-6 lipids effects on the growth and fatty acid composition of rat mammary tumors. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.12, p.536-549, 2001.

FERRI, S.T.S. Tumores mamários em fêmeas caninas e felinas: revisão de literatura. *A Hora Veterinária*, n. 131, p.64-67, 2003.

FILHO, J.C.O.; KOMMERS, G.D.; MASUDA, E.K.; MARQUES, B.M.; FIGHERA, R.A.; IRIGOYEN, L.F.; BARROS, C.S. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.30, n.2, p.177-185, 2010.

FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *The Journal of Biological Chemistry*, v.226, n.1, p. 497-509, 1957.

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

FRANÇA, J.; SAAD, M.O.B.; SAAD, C.E.P.; SILVA, R.C.; REIS, J.S. Avaliação dos ingredientes convencionais e alternativos em rações de cães e gatos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.40, p.222-231, 2011. (supl. especial)

GARMENDIA, M.L.; PEREIRA, A.; ALVARADO, M.E.; ATALAH, E. Relation between insulin resistance and breast cancer among chilean women. *Annals of Epidemiology*, v. 17, n.6, p.403-409, 2007.

GERALDES, M.; GÄRTNER, F.; SCHMITT, F.N. A immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. *Veterinary Record*, v.146, p.1140-1148, 2000.

GERMAN, A.J. The growing problem of obesity in dogs and cats. *The Journal of Nutrition*, v.136, p.1940s-1946s, 2006.

GLEISSMAN, H.; JOHNSEN, J.I.; KOGNER, P. Omega-3 fatty acids in cancer, the protectors of good and the killers of evil? *Experimental Cell Research*, v.316, p.1365-1373, 2010.

GONZÁLEZ, F.; CARVALHO, V.; MÖLLER, V.; DUARTE, F. Blood biochemical profile in dogs and cats under different feeding diets (Perfil bioquímico sanguíneo em cães e gatos com diferentes regimes alimentares). *Archives of Veterinary Science*, n.8, v.1, p.23-27, 2003.

HAKKAK, R.; HOLLEY, A.W.; MACLEOD, S.L.; SIMPSON, P.M.; FUCHS, G.J.; JO, C.H.; KIEBER-EMMONS, T.; KOROURIAN, S. Obesity promotes 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumor development in female zucker rats. *Breast Cancer Research*, v.7, p. R627-R663, 2005.

HALL, J.A.; PICTON, R.A.; SKINNER, M.M.; JEWELL, D.E.; WANDER, R.C. The (n-3) fatty acid dose, independent of the (n-6) to (n-3) fatty acid ratio, affects the plasma fatty acid profile of normal dogs. *The Journal of nutrition*, v.134, n.9, p.2338-2344, 2006.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. *Laboratory Practice*, v.22, p.475-476, 1973.

HILLS'S. Prevenção da obesidade. In: _____. *Os alimentos mais saudáveis para cães e gatos*. São Paulo, 1999. (Folder).

HOLME, D.W. Alimentos para cães e gatos. In: EDNEY, A.T.B. *Nutrição do Cão e do Gato: Um manual para estudantes, veterinários, criadores e proprietários*. Barueri: Manole, 1987. p.37-51.

ILLERA, J.C.; PÉREZ-ALENZA, M.D.; NIETO, A.; JIMÉNEZ, M.A.; SILVAN, G.; DUNNER, S.; PEÑA, L. Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids*, v.71, p.541-548, 2006.

JEE, S.H.; KIM, H.J.; LEE, J. Obesity, insulin resistance and cancer risk. *Yonsei Medical Journal*, v.46, p.449-455, 2005.

JERICÓ, M. M.; SCHEFER, K.C. Aspectos epidemiológicos dos cães obesos na cidade de São Paulo. *Revista Clínica Veterinária*. São Paulo, n.37, p. 25-29, 2002.

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

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.K.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5 ed., New York: Elsevier, 1997. p.177- 208.

KAIYALA, K. J.; PRIGEON, R. L.; KAHN, S. E.; WOODS, S. C.; PORTE JR, D.; SCHWARTZ, M. W. Reduced β -cell function contributes to impaired glucose tolerance in dogs made obese by high-fat feeding. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, v.277, n.4, p. E659-E667, 1999.

KLOPFLEISCH, R.; VON EULER, H.; SARLI, G.; PINHO, S.S.; GÄRTNER, F.; GRUBER, A.D. Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: News from an old disease. *Veterinary Pathology*, v.48, n.1, p.98-116, 2011.

KOHLI, R.N.; SAIYARI, M.; NADDAF, H.; MOHAMMADIAN, B. Malignant mixed mammary tumour of unusually large size in a bitch. *Indian Veterinary Journal*, v.75, p.113-116, 1998.

KRISTIANSEN, V.M.; NODTVEDT, A.; BREEN, A.M.; LANGELAND, M.; TEIGE, J.; GOLDSCHMIDT, M.; JONASDOTTIR, T.J.; GROTMOL, T.; SORENMO, K. Effect of Ovariohysterectomy at the Time of Tumor Removal in Dogs with Benign Mammary Tumors and Hyperplastic Lesions: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.27, p.935-942, 2013.

LARSSON, S.C.; KUMLIN, M.; ILGEMAN-SUNDBERG, M.; WOLK, A. Dietary long-chain n-3 acids for the prevention of câncer: a review of potential mechanisms. *American Journal Clinical Nutriron*, v.79, p.935-945, 2004.

LENOX, C.E.; BAUER, J.E. Potential adverse effects of omega-3 fatty acids in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.27, p.217-226, 2013.

LEVY, R.B.; CLARO, R.M.; MONDINI, L.; SICHIERI, R.; MONTEIRO, C.A. Distribuição regional e socioeconômica da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil em 2008-2009. *Revista de Saúde Publica*, v.46, n.1, p.6-15, 2012.

MACEWEN, E.G. Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer Metastasis Reviews*, v.9, p.125-136, 1990.

MACEWEN, E.G., WITHROW, S.J. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J., MACEWEN, E.G. *Small animal clinical oncology*. 2 ed. Philadelphia: Saunders, 1996. p.356-372.

MAILLARD, V.; BOUGNOUX, P.; FERRARI, P.; JOURDAN, M. L.; PINAULT, M.; LAVILLONNIÈRE, F.; BODY, G.; FLOCH, O.L.; CHAJÈS, V. N-3 and N-6 fatty acids in breast adipose tissue and relative risk of breast cancer in a case-control study in Tours, France. *International Journal of Cancer*, v.98, n.1, p.78-83, 2002.

MARTIN, C.A.; ALMEIDA, V.V.; RUIZ, M.R.; VISENTAINER, J.E.L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Revista de Nutrição*, v.19, n.6, p.761-770, 2006.

MARTINS, L.R.; LOPES, M.D. Pseudociese canina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.29, n.3/4, p.137-141, 2005.

MASTERS, C. N-3 fatty acids and the peroxisome. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.165, n.2, p.83-93, 1996.

MATSUBA, S.; ITOH, M., JOH, T.; TAKEYAMA, H.; DOHI, N.; WATANABE, S.; OKUYAMA, H. Effect of dietary linoleate/alpha-linolenate balance on experimentally induced gastric injury in rats. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v.59, n.5, p.317-323, 1998.

MCENTEE, M.F.; WHELAN, J. Dietary polyunsaturated fatty acids and colorectal neoplasia. *Biomedicine Pharmacotherapy*, v.56, p.380-387, 2002.

