

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM CADELAS APÓS EXERESE DE
NEOPLASIA MAMÁRIA MALIGNA SUBMETIDAS A
QUIMIOTERAPIA E SUPLEMENTADAS OU NÃO COM
IMUNOESTIMULANTE**

Vilma Ferreira de Oliveira
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Naida Cristina Borges

GOIÂNIA
2014

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	VILMA FERREIRA DE OLIVEIRA		
E-mail:	shire@terra.com.br		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor	UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS		
Agência de fomento:	Não	Sigla:	UFG
País:	Brasil	UF:GO	CNPJ: 01.567.601/0001-43
Título:	RESPOSTA INFLAMATORIA EM CADELAS APÓS EXERESE DE NEOPLASIA MAMÁRIA MALIGNA SUBMETIDAS A QUIMIOTERAPIA E SUPLEMENTADAS OU NÃO COM IMUNOESTIMULANTE		
Palavras-chave:	Cães, Neoplasia mamária, Câncer, Cadelas, Quimioterapia		
Título em outra língua:	Inflammatory response after malignant mammary neoplasia excision in female dogs submitted to chemotherapy and supplemented or not with immunostimulatory		
Palavras-chave em outra língua:	Dogs, Mammary neoplasia, Cancer, Female dogs, Chemotherapy		
Área de concentração:	Patologia Clínica e Cirurgia Animal (PCC)		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	12/08/2014		
Programa de Pós-Graduação:	Ciência Animal		
Orientador (a):	Nalda Cristina Borges		
E-mail:	naidaborges@yahoo.com.br		
Co-orientador(a):*	Maria Clorinda Soares Fioravanti		
E-mail:	mariaclorinda@gmail.com		

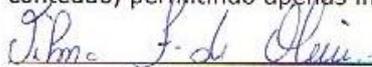
*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.



Data: 15 / 09 / 2014

Assinatura do (a) autor (a)

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

VILMA FERREIRA DE OLIVEIRA

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM CADELAS APÓS EXERESE DE
NEOPLASIA MAMÁRIA MALIGNA SUBMETIDAS A
QUIMIOTERAPIA E SUPLEMENTADAS OU NÃO COM
IMUNOESTIMULANTE**

Tese apresentada para a obtenção
do grau de Doutor em Ciência
Animal junto à Escola de
Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:
Patologia, Clínica e Cirurgia Animal

Orientadora:

Prof^a.Dr^a.Naida Cristina Borges

Comitê de Orientação:

Prof^a.Dr^a.Maria Clorinda Soares Fioravanti

Pesq. Dr. José Sidney Flemming

GOIÂNIA
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG**

O48p Oliveira, Vilma Ferreira de.
Resposta inflamatória em cadelas após exereses de neoplasia mamária maligna, submetidas a quimioterapia e suplementadas ou não com imunostimulante [manuscrito] / Vilma Ferreira de Oliveira. - 2014.

92 f. : il., tabs.

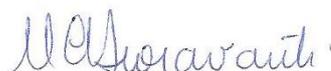
Orientadora: Prof^ª Dr^ª Naida Cristina Borges.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2014.
Bibliografia.

1. Cães – Neoplasia mamária 2. Câncer – Cadelas 3. Cães – Quimioterapia. I. Título.

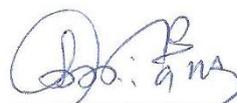
CDU: 636.7:618.19-006

VILMA FERREIRA DE OLIVEIRA

Tese defendida e aprovada em 12/08/2014 pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti – EVZ/UFG
(ORIENTADOR (A))



Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana - UNESP/FCAV



Prof. Dr. José Jurandir Fagliari - UNESP/FCAV



Profa. Dra. Kellen de Sousa Oliveira - memoria – EVZ/UFG



Dr. Apóstolo Ferreira Martins - HV/UFG

À minha amada mãe, por ter me criado com princípios de honra, honestidade, integridade, respeito ao próximo e a vida.

Aos meus Filhos Gilmar Luiz e Vitória, que me presenteou com três netas maravilhosas, Isadora, Elis e Valentina, amo vocês por perpetuarem a minha existência aqui nessa terra.

Aos proprietários das 16 lindas e dóceis cadelas que possibilitaram a realização desse meu sonho.

Ao Dr. Antonio Roberto Fiani Bacila Diretor Presidente da Organnact Saúde Animal pela confiança na realização desse trabalho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, senhor Supremo de todas as coisas.

A Organnact Saúde Animal, pela confiança em financiar esse trabalho.

A você Dirson Júnior, o melhor companheiro que eu poderia desejar aguentando minhas crises de “Doutorites”, sem perder a calma.

A minha Orientadora Professora Doutora Naida Cristina Borges, meu carinho, respeito.

A minha querida Co-orientadora Professora Doutora Maria Clorinda Soares Fioravanti, meu afeto, apreço e admiração por ser assim, única.

Ao Professor Doutor Emmanuel Arnhold pela imensa ajuda nas análises estatísticas, “sem o qual as diferenças não seriam significativas”.

Aos amigos técnicos em Laboratório, Helton Freires Oliveira e Isis Fátima de Amorim Louredo pelo apoio insuperável nas análises laboratoriais de mais esse projeto de vida.

À Ingrid Bueno Atayde agradeço pelo apoio e tempo disponibilizado em colaboração ao desenvolvimento deste trabalho. Agradeço de coração querida.

À Adriana Rodrigues da Silva por ser a melhor amiga, companheira de trabalho concedida por Deus.

Para Joyce Rodrigues Lobo um agradecimento especial porque você em nenhum momento demonstrou má vontade, indisposição até nos domingos e feriados, minha gratidão eterna. Você não tem preço.

Aos colegas de trabalho do Hospital Veterinário da EVZ/UFG pelo apoio sistemático na evolução desse trabalho.

À Universidade Federal de Goiás, em especial à Pós-Graduação da Escola de Veterinária e Zootecnia por ter me concedido a oportunidade para realização desse curso.

A todos que aqui não foram mencionados, porém não esquecidos, minha eterna gratidão.

Agradeço!

"Não quero ter a terrível limitação de quem vive
apenas do que é passível de fazer sentido.
Eu não: quero uma verdade inventada."