MCGREEVY, P.D.; THOMSON, P.C.; PRIDE, B.A.; FAWCETT, A.; GRASSI, T.; JONES, B. Prevalence of obesity in dogs examined by Australian Veterinary Practices and the risk factors involved. *Veterinary Record*, v.156, p.695-702, 2005.

MENDES, M.C.S. *Perfil de ácidos graxos da dieta e do tecido adiposo mamário e o risco de desenvolvimento de câncer de mama: um estudo caso-controlado*. 2008. 174.f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MIALOT, J. *Patologia da reprodução dos carnívoros domésticos*. Porto Alegre: A hora veterinária, 1988. 190 p.

MILLER, H.I.; GOLD, M., SPITZER, J.J. Removal and mobilization of individual free fatty acids in dogs. *American Journal of Physiology--Legacy Content*, v.202, n.2, p.370-374, 1962.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D.J. *Tumors in domestic animals*. 4. ed. Iowa: Iowa State Press, 2002. p.575-606.

MISDORP, W.; ELSE, W.; HELLM'EN, E.; LIPSCOMB, T.P. Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat. *Armed Forces Institute of Pathology*, 1999. v.7, p.59, 1999.

MOE, L. Population-based incidence of mammary tumors in some dog breeds. *Journal of Reproduction and Fertility*, supl.57, p.439-443, 2001.

MOHAMMED, S.I.; KHAN, K.N.; SELLERS, R.S.; HAYEK, M.G.; DENICOLA, D.B.; WU, L.; BONNEY, P.L.; KNAPP, D.W. Expression of cyclooxygenase-1 and 2 in naturally occurring canine cancer. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v.70, p.479-483, 2004.

MOROOKA, T.; NIIYAMA, M.; KOUGO, A.; SOYA, M.; NUNOME, K. Radiographic evaluation of obesity-caused oppression of the thoracic cavity in beagles. *The Journal of veterinary medical science/the Japanese Society of Veterinary Science*, v.66, n.5, p.489-494, 2004.

MORRIS, J.S.; DOBSON, J.M.; BOSTOCK, M.; O'FARREL, E. Effect of ovariectomy in bitches with mammary neoplasms. *The Veterinary Record*, v. 142, p. 656-658, 1998.

MORRISSON, W.B. Canine and feline mammary tumors. In: _____. *Cancer in dogs and cats. Medical and surgical treatment*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998. cap.39. p. 591-598.

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

NOBLE, L.S.; TAKAYAMA, K.; ZEITOUN, K.M.; PUTMAN, J.M.; JOHNS, D.A.; HINSHELWOOD, M.M.; AGARWAL, V.R.; ZHAO, Y.; CARR, B.R.; BULUN, A.E. Prostaglandin E₂ Stimulates Aromatase Expression in Endometriosis-Derived Stromal Cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.82, p.600-606, 1997.

NOGUEIRA, C.R.; BRENTANI, M.M. Triiodothyronine mimics the effects of estrogen in breast cancer cell lines. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v.59, n.3/4, p. 271-279, 1996.

NRC – National Research Council. *Nutrient Requirements of Dogs and Cats*. Washington: The National Academies Press, 2006.

O'KEEFE, D. A. Tumores do sistema genital e glândulas mamárias. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. *Tratado de medicina interna veterinária*. 4. ed. São Paulo: Manole, 1997. p. 2344-2351.

OGILVIE, G.K.; FETTMAN, M.J.; MALLINCKRODT, C.H.; WALTON, J.A.; HANSEN, R.A.; DAVENPORT, D. J.; GROSS, K. L.; RICHARDSON, K. L.; ROGERS, Q.; HAND, M. S. Effect of fish oil, arginine, and doxorubicin chemotherapy on remission and survival time for dogs with lymphoma. *Cancer*, v. 88, n. 8, p. 1916-1928, 2000.

- OLIVEIRA, L.O.D.; OLIVEIRA, R.T.D.; LORETTI, A.P.; RODRIGUES, R.; DRIEMEIER, D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta scientiae veterinariae*. v.31, n.2, p.105-110, 2003.
- OLIVO-MARSTON, S.E.; ZHU, Y.; LEE, R.Y.; CABANES, A.; KHAN, G.; ZWART, A.; WANG, Y.; CLARKE, R.; HILAKIVI-CLARKE, L. Gene signaling pathways mediating the opposite effects of prepubertal low and high fat n-3 polyunsaturated fatty acid diets on mammary cancer risk. *Cancer Prevention Research*, v.1, n.7, p.532-545, 2008.
- OWEN, L.N. TNM Classification of tumors in domestic animals. *World Health Organization*, Geneva, p.26-32, 1980.
- PARDINI, R.S. Nutritional intervention with omega-3 fatty acids enhances tumor response to anti-neoplastic agents. *Chemico-Biological Interactions*, v.162, p.89-105, 2006.
- PEÑA, L.; SILVAN, G.; PEREZ-ALENZA, M.D.; NETO, A.; ILLERA, J.C. Steroid hormone profile of canine inflammatory mammary carcinoma: a preliminary study. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v.84, p.211-216, 2003.
- PÉREZ-ALENZA, M.P.; PEÑA, L.; DEL CASTILLO, N.; NIETO, A. I. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *Journal of Small Animal*, v.41. p.287-291, 2000.
- PÉREZ-ALENZA, M.P.; RUTTEMAN, G.R.; PEÑA, L.; BEYNEN, A.C.; CUESTA, P. Relation between Habitual Diet and Canine Mammary Tumors in a Case-Control Study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.12, p.132-139, 1998.
- PICHARD, C.; PLU-BUREAU, G.; NEVES-E CASTRO, M.; GOMPE, A. Insulin resistance, obesity and breast cancer risk. *Maturitas*, v.60, p.19-30, 2008.
- POTISCHMAN, N.; MCCULLOCH, C.E.; BYERS, T.; HOUGHTON, L.; NEMOTO, T. Associations between breast cancer, plasma triglycerides, and cholesterol. *Nutrition and Cancer*, v.15, p.205-215, 1991.
- QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.97, p.119-127, 2002.
- QUEIROGA, F.L.; ALVEZ, A.; PIRES, I.; LOPES, C. Expression of Cox-1 and Cox-2 in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, v.136, p.177-185, 2007.

QUEIROGA, F.L.; PEREZ-ALENZA, M.D.; SILVAN, G.; PEÑA, L.; LOPES, C.; ILLERA, J.C. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v.94, p.181-187, 2005.

RAMOS, R.S.; AVANZI, B.R.; VOLPATO, R.; PIGNATON, W.; CASTAN, E.P.; LOPES, M.D. Expressão gênica dos REa, REb, PR nos tumores mamários das cadelas através do q-PCR. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 64, p. 1471-1477, 2012.

RAY, G.; HUSAIN, S.A. Role of lipids, lipoproteins and vitamins in women with breast cancer. *Clinical biochemistry*, v.34, n.1, p.71-76, 2001.

RICHARDS, H.G.; MCNEIL, P.E.; THOMPSON, H.; REID, S.W.J. An epidemiological analysis of a canine-biopsies database compiled by a diagnostic histopathology service. *Preventive Veterinary Medicine*, v.51, p.125-136, 2001.

RIVERA, P.; MELIN, M.; BIAGI, T.; FALL, T.; HAGGSTRÖM, J.; LINDBLAD-TOH, K.; VON EULER, H. Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Research*, v.69, n.22, p. 8770-8774, 2009.

RODASKI, S.; PIEKARZ, C.H. Epidemiologia e etiologia do câncer. In: DALECK, C.R.; DE NARDI, A.B.; RODASKI, S. *Oncologia em cães e gatos*. São Paulo: Roca, 2008. p.1-22.

ROSSINI, A.; ZANOBBIO, L.; SFONDRINI, L.; CAVALLERI, A.; SECRETO, G.; MORELLI, D.; PALAZZO, M.; SOMMARIVA, M.; TAGLIABUE, E.; RUMIO, C.; BALSARI, A. Influence of fatty acid-free diet on mammary tumor development and growth rate in HER-2/neu transgenic mice. *Journal of Cellular Physiology*, v.228, p.242-249, 2013.

RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. *Small animal clinical oncology*. 4.ed. Philadelphia: Sanders, 2007. p.619-636.

SAAD, F.M.O.B.; FRANÇA, J. Alimentação natural para cães e gatos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 39, 2010. (supl. esp.)

SAAD, F.M.O.B.; SALGARELLO, R.M.; GURIAN, T.M. Recentes avanços na Nutrição de Cães e Gatos. *Anais do II Simpósio sobre Nutrição de animais de Estimação*, 2006.

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

SHAFIEE, R.; JAVANBAKHT, J.; ATYABI N.; KHERADMAND, P.; KHERADMAND, D.; BAHRAMI, A.; DARAEI, H.; KHADIVAR, F. Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: an Clinico-Cytohistopathological study with environmental factors influencing public health and medicine. *Cancer Cell International*, v.13, n.1, p.79-90, 2013.

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

SIMOENS, C.; RICHELLE, M.; RÖSSLE, C.; DERLUYN, M.; DECKELBAUM, R.J.; CARPENTIER, Y.A. Manipulation of tissue fatty acid profile by intravenous lipids in dogs. *Clinical nutrition*, v.14, n.3, p.177-185, 1995.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & pharmacotherapy*, v.56, n.8, p.365-379, 2002.

SIMOPOULOS, A.P. The importance of the ômega-6/ômega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*, v.233, p.674-688, 2008.

SLEECKX, N.; DE ROOSTER, H.; VELDHUIS KROEZE E.J.B.; VAN GINNEKEN, C.; VAN BRANTEGEM, L. Canine mammary tumors, an overview. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 46, p.1112–1131, 2011.

SLOTH, C. Practical management of obesity in dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*, v.33, n.4, p.178-182, 1992.

SONNENSCHN, E.G.; GLICKMAN, L.T.; GOLDSCHMIDT, M.H.; MCKEE, L.J. Body conformation, diet and risk of breast cancer in pet dogs: a case control study. *American Journal of Epidemiology*, v.133, n.7, p.694-703, 1991.

SORENMO, K. ; KRISTIANSEN, V.M.; COFONE, M.A.; SHOFER, F.S.; BREEN, A.M.; LANGELAND, M.; MONGIL, C.M.; GRONDAHL, A.M.; TEIGE, J.; GOLDSCHMIDT, M.H. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Veterinary Comparative Oncology*, v.7, n.3, p.162-172, 2009.

- SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 33, n.3, p.573-596, 2003.
- STOLL, B.A. Upper abdominal obesity, insulin resistance and breast cancer risk. *International Journal of Obesity*, v.26, n.6, p.747-754, 2002.
- TAKATANI, O.; OKUMOTO, T.; KOSANO, H. Genesis of breast cancer in Japanese: a possible relationship between sex hormone-binding globulin (SHBG) and serum lipid components. *Breast Cancer Research and Treatment*, v.18, p.527-529, 1991.
- TAKESHITA, M.; UEDA, H.; SHIRABE, K.; HIGUCHI, Y.; YOSHIDA, S. Lack of promotion of colon carcinogenesis by high-oleic safflower oil. *Cancer*, v.79, n.8, p.1487-1493, 1997.
- THURÓCZY, J.; REISVAAG, G.J.K.; PERGE, E.; TIBOLD, A.; SZILÁGYI, J.; BALOGH, L. Immunohistochemical Detection of Progesterone and Cellular Proliferation in Canine Mammary Tumours. *Journal of Comparative Pathology*, v.137, p.122-129, 2007.
- TREVIZAN, L; KESSLER, A.M. Lipídeos na nutrição de cães e gatos: metabolismo, fontes e uso em dietas práticas e terapêuticas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.28, p.15-25, 2009.
- VAUGHN, D. M.; REINHART, G. A.; SWAIM, S. F.; LAUTEN, S. D.; GARNER, C. A.; BOUDREAUX, M. K.; SPANO, J. S.; HOFFMAN, C. E.; CONNER, B. Evaluation of effects of dietary n-6 to n-3 fatty acid ratios on leukotriene b synthesis in dog skin and neutrophils. *Veterinary Dermatology*, v.5, p.163–173, 1994.
- VERSTEGEN, J.P.; ONCLIN, K. Prolactin and anti-prolactinic agents in the pathophysiology and treatment of mammary tumors in the dog. *Proceedings of the North American Veterinary Conference*, 2006.
- WAJCHENBERG, B.L. Tecido adiposo como glândula endócrina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v.44, n.1, p.13-20, 2000.
- WANDER,R.C.elaI. The ratio of dietary n-6 to n-3 fatty acids influences immune system function, eicosanoid metabolism, lipid peroxidation and vitamin E status in aged dogs. *Journal of Nutrition*, v.127, n.6, p.1198-1205, 1997.
- XENOULIS, P.G.; STEINER, J.M. Lipid metabolism and hyperlipidemia in dogs. *Veterinary Journal*, v.183, p.12-21, 2010.

ZAMBIAZI, R.C.; PRZYBYLSKI, R; ZAMBIAZI, M.W.; MENDONÇA, C.B. COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS DE ÓLEOS E GORDURAS VEGETAIS. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v.25, n.1, 2007.

ZIBOH, V.A.; MILLER, C.C.; CHO, Y. Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.71 (suppl), p.361S-366S, 2000.

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

ZUCCARI, D.; BERTON, C.R.; TERZIAN, A.C.B.; RUIZ, C.M. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias-importância dos marcadores imuno histoquímicos nas espécies humana e canina-estudo comparativo. *Arquivos de Ciências da Saúde*, v.5, n.4, p.189-198, 2008.

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

TRABALHO CIENTÍFICO

TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para o periódico “**Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**”

Normas para publicação disponível em:

http://cpro4576.publiccloud.com.br:8080/editora/downloads/normas_de_publicacao_da_revista_ABMVZ_pt.pdf

1 PERFIL LIPÍDICO SÉRICO E DE ÁCIDOS GRAXOS DO TECIDO ADIPOSEO EM
2 CADELAS COM TUMORES MAMÁRIOS: UM ESTUDO CASO-CONTROLE
3
4 SERUM LIPID PROFILE AND ADIPOSE TISSUE FATTY ACIDS IN BITCHES
5 WITH MAMMARY TUMORS: A CASE-CONTROL STUDY
6

7 Sabino, F.A.^{1*}; Prestes, N.C.¹; Volpato, R.¹; Trentin, T.C.¹; Castillo, C.J.C.²;
8 Alencar, S.M.²; Pinto, J.S.S.²; Trevisol, E.¹