Clarice Lispector

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.1 Introdução.....	1
1.2 Revisão bibliográfica.....	2
Referências.....	6
CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DE ELEMENTOS DE HEMATOLOGIA E BIOQUÍMICA CLÍNICA DE CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA MALIGNA SUPLEMENTADAS COM IMUNOESTIMULANTE.....	8
1 Introdução.....	10
2 Material e métodos.....	12
2.1 Delineamento experimental.....	12
2.2 Protocolo quimioterápico.....	14
2.3 Avaliações laboratoriais.....	15
2.4 Análise estatística.....	16
3 Resultados.....	16
3.1 Eritrograma.....	18
3.2 Plaquetograma.....	18
3.3 Leucograma.....	18
3.4 Bioquímica sérica.....	23
4 Discussão.....	27
5 Conclusão.....	31
Referências.....	32
CAPÍTULO 3 - PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA MALIGNA E SUPLEMENTADAS COM IMUNOESTIMULANTE.....	36
1 Introdução.....	38
2 Material e métodos.....	41
2.1 Delineamento experimental.....	41
2.2 Protocolo quimioterápico.....	42
2.3 Avaliações laboratoriais.....	43
2.4 Análise estatística.....	43

3 Resultados.....	44
4 Discussão.....	50
5 Conclusão.....	53
Referências.....	54
CAPÍTULO 4 - METABOLISMO DO FERRO EM CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA MALIGNA SUBMETIDAS À QUIMIOTERAPIA E SUPLEMENTADAS COM IMUNOESTIMULANTE.....	58
1 Introdução.....	60
2 Materiais e métodos.....	64
2.1 Delineamento experimental.....	64
2.2 Protocolo quimioterápico.....	65
2.3 Avaliações laboratoriais.....	66
2.4 Análise estatística.....	68
3 Resultados.....	72
4 Discussão.....	74
5 Conclusão.....	75
Referências.....	79
CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1	Média e desvio padrão (DP) do peso corporal inicial e final (Kg), das cadelas com neoplasia mamária maligna submetidas à quimioterapia* e suplementadas e não suplementadas com Promun dog® **. Goiânia, Goiás, 2014.....	17
TABELA 2	Média e desvio padrão (DP), mediana, intervalo de confiança (IC) e coeficiente de variação (CV), obtidos para hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$), hemoglobina (g/dL) e hematócrito (%) em cadelas com neoplasia mamária maligna, tratadas com quimioterapia e suplementadas (S) e não suplementadas (NS) com Promun dog® **. Goiânia, Goiás, 2014.....	19
TABELA 3	Média e desvio padrão (DP), mediana, intervalo de confiança (IC) e coeficiente de variação (CV), obtidos para plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) em cadelas com neoplasia mamária maligna, tratadas com quimioterapia e suplementadas (S) e não suplementadas (NS) com Promun dog® **. Goiânia, Goiás, 2014.....	20
TABELA 4	Média e desvio padrão (DP), mediana, intervalo de confiança (IC) e coeficiente de variação (CV), referentes aos leucócitos totais (LT - $\times 10^3/\mu\text{L}$) e neutrófilos segmentados (Seg - $\times 10^3/\mu\text{L}$) em cadelas com neoplasia mamária maligna tratadas com quimioterapia* e suplementadas (S) e não suplementadas (NS) com Promun dog® **. Goiânia, Goiás, 2014.....	21
TABELA 5	Média e desvio padrão (DP), mediana, intervalo de confiança (IC) e coeficiente de variação (CV), referentes aos linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) em cadelas com neoplasia mamária maligna tratadas com quimioterapia* e suplementadas (S) e não suplementadas (NS) com Promun dog® ** Goiânia, Goiás, 2014.....	22
TABELA 6	Média e desvio padrão (DP), mediana, intervalo de confiança (IC) e coeficiente de variação (CV) obtidos para uréia (mg/dL), creatinina (mg/dL) e albumina (g/dL) em cadelas com neoplasia mamária maligna tratadas com	

	quimioterapia e suplementadas (S) e não suplementadas (NS) com Promun dog® **. Goiânia, Goiás, 2014.....	24
TABELA 7	Média e desvio padrão (DP), mediana, intervalo de confiança (IC) e coeficiente de variação (CV) obtidos para ALT (U/L) e ALP (U/L) em cadelas com neoplasia mamária maligna tratadas com quimioterapia e suplementadas (S) e não suplementadas (NS) com Promun dog® **. Goiânia, Goiás, 2014.....	25
TABELA 8	Média e desvio padrão (DP), mediana, intervalo de confiança (IC) e coeficiente de variação (CV) obtidos para GGT (U/L), bilirrubina direta (BD - mg/dL) e bilirrubina total (BT - mg/dL) em cadelas com neoplasia mamária maligna tratadas com quimioterapia e suplementadas (S) e não suplementadas (NS) com Promun dog® **. Goiânia, Goiás, 2014.....	26
CAPÍTULO 3		
TABELA 1	Média e desvio padrão (DP) do peso corporal inicial e final (Kg), das cadelas com neoplasia mamária maligna submetidas à quimioterapia* e suplementadas e não suplementadas com Promun dog® **. Goiânia, Goiás, 2014.....	45
TABELA 2	Média e desvio padrão (DP), mediana, intervalo de confiança (IC) e coeficiente de variação (CV) obtidos para albumina (mg/dL), em cadelas com neoplasia mamária maligna tratadas com quimioterapia e suplementadas (S) e não suplementadas (NS) com Promun dog® **. Goiânia, Goiás, 2014.....	46
TABELA 3	Média e desvio padrão (DP), mediana, intervalo de confiança (IC) e coeficiente de variação (CV) obtidos para haptoglobina (Hp - mg/dL) e ceruloplasmina (CP - g/dL) em cadelas com neoplasia mamária maligna tratadas com quimioterapia e suplementadas (S) e não suplementadas (NS) com Promun dog® **. Goiânia, Goiás, 2014.....	47
TABELA 4	Média e desvio padrão (DP), mediana, intervalo de confiança (IC) e coeficiente de variação (CV) obtidos para	

alfa-1 antitripsina (AAT - mg/dL) e alfa-1 glicoproteína ácida (GPA - mg/dL) em cadelas com neoplasia mamária maligna tratadas com quimioterapia e suplementadas (S) e não suplementadas (NS) com Promun dog® **. Goiânia, Goiás, 2014.....	49
---	----

CAPÍTULO 4

TABELA 1	Média e desvio padrão (DP) do peso corporal inicial e final (Kg), das cadelas com neoplasia mamária maligna submetidas à quimioterapia* e suplementadas e não suplementadas com Promun dog® **. Goiânia, Goiás, 2014.....	68
TABELA 2	Média e desvio padrão (DP), mediana, intervalo de confiança (IC) e coeficiente de variação (CV) das concentrações séricas de ferro (Fe - µg/dL) e índice de saturação da transferrina (IST - %) em cadelas com neoplasia mamária maligna tratadas com quimioterapia* e suplementadas (S) e não suplementadas (NS) com Promun dog® **. Goiânia, Goiás,2014.....	70
TABELA 3	Média e desvio padrão (DP), mediana, intervalo de confiança (IC) e coeficiente de variação (CV) das concentrações séricas de transferrina (Tf - mg/dL) e ferritina (FT - ng/mL) em cadelas com neoplasia mamária maligna tratadas com quimioterapia e suplementadas (S) e não suplementadas (NS) com Promun dog® **. Goiânia, Goiás, 2014.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