9 ¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Botucatu, SP

10 ² Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP – Piracicaba, SP
11

12 * Alameda Manoel Ribas, 60 – sl.05 - Londrina –PR - CEP: 86010-140

13 (43) 9994-6003 email: fabiane_sabino@yahoo.com.br
14

15 **RESUMO**

16 O objetivo foi analisar de forma comparativa o perfil lipídico sérico e de ácidos graxos
17 do tecido adiposo entre cadelas controle (n = 20) e com tumores mamários (n = 20). Os
18 animais foram submetidos à anamnese geral e específica do histórico nutricional e
19 reprodutivo e foi determinado o escore corporal. Dosagem sérica do colesterol total e
20 triglicérides e o perfil dos ácidos graxos do tecido adiposo abdominal das cadelas foram
21 analisados. Os dois grupos avaliados eram alimentados, em sua maioria (80%), com
22 ração comercial e alimento caseiro, com maior inclusão de óleo de soja e carne bovina.
23 Não houve uma associação da obesidade e dos níveis séricos de colesterol total e
24 triglicérides em cadelas com risco de desenvolvimento de tumores mamários. A
25 quantificação relativa dos níveis de ácido alfa-linolênico (C 18:3) e cis-linoleico (C
26 18:2) não apresentaram diferença quando comparado o grupo controle e com tumor de
27 mama. A relação de ômega-6/ômega-3 no grupo controle foi 21:1 e no grupo com tumor
28 de mama de 23:1, sugerindo que cadelas com tumores mamários tinham um maior
29 consumo de ômega-6. Novos estudos são necessários para correlacionar a alta ingestão
30 de ômega-6 e baixa de ômega-3 com o risco do desenvolvimento de tumores mamários
31 em cadelas.

32 **Palavras-chave:** cães, lipídio, neoplasia mamária, ômega-3, ômega-6.
33

34 ABSTRACT

35 The objective was to analyze comparatively the lipid profile in serum and fatty acid
36 profile in adipose tissue from dogs with (n = 20) and without mammary tumors (n = 20).
37 The animals were submitted to anamnesis, general and specific to nutritional and
38 reproductive history. The serum lipid profile the triglycerides and total cholesterol and
39 fatty acid profile were analyzed. Both groups (80%) were fed with commercial dog food
40 adding homemade food, most of them used soy oil to prepare and beef was the most
41 provided kind of protein. None association between obesity, serum total cholesterol
42 levels and triglycerides increasing the risk of development mammary tumors were
43 observed in this study. The relative quantification of alfa-linoleic (C 18:3) and cis-
44 linoleic acid (C 18:2) levels did not had any difference when comparing control group
45 and tumor group. The proportion of omega6/omega3 in control group was 21:1 and in
46 tumor group it was 23:1, suggesting that dogs with mammary tumor had a higher
47 consumption of omega-6. More researches must be conducted to search a relationship
48 between high ingestion of omega-6 and low ingestion of omega 3 with the risk of
49 development of mammary tumors in bitches.

50 **Keywords:** bitches, lipid, mammary tumor, omega-6, omega-3.

51

52 INTRODUÇÃO

53

54 O aumento da incidência de neoplasias na medicina veterinária ao longo dos
55 anos pode ter relação com o aumento da longevidade dos pacientes, devido à melhora
56 da qualidade de vida dos animais, que também acarreta na maior ocorrência de doenças
57 crônicas. O mesmo tem sido observado em humanos. (Moulton, 1990; Richards *et al.*,
58 2001; De Nardi *et al.*, 2002).

59 Acredita-se que há uma maior exposição da sociedade moderna à fatores
60 ambientais, químicos, hormonais e nutricionais que são potencialmente carcinogênicos
61 e juntamente com esse novo estilo de vida, há a interferência do homem nos hábitos
62 alimentares dos animais e no seu ambiente, podendo estar correlacionados ao aumento
63 de casos de neoplasias em animais de companhia (Moulton, 1990).

64 A nutrição é apontado como um dos principais fatores relacionados com a
65 manutenção da saúde de cães e gatos (Aptekmann *et al.*, 2013). A dieta não pode ser
66 considerada somente como fonte de nutrientes, pois há várias substâncias em sua

67 composição que podem promover ou inibir o processo da carcinogênese. Apesar dos
68 estudos que relacionam o tipo de dieta e o desenvolvimento dos tumores em animais
69 serem escassos, alguns dados são baseados em estudos da medicina, nos quais se estima
70 que a dieta possa causar cerca de 20 a 30% de todas as neoplasias na espécie humana
71 em países economicamente desenvolvidos (Rodaski e Piekarz, 2008).

72 As neoplasias mamárias são os tumores mais comuns que acometem fêmeas
73 caninas não castradas e são de duas a três vezes mais frequentes do que nas mulheres.
74 As duas espécies compartilham de importantes fatores epidemiológicos, clínico-
75 patológicos e bioquímicos, tornando assim os cães um importante modelo para o estudo
76 da biologia do câncer em humanos (Moulton, 1990; Sonremo, 2003; Zuccari *et al.*,
77 2008).

78 A idade avançada, obesidade no primeiro ano de idade, maior percentual de
79 consumo de carne vermelha, principalmente bovina e suína e uma maior proporção de
80 consumo de comida caseira foram independentemente associados ao maior risco de
81 tumores mamários em cães. Com base nesse estudo, a dieta numa fase precoce da idade
82 do animal não pode ser excluída de influenciar a tumorigênese mamária (Sonnenschein
83 *et al.*, 1991; Pérez-Alenza *et al.*, 2000).

84 A dieta rica em lipídios pode influenciar no crescimento de tumores de mama
85 em mulheres. Os mecanismos de ação dessa influência pode estar associado ao fato das
86 células tumorais requererem lipídios como combustível metabólico. Ao bloquear a ação
87 de enzimas que participam da síntese de ácidos graxos em células de tumores de mama,
88 notou-se a indução da apoptose e redução no crescimento do tumor. Associado a isto,
89 dietas ricas em lipídios podem exercer ações sobre o desenvolvimento do tumor de
90 mama por mecanismos específicos: modificação da estrutura e função das membranas
91 celulares, biossíntese de eicosanoides, modulação da expressão de genes específicos,
92 aumento da taxa de proliferação celular e efeitos imunossupressores. Esses mecanismos
93 dependem, em grande parte, do tipo e quantidade de lipídios da dieta (Escrich *et al.*,
94 2001).

95 Acredita-se que o consumo excessivo de gorduras saturadas e ácidos graxos
96 ômega-6 e a baixa ingestão de ômega-3 propiciam o aparecimento de doenças
97 cardiovasculares e câncer (Mcentee e Whelan, 2002). Atualmente, a dieta ocidental, rica
98 em ácidos graxos ômega-6, contém uma grande desproporção na relação entre os ácidos
99 graxos ômega-6 e ômega-3, sendo o alvo de estudos como possível causa do

100 aparecimento de tumores, principalmente neoplasias mamárias em mulheres (Berquin *et*
101 *al.*, 2008).

102 Os ácidos graxos de cadeia longa derivados do ácido cis-linoleico (ômega-6) e
103 do ácido alfa-linolênico (C 18:3) produzem diferentes tipos de eicosanoides. Muitos
104 estudos apontam que os produtos metabólicos de eicosanoides derivados de ômega-6
105 apresentam ações pró-inflamatórias e são formados em quantidades maiores do que os
106 metabólicos decorrentes dos eicosanoides derivados de ômega-3, que possuem
107 propriedades anti-inflamatórias. Essa produção excessiva dos produtos metabólicos
108 gerados pelo ômega-6 está relacionada com doenças cardiovasculares, alterações
109 inflamatórias e desordens imunológicas, sendo assim, recomenda-se uma maior ingestão
110 de ômega-3, a fim de, aumentar a produção de eicosanoides de ação anti-inflamatória
111 (Martin *et al.*, 2006; Simopoulos, 2002; Lenox e Bauer, 2013).