AAT	Alfa-1 antitripsina
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CP	Ceruloplasmina
B-glucana	Beta glucana
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
Fe	Ferro
Fr	Ferritina
GGT	Gama glutamiltransferase
GPA	Alfa-1 glicoproteína ácida
Hb	Hemoglobina
Hp	Haptoglobina
Ht	Hematócrito
IFN γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
IST	Índice de saturação da transferrina
IV	Intravenoso
LIC	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
Tf	Transferrina
TH0	Linfócito TH0
TH1	Linfócito TH1
TH2	Linfócito TH2
T CD4+	Linfócito T CD4+
MCP -1	Proteína quimiotática de monócito -1
MOS	Mananoligossacarídeos
MRBs	Modificadores da resposta biológica
NK	Linfócito natural killer

NS	Grupo não suplementado
OSM	Oncostatina M
PCR	Proteína C reativa
PFA	Proteína de fase aguda
RFA	Reação de fase aguda
RNA	Ácidoribonucleico
S	Grupo suplementado
SAA	Amilóide A sérica
SAM	S – adenosil metionina
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Introdução

O câncer, originado do próprio indivíduo, ou causada por ele, advindo de origens externas ou alterações genéticas pré determinadas, afeta indiscriminadamente homem e animal, sendo capaz de multiplicar, invadir e consumir, tendo como único objetivo, sobreviver.

Por se tratar de uma perpetuação continua sutil e invasiva, sendo assim tardiamente notado, o diagnóstico de câncer em animais de estimação revela a fragilidade dos profissionais perante essa doença desafiadora. Tal situação torna-se paradoxal entre a realidade do câncer e o valor sentimental do animal. A palavra de ordem refere-se à qualidade de vida independente do tempo de sobrevida.

Profissionais qualificados oferecem opções adequadas de tratamento aos diferentes tipos de neoplasias, condição essencial aos proprietários que prezam pelos seus animais de estimação. Nesse contexto o médico veterinário não poderá atuar de modo generalista, o profissional devidamente capacitado deve estar atento às peculiaridades de cada caso.

A oncologia veterinária deixou de ser uma área isolada dentro do universo que compõe a medicina veterinária. O paciente com câncer requer avaliação clínica, laboratorial e conduta cirúrgica criteriosas. Os métodos auxiliares de diagnóstico por imagem, somados ao exame histopatológico compõem o estadiamento clínico e finalmente o protocolo de tratamento.

Diante destas circunstâncias evidencia-se a importância da elucidação de parâmetros associados à condição de câncer, que possam auxiliar no diagnóstico e prognóstico desta doença, adicionando informações para os profissionais interessados em dedicar a esta especialidade médica.

1.2 Revisão bibliográfica

Em 500 A.C., na Grécia, Hipócrates foi o primeiro a descrever a palavra “carcinoma” e a definir, naqueles tempos, o câncer como sendo uma doença de mau prognóstico¹. Diante de tal afirmação Baines e Shenkin² relataram a existência de uma relação dinâmica entre doença cancerígena, nutrição e imunidade. A associação destes fatores culminou com o acelerado consumo e perda das reservas nutricionais do organismo, resultando em desnutrição e supressão imunológica.

Davenport³ constatou que poucas doenças como o câncer mobilizam tanta atenção na comunidade científica. Assim, uma das preocupações envolvidas com o paciente refere-se a sua condição física e nutricional, sendo comum, acoplado com a terapia convencional, a utilização de uma terapia complementar. O nutracêutico é um alimento ou parte de um alimento que proporciona benefícios médicos e de saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento da doença⁴. A frequente utilização de nutracêuticos em pacientes humanos com câncer sugere que seu emprego em animais de estimação com câncer provavelmente será comum. Os proprietários são também capazes de compreender a importância da nutrição nos animais com câncer e como a boa alimentação e a utilização de alimentos funcionais ou nutracêuticos podem melhorar a qualidade e duração de vida de animais de estimação com câncer³.

Thompson⁵ observou que no animal portador de neoplasia maligna três fatores estão presentes favorecendo o estabelecimento da desnutrição: a) o aumento do catabolismo com redirecionamento das reservas nutricionais para áreas mais importantes, como o sistema imunológico, a reparação tecidual e para atender ao ritmo metabólico mais acelerado (gliconeogênese); b) o aumento do anabolismo representado pela síntese de elementos do sistema imunológico e reparação tecidual e os gastos energéticos extras que surgem em adição ao metabolismo basal; c) a menor digestão e assimilação associada a perdas adicionais, representadas por diarreias, hemorragias e transudações, que carregam nutrientes do meio interno para o meio externo.

Baines e Shenkin² observaram que deficiências nutricionais acarretam diminuição de anticorpos humorais e da superfície de mucosas, assim como reduzem a imunidade celular, a capacidade bactericida de fagócitos, a produção de complemento, o número total de linfócitos, o equilíbrio dos subtipos de linfócitos T e os mecanismos inespecíficos de defesa. Não obstante, devem-se incluir as alterações relacionadas às complicações da pele e mucosas, a microbiota intestinal, a importância do aparelho digestivo frente ao desenvolvimento do sistema imunológico, as substâncias secretoras como linfocinas, suco gástrico e muco, a febre, as alterações endócrinas e o sequestro de ferro sérico e tecidual.

Thompson⁵ acrescentou que, pacientes crônicos, bem como os portadores de neoplasias, apresentam alterações nutricionais decorrentes da progressão da doença, além de sofrerem várias perdas durante o tratamento quimioterápico, em função do uso de fármacos imunossupressores. Os pacientes em estado crítico e submetidos a tratamentos prolongados podem apresentar diversas situações clínicas tais como vômito, complicações renais, hepáticas, sepse e o próprio jejum prolongado, induzindo alterações estruturais e funcionais dos diversos sistemas. O intestino, pela importância da presença de alguns nutrientes intraluminais que se contrapõem a estas alterações, é um órgão bastante afetado pelo jejum.

O intestino contém 60% a 70% de todo o tecido linfóide do organismo e suas funções de barreira possuem mecanismos complexos. Nesta circunstância, a ingestão de alimentos mais palatáveis estimula a secreção de IgA pelas glândulas salivares e trato biliar, que se aderem às bactérias na luz intestinal, prevenindo dessa forma o ataque bacteriano às células epiteliais intestinais⁶.