112 O fornecimento de dietas de baixo teor de gordura contendo ácidos graxos poli-
113 insaturados ômega-3 à ratas pré-puberes, promoveu redução da proliferação de células
114 mamárias, aumento da apoptose, e redução do risco de desenvolvimento de tumores
115 mamários na fase adulta. Já animais que foram alimentados com alto teor de ácidos
116 graxos ômega-6, o efeito foi oposto, aumentando a susceptibilidade de desenvolverem
117 tumores mamários na fase adulta. Conclui-se que a proteção dos animais expostos à
118 dieta de baixo teor de gordura ômega-3 foi associada com uma *up-regulation* de genes
119 antioxidantes, que possuem função de proteger as células contra danos ao DNA,
120 enquanto o aumento da tumorigênese de animais com a dieta de alto teor de ômega-6 foi
121 associada a uma *up-regulation* de genes que induzem a proliferação celular e *down-*
122 *regulation* de genes que reparam danos no DNA e que induzem a apoptose (Olivo-
123 Marston *et al.*, 2008).

124 Apesar dos dados de pesquisa em animais e *in vitro* que evidenciam que o
125 ômega-3 podem inibir a carcinogênese, os dados epidemiológicos da maior ingestão de
126 óleo de peixes e a proteção no risco de desenvolvimento do tumor de mama ainda não
127 foram evidentes. Novos estudos são necessários para avaliar e verificar a ação da maior
128 ingestão do ômega-3 como protetor do desenvolvimento de neoplasias (Larsson *et al.*,
129 2004).

130

131 MATERIAL E MÉTODOS

132

133 A presente pesquisa estava de acordo com os Princípios Éticos na
134 Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais
135 (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP Botucatu,
136 recebendo o protocolo nº 91/ 2012-CEUA, além do consentimento esclarecido dos
137 proprietários de cada animal participante do projeto

138 Foram selecionadas 40 cadelas de diferentes faixas etárias, sem predileção racial
139 que foram separadas em dois grupos de 20 animais, no qual um incluíam-se cadelas que
140 apresentavam neoplasias mamárias, já sugeridas pelo exame de citologia aspirativa e
141 outro grupo com cadelas híginas que eram levadas para castração eletiva, sem presença
142 à palpação de nódulos mamários.

143 Foi realizada a anamnese geral e específica do histórico reprodutivo e nutricional
144 dos animais, avaliando dados como fatores nutricionais e dietéticos ao longo da vida,
145 avaliação da condição corporal, número de gestações, presença de pseudogestação,
146 dentre outros.

147 Uma amostra de 5 mL de sangue total foi retirada por venopunção da veia
148 jugular para realização da dosagem de triglicérides e colesterol total de cada animal de
149 ambos os grupos. O sangue foi coletado no dia da cirurgia, com os animais em jejum
150 alimentar de 12 horas. As análises foram realizadas por meio de kits comerciais pelo
151 método enzimático colorimétrico, com leitura em espectrofotometria
152 (Espectrofotômetro SB-190 CELM).

153 As amostras de tecido adiposo de ambos os grupos foram extraídas durante o
154 procedimento cirúrgico. Foram coletados aproximadamente 1,0g de tecido adiposo de
155 cada cadela do grupo controle e do grupo com tumor de mama. No grupo controle
156 foram coletadas amostras de tecido adiposo abdominal de cadelas híginas submetidas a
157 castração eletiva e no grupo com tumor de cadelas submetidas à mastectomia. Todo o
158 material coletado foi armazenado em criotubos e mantidos em nitrogênio líquido (-196°
159 C) até o momento das análises.

160 Foi utilizada a cromatografia gasosa para a identificação dos ésteres metílicos
161 dos ácidos graxos. Os resultados foram expressos em porcentagem da fração lipídica em
162 relação ao conteúdo total de ácidos graxos da amostra de cada animal do grupo controle
163 e com tumores mamários.

164 Os resultados foram analisados por meio de estatística descritiva, em forma de
165 média e desvio padrão.

166

167 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

168

169 Dezesseis animais (80%) de cada grupo eram alimentados por uma dieta mista,
170 composta de ração comercial e comida caseira. A carne mais adicionada a alimentação
171 dos animais era a bovina, que estava presente em 65% dos cães alimentados com
172 comida caseira, de ambos os grupos. O óleo mais frequentemente usado na alimentação
173 do grupo controle foi o óleo de soja (50%), já no grupo com tumor de mama estava
174 presente na alimentação de 65% dos animais. Porém a ingestão de comida caseira e
175 carne vermelha não foi associada a maior prevalência de tumores mamários (Pérez-
176 Alenza *et al.*, 1998).

177 Em uma análise geral dos dois grupos, 7 animais eram alimentados apenas com
178 ração, sendo 4 do grupo controle e 3 do grupo com tumor de mama. Observa-se que
179 todos apresentavam um escore corporal magro e ideal, notando que os animais obesos
180 eram do grupo alimentados com ração e comida caseira, assim como foi observado por
181 Sloth (1992). Esses dados demonstram que não há um controle da ingestão alimentar
182 em dietas mistas, dificultando o equilíbrio entre a ingestão e gasto energético,
183 resultando em animais obesos.

184 O histórico alimentar até 1 ano de idade mostra que no grupo controle, 55% dos
185 animais foram alimentados apenas com ração, enquanto no grupo com tumor de mama
186 o mesmo número de animais tiveram incluídos em sua alimentação a comida caseira.
187 Apenas um animal teve histórico de obesidade na idade jovem no grupo controle, 90%
188 dos animais tinham um escore corporal magro a ideal. No grupo tumor de mama 15%
189 dos animais foram obesos até um ano de idade. Nota-se uma influência do consumo da
190 comida caseira e da obesidade no início da vida dos animais e sua possível atuação no
191 risco de desenvolvimento do tumor mamário na vida adulta, corroborando com os dados
192 relatados por Sonnenschein *et al.* (1991) e Pérez-Alenza *et al.* (2000).

193 Nas Tabelas 1 e 2 apresenta-se os valores em média e desvio padrão das
194 quantificações séricas de colesterol total e triglicérides, e do perfil de ácidos graxos do
195 tecido adiposo do grupo controle (G.C.) e com tumores mamários (T.M.).

196

197 TABELA 1. Níveis séricos de colesterol total e triglicérides do grupo controle (G.C.) e
198 do grupo tumor de mama (T.M.). Botucatu, 2014.

Variáveis	G.C.*	T.M.*
Colesterol Total (mg/dL)	163,7 ± 46,3	164,6 ± 54,05
Triglicérides (mg/dL)	113,0 ± 27,83	96,98 ± 32,00

*- Valores expressos em média ± desvio padrão.

199 TABELA 2. Níveis dos ácidos graxos do tecido adiposo do grupo controle (G.C.) e do
200 grupo tumor de mama (T.M.). Botucatu, 2014.

Variáveis	G.C.*	T.M.*
Ácido Mirístico (C 14:0)	3,06 ± 1,01	2,16 ± 1,25
Ácido Palmítico (C 16:0)	19,28 ± 4,34	17,16 ± 4,32
Ácido Palmitoleico (C 16:1)	6,98 ± 2,46	7,09 ± 2,11
Ácido Esteárico (C 18:0)	5,44 ± 2,16	4,42 ± 1,30
Ácido Oleico (C 18:1)	43,14 ± 4,74	45,04 ± 4,41
Ácido Cis-linoleico (C 18:2)	21,42 ± 2,10	23,43 ± 0,38
Ácido Alfa-linolênico (C 18:3)	0,69 ± 0,20	0,70 ± 0,17

*- Valores expressos em média ± desvio padrão.