Para Hasler⁷ os alimentos que promovem benefícios à saúde, além da função nutritiva, ou que apresentam papel na prevenção ao risco de doenças são denominados alimentos funcionais. Além dos termos, alimentos funcionais e nutracêuticos, várias outras denominações têm sido utilizadas para designar alimentos que oferecem proteção especial à saúde, tais como alimentos planejados, alimentos saudáveis, alimentos protetores, alimentos farmacêuticos, entre outros.

Segundo Reig e Anesto⁸ os probióticos são microrganismos vivos que podem ser agregados como suplementos adicionados aos alimentos, afetando de forma benéfica o desenvolvimento da microbiota no intestino. São também conhecidos como bioterapêuticos, bioprotetores e bioprofiláticos e são utilizados para prevenir as infecções entéricas e gastrointestinais. De acordo com Saad⁹ a definição internacional atualmente aceita é de que os probióticos são microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades recomendadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro.

Os prebióticos são oligossacarídeos não digeríveis, fermentáveis cuja função é mudar a atividade e a composição da microbiota intestinal com a perspectiva de promover a saúde do hospedeiro. As fibras dietéticas e os oligossacarídeos não digeríveis são os principais substratos de crescimento dos microrganismos dos intestinos. Os prebióticos estimulam o crescimento dos grupos endógenos de população microbiana, tais como as bifidobactérias os lactobacilos, que são considerados benéficos para a saúde humana¹⁰.

Dentre os efeitos atribuídos aos prebióticos estão a modulação de funções fisiológicas chaves, como a absorção de cálcio, o metabolismo lipídico, a modulação da composição da microbiota intestinal, a qual exerce o papel primordial na fisiologia intestinal e a redução do risco de câncer de cólon. Os oligossacarídeos de interesse na nutrição de cães e gatos são os mananoligossacarídeos (MOS), derivados das paredes de leveduras, ou seja, o extrato seco de fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Os MOS apresentam a capacidade de modular o sistema imunológico e a microflora intestinal, ligam-se a ampla variedade de micotoxinas e preservam a integridade da superfície de absorção intestinal. As bactérias patogênicas colonizam o trato gastrointestinal prendendo-se a superfície das células epiteliais e, para evitar a infecção, é necessário inibir esse mecanismo de junção¹¹.

Para Reig e Anesto⁸ no *S. cerevisiae*, as β -glucanas são polissacarídeos constituintes estruturais da parede celular de leveduras, fungos e alguns cereais, que se diferenciam pelo tipo de ligação entre as unidades de glicose da cadeia principal e pelas ramificações que se conectam a essa cadeia. Nas últimas décadas estes polímeros vêm recebendo especial atenção por sua bioatividade, principalmente no que se refere à imunomodulação. Bohn e

Bemiller¹² acrescentam que alguns polissacarídeos, como as β -glucanas obtidas de fungos, bactérias e leveduras pertencem a classe de substâncias conhecidas como modificadores da resposta biológica (MRBs), pois alteram a resposta no hospedeiro pelo estímulo do sistema imunológico.

Zeisel¹³ conceituou nutracêuticos ou alimentos funcionais como suplementos dietéticos que proporcionam uma forma concentrada de um agente bioativo presumido a partir de um alimento, com o objetivo de melhorar a saúde e administrado em doses que ultrapassam aquelas que poderiam ser obtidas a partir de alimentos normais

Os alimentos funcionais podem prevenir ou contribuir para o tratamento de doenças cardiovasculares, câncer, osteoporose e desordens imunológicas. Os ingredientes benéficos dos alimentos funcionais têm sido denominados de componentes funcionais e de componentes bioativos. Tais ingredientes exercem ações antioxidantes, ativando enzimas hepáticas contra intoxicações, bloqueando toxinas bacterianas ou virais, inibindo a absorção de colesterol, diminuindo a agregação de plaquetas ou inibindo bactérias gastrointestinais indesejáveis¹⁴.

A adição de substâncias com capacidade de otimizar a absorção intestinal, melhorando a captação de alimentos por parte do organismo e, ainda, estimulando de maneira indireta o sistema imunológico; representam um adjuvante no protocolo de quimioterapia antineoplásica e constitui uma possibilidade de apoio para os tratamentos dos pacientes oncológicos. O protocolo de quimioterapia mais adequado a cada neoplasia tem sido estudado e desenvolvido para suplantiar o desenvolvimento da doença de forma específica para animais^{15, 16}. Entretanto, tais protocolos, segundo Brentani et al.¹⁷, ao mesmo tempo em que reduzem ou inibem o crescimento tumoral, estabelecem uma situação de caquexia secundária a sua ação, nos sistemas celulares de rápida renovação, dentre eles o intestino

Com este estudo clínico objetivou-se avaliar a capacidade de um suplemento alimentar (Promun dog[®]), contendo *Saccharomyces cerevisiae*, mananoligossacarídeos e nutracêuticos, como imunoestimulante em cadelas portadoras de neoplasias mamárias submetidas à quimioterapia.

Para atender a este objetivo foram utilizadas diversas ferramentas de diagnóstico, tais como exames hematológicos e bioquímicos, determinação

das proteínas de fase aguda negativas (albumina) e positivas (haptoglobina, ceruloplasmina, alfa-1 glicoproteína ácida, alfa-1 antitripsina e análise dos parâmetros de metabolismo do ferro.

Referências

1. Zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Science*. 1991; 254:1167-78.
2. Baines M, Shenkin A. Lack of effectiveness of short-term intravenous micronutrient nutrition in restoring plasma antioxidant status after surgery *Clin Nutr*. 2002; 21(2):145-50.
3. Davenport DJ. The use of nutraceuticals in cancer therapy. *NAVC*. 2006; 20:7-11.
4. Moraes FP, Colla LM. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *REF*. 2006; 3(2):109-122.
5. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995; March; 267:1.456-62.
6. Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod*. 1997; 60:52-60.
7. Hasler CM. Functional foods: their role in disease in: developing new Food products for a changing prevention and health promotion. *Food Technol*. 1998; 52:57-62.
8. Reig ALC, Anesto JB. Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. *Rev Cub Aliment Nutr.* 2002; 16(1):63-8.
9. Saad SMI. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Rev Bras Cienc Farm*. 2006; 42(1):1-16.
10. Scheid MMA, Moreno YMF, Maróstica-Junior MR, Pastore GM. Effect of prebiotics on the health of the elderly. *Food Res Int*. 2013; 53:426-32.