201 Não houve diferença nos níveis de colesterol sérico total, com valores dentro da
202 normalidade nos dois grupos. O triglicérides sérico apresentou níveis maiores no grupo
203 controle, com média superior aos valores de referência, já a média do grupo com tumor
204 de mama estava dentro da normalidade.

205 Dados que diferem dos relatados em mulheres com câncer de mama. Relata-se um
206 aumento significativo dos níveis de colesterol total e triglicérides em mulheres com
207 neoplasia mamária (Ray e Husain, 2001). Segundo Potischman *et al.* (1991), em fases
208 mais avançadas do câncer de mama o colesterol pode apresentar níveis mais baixos,
209 sugerindo que os efeito metabólicos do câncer possam diminuir os níveis séricos de
210 colesterol.

211 A dieta dos animais pouco influenciou nos níveis lipídicos séricos. Não foi
212 observado diferenças no perfil lipídico séricos em animais alimentados por ração. Os
213 animais que estavam com os níveis séricos de lipídios dentro da normalidade em ambos
214 os grupos, eram em sua maioria, alimentados por ração e comida caseira.

215 Os níveis de colesterol e triglicérides não foram associados a animais com
216 maiores níveis de ácidos graxos no tecido adiposo nos dois grupos estudados. Animais
217 que receberam dieta livre de ácidos graxos e convencional também não apresentaram

218 diferenças nos níveis de colesterol sérico, mas o triglicéride sérico apresentou níveis
219 menores em animais que receberam a dieta livre dos ácidos graxos (Rossini *et al.*,
220 2013).

221 Os ésteres metílicos identificados no estudo foram os que apresentavam uma
222 quantidade significativa quando comparado ao tempo de retenção dos ésteres metílicos
223 do padrão de referência. Os mesmo ácidos graxos também foram encontrados em
224 estudos anteriores no tecido adiposo de cães, mas foi relatado a determinação de outros
225 ácidos que não foram identificados no presente estudo, como o ácido araquidônico
226 (Miller *et al.*, 1962, Simoens *et al.*, 1995).

227 Segundo Mendes (2008), não foram vistas diferenças significativas nas análises
228 dos mesmos ácidos graxos em mulheres doença benigna da mama e com câncer de
229 mama no Brasil. Apenas o conteúdo total de ácidos graxos poli-insaturados total teve
230 uma associação direta com o câncer de mama. Notou-se uma pequena diferença
231 numérica nos níveis do ácido cis-linoleico (C18:2), que estava discretamente maior em
232 mulheres diagnosticadas com neoplasias mamárias. Dados semelhantes foram relatados
233 por em um estudo conduzido na França (Maillard *et al.*, 2002).

234 Os valores dos ácidos graxos das cadelas foram similares com os encontrados em
235 mulheres no Brasil (Mendes, 2008). Apesar da ração comercial ser o alimento mais
236 presente na alimentação dos cães, 74% dos proprietários também oferecem alimentos
237 preparados para o consumo familiar, mostrando que o perfil de consumo de lipídios da
238 população brasileira é o mesmo oferecido a muitos animais, podendo justificar a
239 semelhança do perfil de ácidos graxos das duas espécies (Apterkmann *et al.*, 2013).

240 Comparando a média do perfil de ácidos graxos do tecido adiposo dos cães
241 estudados com os dados anteriores, nota-se uma grande diferença nos valores obtidos do
242 ácido cis-linoleico (C 18:2). A média e desvio padrão relatado por Miller *et al.* (1962)
243 foi de $13,3 \pm 3,0$, os quais são índices menores dos encontrados neste estudo, $22,4 \pm 3,0$.

244 A diferença nos valores do ácido cis-linoleico (C 18:2) pode ser justificada pela
245 mudança do padrão de consumo alimentar dos animais nas últimas décadas. Assim
246 como o homem, com a industrialização e urbanização, principalmente em países
247 ocidentais, nota-se o consumo excessivo de gorduras saturadas e ácidos graxos ômega-6
248 e a baixa ingestão de ômega-3 (Bartsch *et al.*, 1999; Mcentee e Whelan, 2002).

249 A média do ácido cis-linoleico (C 18:2) foi semelhante nos dois grupos. A
250 alimentação dos animais em sua maioria era mista (comida caseira e ração).

251 Geralmente, os animais que tinham incluso na sua alimentação a comida caseira,
252 recebiam os alimentos preparados para o consumo dos moradores da casa, com isso foi
253 avaliado o tipo de óleo usado em cada domicílio. O uso do óleo de soja na alimentação
254 caseira teve uma maior ocorrência no grupo com tumor mamário.

255 Os níveis de ácido alfa-linolênico (C 18:3) não apresentaram diferença quando
256 comparado o grupo controle e com tumor de mama. Os baixos índices foram
257 semelhantes aos encontrados em mulheres e cadelas em estudos anteriores (Miller *et al.*,
258 1962; Simoens *et al.*, 1995; Maillard *et al.*, 2002; Mendes, 2008).

259 O maior consumo do óleo de soja na comida caseira pode justificar o alto índice
260 do ácido cis-linoleico (C 18:2) e baixo do alfa-linolênico (C 18:3) nos animais
261 estudados, constando-se que, em ambos os grupos, o ácido alfa-linolênico (C 18:3) teve
262 uma baixa proporção. Sendo justificado pela baixa inclusão de óleos e subprodutos ricos
263 nesse tipo de ácido graxo poli-insaturado na alimentação dos cães desta pesquisa.

264 O ácido cis-linoleico (C 18:2) teve níveis maiores no grupo de cadelas com tumor
265 mamário e também em outras pesquisas com mulheres com câncer de mama (Maillard
266 *et al.*, 2002; Mendes, 2008). Apesar de não serem valores que apresentaram diferenças
267 estatísticas, sugerem que, dietas ricas em ômega-6 podem predispor o risco do
268 desenvolvimento de tumores mamários.

269 A relação de ômega-6/ômega-3 no grupo controle foi 21:1 e no grupo com tumor
270 de mama de 23:1, sugerindo que no grupo com neoplasia mamária os animais poderiam
271 ter uma influência maior da ação carcinogênica do ômega-6 e seus derivados. Novos
272 estudos são necessários para avaliar a correlação das proporções de n-6/n-3 e o
273 desenvolvimento dos tumores de mama em cadelas.

274 Segundo Pérez-Alenza *et al.* (1998) não foram observadas diferenças
275 significantes entre o ácido graxo cis-linoleico (C 18:2) e alfa-linolênico (C 18:3) em
276 cadelas controle e com tumores mamários.

277 Em cães, segundo Vaughn *et al.* (1994), a produção de eicosanoides pró-
278 inflamatórios dos derivados do ômega-3 foi melhor em dietas com proporção ômega-
279 6/ômega-3 de 5:1 e 10:1, sugerindo assim, que dietas com essa proporção possuem um
280 efeito menor da ação pró-inflamatória dos eicosanoides sintetizados pelo ácido
281 araquidônico, proveniente de dietas ricas em ômega-6.

282 O equilíbrio entre a razão ômega-6/ômega-3 proporciona uma redução da
283 interferência do ácido graxo cis-linoleico (C 18:2), e seu derivado o ácido araquidônico,

284 na conversão do ácido alfa-linolênico (C 18:3) em seus derivados, o ácido
285 eicosapentanóico e ácido docosaheptaenoico. Em humanos e em animais essa conversão
286 da série ômega-3 é baixa, sugerindo a maior ingestão desses ácidos já prontos através do
287 óleo de peixe (salmão e atum) (Martin *et al.*, 2006; Simopoulos, 2002; Berquin *et al.*,
288 2008; Lenox e Bauer, 2013).

289 Cerca de um terço das pesquisas que estudaram a associação de óleo de peixe e a
290 ingestão de ômega-3 e o risco de desenvolvimento de tumores mamários, próstata,
291 endométrio e ovário relataram uma redução do risco. Os demais estudos, ou
292 encontraram uma situação inversa, que não foi estatisticamente significativa, ou não
293 conseguiram encontrar qualquer associação, mostrando que ainda são necessários mais
294 pesquisas para poder elucidar a ação dos ácidos graxos no desenvolvimento do tumor de
295 mama (Larsson *et al.*, 2004).

296

297 **CONCLUSÃO**

298

299 A quantificação relativa dos níveis de ácido alfa-linolênico (C 18:3) e ácido cis-
300 linoleico (C 18:2) não apresentaram diferença quando comparado entre cadela hígdas e
301 com tumores mamários. Houve uma relação maior de ômega-6/ômega-3 no grupo com
302 tumor de mama. Não houve uma associação da obesidade e dos níveis séricos de
303 colesterol total e triglicérides com o risco de desenvolvimento de tumores mamários em
304 cadelas.

305

306 **REFERÊNCIAS**

307

308 APTEKMANN, K.P.; MENDES-JUNIOR, A.F.; SUHETT, W.G.; GUBERMAN, U.C.
309 Manejo nutricional de cães e gatos domiciliados no estado do Espírito Santo – Brasil.
310 *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.65, n.2, p.455-459, 2013.

311

312 BARTSCH, H.; NAIR, J.; OWEN, R.W. Dietary polyunsaturated fatty acids and
313 cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk
314 modifiers. *Carcinogenesis*, v.20, n.12, p.2209-2218, 1999

315

- 316 BERQUIN, I.M.; EDWARDS, I.J.; CHEN, Y.Q. Multi-targeted therapy of cancer by
317 omega-3 fatty acids. *Cancer Letters*, v.269, p.363-377, 2008.
318
- 319 DE NARDI, A.B.; RODASKI, S.; SOUSA, R.S.; COSTA, T.A. et al. Prevalência de
320 neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da
321 universidade federal do Paraná. *Archives of Veterinary Science*, v.7, n.2, p.15-26, 2002
322
- 323 ESCRICH E.; SOLANAS, M.; SOLER, M.; DE VILLA, M.C.R. et al. Dietary
324 polyunsaturated n-6 lipids effects on the growth and fatty acid composition of rat
325 mammary tumors. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.12, p.536-549, 2001.
326
- 327 LARSSON, S.C.; KUMLIN, M.; ILGEMAN-SUNDBERG, M.; WOLK, A. Dietary
328 long-chain n-3 acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms.
329 *American Journal Clinical Nutrition*, v.79, p.935-945, 2004.
330
- 331 LENOX, C.E.; BAUER, J.E. Potential adverse effects of omega-3 fatty acids in
332 dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.27, p.217-226, 2013.
333
- 334 MAILLARD, V.; BOUGNOUX, P.; FERRARI, P.; JOURDAN, M. L. et al. N-3 and N-
335 6 fatty acids in breast adipose tissue and relative risk of breast cancer in a case-control
336 study in Tours, France. *International Journal of Cancer*, v.98, n.1, p.78-83, 2002.
337
- 338 MARTIN, C.A.; ALMEIDA, V.V.; RUIZ, M.R.; VISENTAINER, J.E.L. et al. Ácidos
339 graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos.
340 *Revista de Nutrição*, v.19, n.6, p.761-770, 2006.
341
- 342 MCENTEE, M.F.; WHELAN, J. Dietary polyunsaturated fatty acids and colorectal
343 neoplasia. *Biomedicine Pharmacotherapy*, v.56, p.380-387, 2002.
344
- 345 MENDES, M.C.S. *Perfil de ácidos graxos da dieta e do tecido adiposo mamário e o*
346 *risco de desenvolvimento de câncer de mama: um estudo caso-controle*. 2008. 174f.
347 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
348

- 349 MILLER, H.I.; GOLD, M., SPITZER, J.J. Removal and mobilization of individual free
350 fatty acids in dogs. *American Journal of Physiology--Legacy Content*, v.202, n.2, p.370
351 374, 1962.
352
- 353 MOULTON, J.E. Tumors of the mammary gland. In: _____. Tumors in domestic animals.
354 3.ed. Los Angeles: University of California Press, 1990. p.518-552.
355
- 356 OLIVO-MARSTON, S.E.; ZHU, Y.; LEE, R.Y.; CABANES, A. et al. Gene signaling
357 pathways mediating the opposite effects of prepubertal low and high fat n-3
358 polyunsaturated fatty acid diets on mammary cancer risk. *Cancer Prevention Research*,
359 v.1, n.7, p.532-545, 2008.
360
- 361 PÉREZ-ALENZA, M.P.; PEÑA, L.; DEL CASTILLO, N.; NIETO, A. I. Factors
362 influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *Journal of Small*
363 *Animal*, v.41. p.287-291, 2000.
364
- 365 PÉREZ-ALENZA, M.P.; RUTTEMAN, G.R.; PEÑA, L.; BEYNEN, A.C. et al.
366 Relation between Habitual Diet and Canine Mammary Tumors in a Case-Control Study.
367 *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.12, p.132–139, 1998.
368
- 369 POTISCHMAN, N.; MCCULLOCH, C.E.; BYERS, T.; HOUGHTON, L. et al.
370 Associations between breast cancer, plasma triglycerides, and cholesterol. *Nutrition and*
371 *Cancer*, v.15, p.205-215, 1991.
372
- 373 RAY, G.; HUSAIN, S.A. Role of lipids, lipoproteins and vitamins in women with breast
374 cancer. *Clinical biochemistry*, v.34, n.1, p.71-76, 2001
375
- 376 RICHARDS, H.G.; MCNEIL, P.E.; THOMPSON, H.; REID, S.W.J. An
377 epidemiological analysis of a canine-biopsies database compiled by a diagnostic
378 histopathology service. *Preventive Veterinary Medicine*, v.51, p.125-136, 2001.
379