11. Roberfroid M. Functional food concept and its application to prebiotics. *Digest Liver Dis.* 2002; 34(Suppl.2):105-10.
12. Bohn AJ, Bemiller JN. (1-3) β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr Polym.* 1995; 28:3-14.
13. Zeisel SH. Regulation of Nutraceuticals. *Science.* 1999; 285(5435):1853-5.
14. Pennington JA. Food Composition databases for Bioactive Food Components. *J Food Compos Anal.* 2002; 15:419-34.
15. Lanore D, Delprat C. 2004. *Quimioterapia anticancerígena.* 1ªEd. Editora Roca, São Paulo. 191p.
16. Withrow SJ, Macwen EG. 2007. *Small animal clinical oncology.* 4ªEd. St. Louis:Saunders.
17. Brentani MM, Coelho FRG, Iyeyasu H, Kowalski LP. 1998. *Bases da oncologia.* São Paulo:LEMAR.

CAPÍTULO 2 – HEMATOLOGIA E BIOQUÍMICA CLÍNICA DE CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA MALIGNA SUPLEMENTADAS COM IMUNOESTIMULANTE

Resumo

Os alimentos funcionais têm sido empregados como adjuvantes no controle do câncer de mama. No presente estudo foram avaliadas variáveis hematológicas e os parâmetros da bioquímica sérica em 16 cadelas de distintas raças e idades, mastectomizadas, com diagnóstico de neoplasia mamária maligna. Estas foram divididas em dois grupos: suplementadas com *Saccharomyces cerevisiae* e mananoligossacarídeos e nutracêuticos (Promundog[®]) (S) e não suplementadas (NS). As cadelas foram submetidas à quimioterapia com doxorubicina e caborplatina, alternadamente, a intervalos de 21 dias, por oito sessões, períodos de tempo que determinaram os momentos experimentais deste estudo (M0, M21, M42, M63, M84, M105, M126, M147 e M168). Para avaliação do perfil hematológico obtiveram-se os valores de hemácias, hematócrito, hemoglobina, plaquetas, leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos e monócitos. Para a determinação dos parâmetros de bioquímica clínica mensuraram-se ureia, creatinina, albumina, bilirrubina total e bilirrubina direta, bem como a atividade sérica da alanina aminotransferase, fosfatase alcalina e gamaglutamiltransferase. Como as variáveis mostraram-se não homogêneas e a distribuição não obedeceu à normalidade, optou-se pela utilização do teste não paramétrico de Kruskal Wallis com significância estatística igual 5%. As cadelas suplementadas com imunostimulante por não apresentarem transtornos gastrointestinais, demonstraram melhor condição clínica ao longo de período acompanhado, além de ganho de peso em relação ao grupo não suplementado, grupo que perdeu peso. Quanto ao perfil hematológico, a suplementação minimizou a diminuição dos leucócitos e manteve o número de linfócitos dentro dos parâmetros considerados normais para a espécie. Na avaliação da bioquímica clínica de cadelas com tumor mamário é importante avaliar a atividade sérica da GGT.

Palavras-chave: alimento funcional, câncer, parâmetros bioquímicos, parâmetros hematológicos, quimioterapia.

CHAPTER 2 – EVALUATION OF HEMATOLOGIC AND CLINICAL BIOCHEMISTRY OF FEMALE DOGS BEARING MALIGNANT MAMMARY NEOPLASIA AND SUPPLEMENTED WITH IMMUNOSTIMULANTY

Abstract

Functional foods have been employed as mammary cancer control adjuvants. Hematological and clinical biochemistry profiles of 16 mastectomized female dogs of several breeds and ages, diagnosed with malignant mammary neoplasia, were evaluated in this study. The animals were allocated into two groups: Supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*, mannan-oligosaccharides and nutraceuticals immunostimulanty (S) and non-supplemented (NS). The animals were submitted to chemotherapy with doxorubicin and carboplatin, for eight sessions 21 days apart – time frame which determined the experimental moments of this study (M0, M21, M42, M63, M84, M105, M126, M147 and M168). In order to evaluate the hematologic profile, the following parameters' values were obtained: erythrocytes/red blood cell count, hematocrit/packed cell volume, hemoglobin, thrombocyte/platelets, leukocytes/white blood cell count, neutrophil granulocytes, lymphocytes, monocytes were obtained. To determine clinical biochemistry parameters, the values of urea, creatinine, albumin, total and direct bilirubin, as well as serum activity of alanine aminotransferase, alkaline phosphatase and gamma glutamyltransferase were assessed. As the variables were not homogeneous and did not obey normal distribution, the option was made to employ the non-parametric Kruskal Wallis test, with statistical significance of 5%. The female dogs supplemented with immunostimulanty, since they did not present gastrointestinal discomfort, have presented better clinical conditions during the evaluated period, besides gaining weight in relation to the non-supplemented group, which lost weight. Regarding the hematological profile, the supplementation minimized the leukocytes decrease and kept the number of lymphocytes within the normal parameters for the species. Evaluating GGT serum activity is important in the biochemical evaluation of female dogs with mammary tumor.

Keywords: functional foods, cancer, biochemistry parameters, hematologic parameters, chemotherapy.

1 Introdução

As neoplasias mamárias malignas apresentam-se como a forma de câncer mais comum em cadelas, principalmente naquelas não castradas¹. Em animais de companhia é fundamental a detecção precoce das neoplasias da glândula mamária, por meio da avaliação física completa e exames laboratoriais que propiciem o estadiamento clínico da neoplasia. Essas informações são fundamentais para o estabelecimento do tratamento adequado, indispensável na prevenção de recidiva local ou metástase à distância. Embora a cirurgia continue a ser o tratamento de escolha para tumores da glândula mamária a quimioterapia adjuvante pode ser necessária, para garantir uma melhor chance de controle da doença².

A escolha de nutrientes adequados que colaboram com uma melhor resposta do organismo frente ao tratamento quimioterápico deve ser feita considerando o estado nutricional, doenças concomitantes, hipermetabolismo e falhas no sistema imune³.

A quimioprevenção por meio dos alimentos funcionais surge como um instrumento no controle do câncer de mama, tendo como prováveis mecanismos de ação os efeitos anticarcinogênicos, antioxidantes, anti-inflamatórios, anti-hormonais, antiangiogênicos, dentre outros, embora as evidências científicas sejam controversas⁴.

Os probióticos foram definidos, em 2001 pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como microrganismos vivos, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrado em quantidades adequadas. Estudos *in vivo* e *in vitro* indicaram que organismos probióticos podem reduzir o risco de câncer de cólon e ainda determinar aumento no intervalo de recorrência de câncer de bexiga⁵.

Os prebióticos são substâncias alimentares não digeríveis que afetam benéficamente a saúde, de forma a estimular seletivamente o crescimento e a atividade de um número limitado e específico de bactérias no cólon, intencionando melhorar a saúde do hospedeiro⁶.

O *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura de fermentação que tem como constituinte estrutural da parede celular o polímero β -glucana, um polissacarídeo que vem recebendo especial atenção de pesquisadores por sua bioatividade, principalmente no que se refere a imunomodulação. Outros efeitos benéficos como a atividade antitumoral, anti-inflamatória, antimutagênica, hipocolesterolêmica e hipoglicemiante tem sido relatados⁷.

A β -glucana é um modificador da resposta biológica e, uma vez reconhecida pelo organismo, desencadeia uma série de eventos na resposta imunológica. Em vertebrados este reconhecimento ocorre por meio de receptores específicos de superfície celular, em seguida o sistema imunológico é estimulado pela β -glucana em resposta a inúmeras situações prejudiciais ao indivíduo. A modulação da β -glucana inclui a ativação de macrófagos e linfócitos polimorfonucleares, além da indução da expressão de diversas citocinas⁷.

Diversos estudos de tumor em modelo animal avaliaram o papel da arginina e observaram que ocorreu diminuição da incidência de tumor após a exposição aos agentes carcinogênicos, aumento do período de latência, diminuição do intervalo necessário para regressão do tumor e aumento do tempo de sobrevivência do animal⁸.

Para a avaliação da atividade imunológica, primariamente pode ser realizado o hemograma. Pois, as anormalidades hematológicas encontradas em pacientes com câncer são frequentemente atribuídas aos efeitos diretos do crescimento tumoral, bem como as síndromes paraneoplásicas⁹.

Em medicina veterinária, os perfis bioquímicos são utilizados rotineiramente para a avaliação clínica e metabólica em animais de companhia e de produção. Quando processados e interpretados corretamente, esses perfis fornecem informações relevantes sobre a saúde física e nutricional do animal além de ser útil para a prescrição e monitoramento de terapêutica específica, e estabelecer parâmetros prognósticos¹⁰.

A elevada ocorrência de anemia em pacientes com câncer pode não estar relacionada apenas aos efeitos citotóxicos de quimioterapia, mas também fortemente associada com a extensão da doença, uma vez que a anemia também está presente em pacientes não submetidos à quimioterapia^{11, 12}. Sob esta condição, o uso de agentes estimulantes de eritropoiese diminui a proporção de

pacientes utilizando quimioterápico que possam necessitar de transfusão de hemácias. Contudo, os agentes estimulantes de eritropoiese aumentam o risco de eventos trombovasculares em anemias induzidas por quimioterapia, assim como insuficiência renal crônica¹³.

Diante de tais fatores, a avaliação dos perfis hematológico e bioquímicos em animais com neoplasias tornam-se indispensáveis durante o período de tratamento. Desta forma constituiu-se como objetivo deste estudo avaliar aspectos clínicos, perfil hematológico e os parâmetros bioquímicos de alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, gama glutamiltransferase, albumina, uréia, creatinina, bilirrubina total e bilirrubina direta como indicadores da condição de saúde de pacientes com diagnóstico de neoplasia mamária maligna, submetidas à mastectomia, quimioterapia e suplementadas com suplemento imunestimulante.

2 Material e métodos

2.1 Delineamento experimental

O experimento foi realizado com 16 cadelas selecionadas em uma população de 50 cadelas atendidas no Setor de Oncologia do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (HV/EVZ/UFG).

Os proprietários que aceitaram participar do estudo assinaram o termo de anuência. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, sob o número 221/11.

Os critérios empregados para inclusão dos animais no experimento foram a presença de nódulos mamários não ulcerados de diâmetro inferior a 5cm, ausência de doenças infecto contagiosas concomitantes detectáveis em exames laboratoriais de rotina e ausência de metástases detectáveis nos exames radiográfico de tórax e ultrassonográfico de abdômen.

As cadelas foram submetidas ao procedimento cirúrgico de mastectomia total¹⁴ e os fragmentos colhidos em recipientes próprios contendo formal a 10% e foram encaminhados para exame histopatológico¹⁵.

De forma aleatória os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais (Quadro 1). O grupo suplementado (GS) recebeu a dieta fornecida pelo proprietário adicionada do suplemento Promun dog® (Grupo Organnact, Curitiba, Paraná. Níveis de garantia - aditivo flavorizante 13 g/kg, lisina (min)13,8 g/kg, mananoglicosacarídeos 64,7 g/kg, metionina 49 g/kg, proteína bruta (min) 200 g/kg, *Saccharomyces cerevisiae* (min) 1×10^8 UFC/g, treonina (min) 9.202 mg/kg, triptofano 3.200 mg/kg, vitamina E (min) 1.050 UI/kg, na dose de dois tabletes para cada 10kg de peso vivo, em intervalos de 24h e pela via oral. O grupo não suplementado (GNS) recebeu a dieta fornecida pelo proprietário

Quadro 1 Caracterização dos grupos experimentais.

Caracterização	Grupo suplementado (n=8)	Grupo não suplementado (n=8)
Idade (anos)	8,88±3,64	9,00±1,31
Peso corporal (kg)	13,71±11,38	7,33±2,63
Raça	Pit bull (n=1) Dachshund (n=1) Poodle (n=2) Mestiças (n=4)	Pinscher (n=1) Cocker (n=1) Dachshund (n=2) Mestiças (n=4)
Histopatologia	Carcinoma sólido de mama (n=1) Carcinoma túbulo papilar (n=1) Carcinoma tubular (n=1) Carcinoma complexo de mama (n=2) Carcinossarcoma de mama (n=3)	Carcinoma túbulo papilar (n=1) Carcinoma em tumor misto* (n=1) Carcinoma sólido de mama (n=2) Carcinoma complexo de mama (n=2) Carcinossarcoma de mama (n=2)

* Carcinoma em tumor misto associado a carcinoma túbulo papilar

A partir da avaliação histopatológica procedeu-se o estadiamento¹⁶ que foi utilizado para estabelecer o protocolo de quimioterapia.

A quimioterapia foi realizada em oito ciclos consecutivos 30 dias após a mastectomia, com intervalos de 21 dias e as avaliações laboratoriais (hemograma completo, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, gama glutamiltransferase,

albumina, uréia, creatinina, bilirrubina total e bilirrubina direta) em nove momentos, conforme descrito no Quadro 2.

Quadro 2 Momentos de avaliações laboratoriais e aplicação dos quimioterápicos (doxorubicina** carboplatina*).