- 380 RODASKI, S.; PIEKARZ, C.H. Epidemiologia e etiologia do câncer. In: DALECK,
381 C.R.; DE NARDI, A.B.; RODASKI, S. Oncologia em cães e gatos. São Paulo: Roca,
382 2008. p.1-22.
383
- 384 ROSSINI, A.; ZANOBBIO, L.; SFONDRINI, L.; CAVALLERI, A.; SECRETO, G. et
385 al. Influence of fatty acid-free diet on mammary tumor development and growth rate in
386 HER-2/neu transgenic mice. *Journal of Cellular Physiology*, v.228, p.242–249, 2013.
387
- 388 SIMOENS, C.; RICHELLE, M.; RÖSSLE, C.; DERLUYN, M. et al, Manipulation of
389 tissue fatty acid profile by intravenous lipids in dogs. *Clinical nutrition*, v.14, n.3,
390 p.177-185, 1995.
391
- 392 SIMOPOULOS, A.P. The importance of the ômega-6/ômega-3 fatty acid ratio in
393 cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*,
394 v.233, p.674-688, 2008.
395
- 396 SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty
397 acids. *Biomedicine & pharmacotherapy*, v.56, n.8, p.365-379, 2002.
398
- 399 SLOTH, C. Practical management of obesity in dogs and cats. *Journal of Small Animal*
400 *Practice*, v.33, n.4, p.178-182, 1992.
401
- 402 SONNENSCHNEIN, E.G.; GLICKMAN, L.T.; GOLDSCHMIDT, M.H.; MCKEE, L.J.
403 Body conformation, diet and risk of breast cancer in pet dogs: a case control study.
404 *American Journal of Epidemiology*, v.133, n.7, p.694-703, 1991.
405
- 406 SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. *Veterinary Clinics of North America:*
407 *Small Animal Practice*, v. 33, n.3, p.573-596, 2003.
408
- 409 VAUGHN, D. M.; REINHART, G. A.; SWAIM, S. F.; LAUTEN, S. D. et al.
410 Evaluation of effects of dietary n-6 to n-3 fatty acid ratios on leukotriene b synthesis in
411 dog skin and neutrophils. *Veterinary Dermatology*, v.5, p.163–173, 1994
412

413 ZAMBIAZI, R.C.; PRZYBYLSKI, R; ZAMBIAZI, M.W.; MENDONÇA, C.B. et
414 al. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v.25, n.1, 2007.

415

416 ZUCCARI, D.; BERTON, C.R.; TERZIAN, A.C.B.; RUIZ, C.M. Fatores prognósticos
417 e preditivos nas neoplasias mamárias-importância dos marcadores imuno histoquímicos
418 nas espécies humana e canina-estudo comparativo. *Arquivos de Ciências da Saúde*, v.5,
419 n.4, p.189-198, 2008.

ANEXOS

Anexos

ANEXO 1 - QUESTIONÁRIO DO HISTÓRICO REPRODUTIVO E NUTRICIONAL

Data ___ / ___ / ___

RG _____

ID Experimento _____

Animal: _____

Idade: _____

Raça: _____

Peso: _____ Motivo da consulta: _____

Categoria Animal:

- () Toy (≤ 5 Kg) () Miniatura (5,1 – 11,3Kg) () Médio (11,4- 23Kg)
 () Grande (23,1-39,9Kg) () Gigante (≥ 40 Kg)

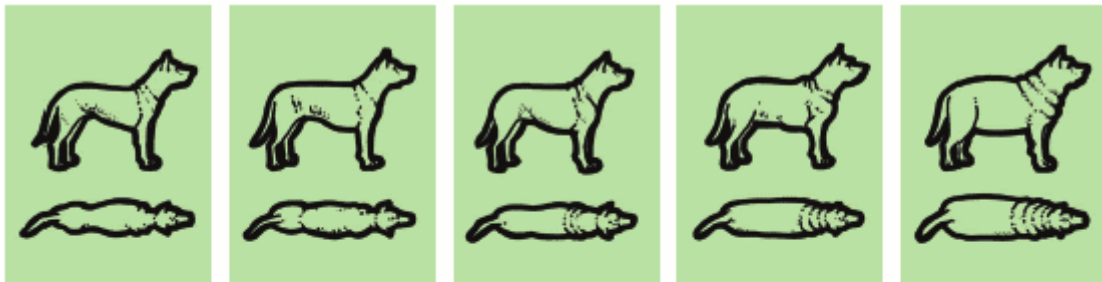
Escore Corporal:

Ilustração Gabriel Gianordoli

EXTREMAMENTE MAGRO

Costelas e ossos são proeminentes; não existe dobrinha abdominal e a perda de massa muscular é aparente

()

MAGRO

Costelas, extremidades ósseas e área lombar são bem visíveis; a cintura é bastante fina e a curva abdominal aparente

()

IDEAL

Costelas têm uma camada fina de gordura; os cães apresentam cintura e curva abdominal marcada

()

ACIMA DO PESO

Camada de gordura densa e dificuldade para apalpar as costelas. Dobras de gordura nas costas e na base do rabo. Cintura marcada desaparece

()

OBESO MÓRBIDO

São cães com grande depósito de gordura no tórax e na base do rabo; a espinha dorsal fica bastante curvada por causa do peso do abdômen

()

Fonte: Pet Hills Nutricional e Hospital Senna Madureira.

Avaliação Tumor Mamário

() Nódulo Único () Múltiplo -> Quantos?

Localização _____

Tamanho: _____

Consistência: () Firme () Macia () Elástica

Invasão: () Sem aderência () Aderido na pele () Aderido na musculatura

Mamilo: () Sem alteração () Ulceração () Retração () Eczema
 Secreção: () Sim () Não Ulceração: () Sim () Não
 Envolvimento de linfonodos: () Axilar () Inguinal () Sem alterações

Desenvolvimento da lesão: Início _____
 Taxa de crescimento: () Lento () Médio () Rápido
 Lesão tumoral prévia? () Não () Sim ->
 Localização: _____
 Realizou cirurgia anteriormente? () Não () Sim

Obs: _____

Histórico Reprodutivo

Animal Castrado () NÃO () SIM
 -> Idade que foi castrado _____
 Motivo _____
 Idade do primeiro cio _____ Ciclo estral: () Regular () Irregular () Não apresenta
 Nº de crias: () Nenhum () Um () Duas ou Três () Mais
 Idade da primeira gestação: _____
 Pseudogestação: () Não () Sim-> Qual frequência? _____ Aborto: () Não () Sim
 Alterações uterinas (secreções): () Não () Sim -> Quando: _____
 Diagnóstico: _____
 Já cruzou e não ficou prenha? () Não () Sim
 Uso de hormônios: () Contraceptivos () Abortivos () Não
 Se sim, qual o tipo, data da utilização e quantas vezes utilizou?

Histórico Nutricional

Qual tipo de alimento: () Ração () Comida Caseira () Ração + Comida Caseira (preencher ração e comida caseira)
 () Ração -> () Pacote fechado () A granel
 Qual tipo: () Filhotes () Adulto () Ambas
 Qual marca e nome da Ração?

 Qual frequência ? () 1 vez/dia () 2 vezes/dia () 3 ou mais vezes/dia () a vontade
 Qual quantidade por porção? _____ Quanto tempo está com essa ração? _____

Troca de ração frequentemente ? Quais utiliza com maior frequência?

Oferece petiscos? Quais? _____ Qual frequência?

Oferece ração pastosa ? () Não () Sim -> Qual frequência e quantidade?

() Comida Caseira Qual tipo de alimento é oferecido ?

Oferece carne? () Bovina () Suína () Frango () Todas -> Qual mais frequente?

Uso de condimentos para o preparo ? (sal, óleo, temperos, etc)

Qual tipo de gordura utilizada () gordura animal, qual? _____ () Manteiga () Óleo, qual ? _____

Oferece petiscos? Quais? _____ Qual frequência?

Obs _____

Quando filhote:

Qual escore corporal o animal tinha até o 1º ano de vida?

() Muito magro () Magro () Normal () Sobrepeso () Obeso

Qual era o tipo de alimento oferecido:

() Ração () Comida Caseira () Ração + Comida Caseira

() Ração ->

() Pacote fechado () A granel Qual tipo: () Filhotes () Adulto () Ambas

Qual era marca e nome da Ração? _____

() Comida Caseira Qual tipo de alimento era oferecido ?

Oferecia carne? () Bovina () Suína () Frango () Todas -> Qual mais frequente?