Momentos (dias)	Avaliações laboratoriais	Doxorrubicina	Carboplatina
Zero	X		
21	X	X	
42	X		X
63	X	X	
84	X		X
105	X	X	
126	X		X
147	X	X	
168	X		X

* Fauldocarbo®, Libbs Farmaceutica Ltda

** Fauldoxo®, Libbs Farmaceutica Ltda

2.2 Protocolo quimioterápico

O protocolo quimioterápico estabelecido para as cadelas foi o AP-1, descrito por Lanore e Delprat¹⁷. Alternadamente foi aplicado 30mg/m² doxorubicina (Fauldoxo®, Libbs Farmaceutica Ltda) e 300mg/m² carboplatina, (Fauldocarbo®, Libbs Farmaceutica Ltda). Os quimioterápicos foram diluídos em 100mL de solução salina a 0,9% e aplicados em perfusão lenta na veia cefálica com auxílio de cateter 22G. Para induzir diurese as pacientes receberam 2mg/kg de furosemida por via intravenosa e 2mg/kg de difenidramina por via intramuscular, aplicada antes do início da administração de doxorubicina. Em seguida, administraram-se mais 100mL de solução salina a 0,9%, com intuito de eliminar resquícios do quimioterápico no vaso puncionado para evitar lesão vascular.

O tempo decorrido entre a preparação do paciente e administração do quimioterápico foi de duas horas e previamente a cada sessão de quimioterapia as cadelas foram reavaliadas por meio do exame laboratorial e peso corporal.

2.3 Avaliações laboratoriais

A colheita de sangue para avaliação laboratorial ocorreu com os animais em jejum alimentar de 12 horas. Para o hemograma foram obtidos 2,0 mL de sangue por venopunção jugular em tubo com EDTA. Para a bioquímica sérica foram obtidos 8,0mL de sangue por venopunção jugular, em tubo sem anticoagulante, que foi centrifugado após retração do coágulo e, em seguida, o soro foi separado por aspiração e alíquotizado em microtubos de polipropileno de 1,5mL (Eppendorf®) e submetidos ao congelamento (-20° C) até o momento da realização dos exames. As análises foram realizadas no laboratório multiusuário do programa de pós-graduação em ciência animal da EVZ/UFG.

A contagem das células sanguíneas foi determinada pelo método automático utilizando-se o aparelho BC – 2800 Vet (Auto Hematology Analyzer, Mindray® Bio-Medical Electronics Co. Ltda, Shenzhen - Guangdong), utilizando-se de cartão próprio de leitura para a espécie canina. Para contagem diferencial de leucócitos foram utilizados esfregaços sanguíneos corados em MMG ou Panótico.

Na determinação dos analitos foram utilizados reagentes comerciais padronizados (Labtest® - Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais), com metodologia cinética e colorimétrica, em temperatura de 37°C, com leitura realizada em analisador bioquímico automático (Cobas Mira Plus®, Roche, Jacarepaguá, Rio de Janeiro).

A atividade sérica da alanina aminotransferase (ALT) foi determinada pelo método cinético de tempo fixo seguindo a metodologia de Reitman e Frankel; a da gama glutamiltransferase (GGT) pelo método cinético (Szasz modificado), utilizando-se como substrato a glutamil-p-nitroanilida e a da fosfatase alcalina (ALP) pelo método cinético de ponto fixo (Roy modificado). As proteínas totais séricas foram quantificadas pelo método colorimétrico de ponto final, por reação com o biureto; a albumina pelo método colorimétrico por reação com o verde de bromocresol; a uréia pelo método enzimático colorimétrico da urease e a creatinina pelo método colorimétrico com solução de picrato em meio alcalino.

2.4 Análise estatística

O delineamento experimental foi em parcelas subdivididas, considerando-se como tratamento principal a suplementação (grupos suplementado e não suplementado) e como tratamento secundário, os momentos de colheita para os exames que antecederam cada ciclo de quimioterapia (M0 a M168).

Em princípio realizou-se a estatística descritiva dos dados, obtendo-se as medianas, médias, coeficientes de variação, intervalos de confiança e desvios padrão. Como as variáveis mostraram-se não homogêneas e a distribuição não obedeceu à normalidade, optou-se então pela utilização do teste não paramétrico de Kruskal Wallis e Qui- quadrado. A significância estatística adotada foi menor ou igual a 5%. Para as variáveis de peso inicial e peso final foi aplicado o teste T pareado, com $p=0,5\%$.

3 Resultados

No grupo suplementado (S) as cadelas permaneceram sem alterações clínicas ao longo da fase experimental, exceto alopecia leve observada em duas cadelas da raça Poodle. No não suplementado (NS) as pacientes apresentaram episódios de vômito e diarreia a partir da primeira aplicação até o final do estudo clínico.

As cadelas foram acompanhadas pelo período de um ano após o término do estudo. No grupo não suplementado, constatou-se que duas desenvolveram piometra e foram histerectomizadas, um animal veio a óbito por atropelamento dois dias antes do M105 e ocorreu uma recidiva da neoplasia e dois casos de metástase pulmonar com consequente óbito, nove meses após o término da quimioterapia. No grupo suplementado não se observou alterações clínicas ou recidivas.

O peso corporal das cadelas suplementadas foi crescente ($p=0.002$) do início ($13,71\pm 11,38\text{kg}$) ao final do estudo ($15,71\pm 12,48\text{kg}$), e apresentou-se estatisticamente significativo pelo teste T pareado. Enquanto que no grupo não

suplementado o peso decresceu de $7,33 \pm 2,63$ para $5,90 \pm 2,03$ (Figura 1), também apresentando significativamente diferente ($p=0.002$), conforme tabela 1.

TABELA 1 – Média e desvio padrão (DP) do peso corporal inicial e final (Kg), das cadelas com neoplasia mamária maligna submetidas à quimioterapia* e suplementadas e não suplementadas com Promun dog® **. Goiânia, Goiás, 2014.

Animal	Suplementadas		Não suplementadas	
	Peso inicial	Peso final	Peso inicial	Peso final
1	9,4	11,0	8,1	7,5
2	5,9	6,4	8,65	7,1
3	8,4	NA	10,3	7,3
4	31,3	33,3	6,3	5,0
5	8,1	8,9	6,2	5,0
6	3,8	4,4	3,3	2,6
7	3,05	37,0	11,4	9,0
8	7,7	9,0	4,3	3,7
Média	13,7 ^a	15,7 ^b	7,3 ^a	5,9 ^b
Desvio-padrão	11,4	12,5	2,6	2,0

Letras diferentes informam sobre a diferença pelo Teste de T pareado ($P \leq 0,05$)

NA amostra não analisada, óbito por atropelamento.

* Doxorubicina, carboplatina

** Aditivo flavorizante 13 g/kg, lisina (min) 13,8 g/kg, mananoligossacarídeos 64,7 g/kg, metionina 49 g/kg, proteína bruta (min) 200 g/kg, Saccharomyces cerevisiae (min) 1×10^8 UFC/g, treonina (min) 9.202 mg/kg, triptofano 3.200 mg/kg, vitamina E (min) 1.050 UI/kg.

3.1 Eritrograma

Os valores da mediana, média, coeficiente de variação, desvio padrão e intervalo de confiança ao longo do tempo, para os diferentes parâmetros do eritrograma estão apresentados na Tabela 2.

Os resultados indicam que nos dois grupos os animais apresentaram valores dentro da normalidade para o número de hemácias, taxa de hemoglobina e hematócrito. Nos momentos M42 e M105 as medianas das variáveis foram menores para o grupo suplementado ($p \leq 0,05$).

3.2 Plaquetograma

Os valores e variações medianos encontrados para as contagens globais de plaquetas estão apresentados na tabela 3, sendo que no M42 ($p \leq 0,02$). O grupo S foi maior que no grupo NS. Observa-se que ambos os grupos mantiveram a contagem global das plaquetas dentro dos limites da normalidade para a espécie.

3.3 Leucograma

Os resultados obtidos para contagem dos leucócitos totais (Tabela 4) indicam que o grupo NS apresentou valores inferiores ao grupo S nos momentos M84 ($p \leq 0,02$) e M147 ($p \leq 0,05$). No grupo suplementado a leucopenia estabeleceu-se somente no M168 [referência de 8 a 13 x 10³/μL – Jain et al.¹⁸].

As medianas e as variações obtidas para as contagens absolutas de neutrófilos segmentados não diferiram entre os grupos ($p \geq 0,05$) e os valores estiveram dentro da normalidade [referência de 3,8 a 9,1 x 10³/μL - Jain et al.¹⁸].

As contagens de linfócitos (Tabela 5) nas cadelas do grupo S foram superiores nos momentos M84 ($p \leq 0,05$) e M126 ($p \leq 0,01$). No grupo NS as contagens dos linfócitos estiveram próximas do mínimo para a espécie, ocorrendo linfopenia nos momentos M63 e M126 [referência de 1,1 a 3,9 x 10³/μL – Jain et

al.¹⁸]. As medianas das contagens absolutas de monócitos (Tabela 5) não diferiram entre os grupos ($p \geq 0,05$) e estiveram dentro dos parâmetros normais [referência de $0,2$ a $0,7 \times 10^3/\mu\text{L}$ – Jain et al.¹⁸].

TABELA 2 – Média e desvio padrão (DP), mediana, intervalo de confiança (IC) e coeficiente de variação (CV) obtidos para hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$), hemoglobina (g/dL) e hematócrito (%) em cadelas com neoplasia mamária maligna submetidas a quimioterapia* e suplementadas (S) e não suplementadas (NS) com Promun dog® **. Goiânia, Goiás, 2014.

Momentos/Variável	Média±DP		Mediana		Valor de P***	IC		CV		
	S	NS	S	NS		S	NS	S	NS	
	hemácias	7,10±0,79	6,81±0,86	6,95	6,94	0,64	0,55	0,60	11,15	12,63
M0	hemoglobina	14,28±1,04	15,33±2,20	13,90	15,45	0,14	0,72	1,52	7,31	14,34
	hematócrito	44,40±3,13	46,56±6,27	44,40	47,55	0,27	2,17	4,34	7,05	13,46
	hemácias	6,71±0,61	6,62±0,64	6,91	6,98	1,00	0,42	0,45	9,13	9,74
M21	hemoglobina	13,98±1,38	15,16±1,60	13,95	15,00	0,19	0,95	1,11	9,85	10,55
	hematócrito	43,13±3,65	46,74±4,33	43,40	47,70	0,09	2,53	3,00	8,47	9,26
	hemácias	6,21±0,45	6,65±0,55	6,10	6,61	0,21	0,31	0,38	7,19	8,32
M42	hemoglobina	13,63±1,18	15,23±1,70	13,35 ^b	15,65 ^a	0,05	0,81	1,18	8,63	11,15
	hematócrito	41,51±2,88	45,68±4,76	40,95 ^b	46,70 ^a	0,05	1,99	3,30	6,93	10,42
	hemácias	6,05±0,45	6,56±0,79	6,19	6,39	0,17	0,31	0,55	7,48	12,07
M63	hemoglobina	13,64±1,27	14,71±2,17	13,70	13,85	0,29	0,88	1,50	9,29	14,72
	hematócrito	42,31±3,13	44,64±6,00	42,50	42,50	0,60	2,17	4,16	7,40	13,45
	hemácias	6,18±0,63	6,79±1,02	6,20	6,45	0,16	0,44	0,71	10,26	15,01
M84	hemoglobina	13,69±0,87	15,34±2,96	13,85	14,50	0,29	0,60	2,05	6,34	19,28
	hematócrito	42,66±2,77	46,79±8,60	43,95	43,85	0,71	1,92	5,96	6,49	18,38
	hemácias	5,91±0,81	6,95±1,19	5,85 ^a	7,18 ^b	0,05	0,56	0,82	13,75	17,08
M105	hemoglobina	13,50±2,00	15,91±2,74	13,55	16,05	0,07	1,38	1,90	14,79	18,75
	hematócrito	40,93±5,81	48,81±8,19	40,20 ^b	49,25 ^a	0,05	4,03	5,68	14,20	16,78
	hemácias	6,43±1,19	6,36±0,99	6,14	6,11	0,67	0,83	0,69	18,53	15,63
M126	hemoglobina	14,53±2,91	14,40±2,70	13,40	14,15	0,59	2,02	1,87	20,04	18,75
	hematócrito	43,79±8,84	44,28±7,82	41,40	42,85	0,08	6,13	5,42	20,19	17,65
	hemácias	6,50±0,82	6,31±0,73	6,33	6,35	0,46	0,57	0,51	12,55	11,63
M147	hemoglobina	14,11±1,55	13,53±1,86	14,20	13,20	0,25	1,07	1,29	10,99	13,72
	hematócrito	44,76±5,28	40,90±5,24	44,20	39,80	0,09	3,66	3,63	11,80	12,81
	hemácias	6,29±1,00	5,64±1,11	6,71	6,09	0,17	0,69	0,77	15,88	19,64
M168	hemoglobina	14,14±2,27	13,13±2,08	15,40	13,25	0,25	1,57	1,44	16,04	15,81
	hematócrito	44,40±7,55	40,45±6,21	49,00	39,95	0,21	5,23	4,30	17,00	15,35

* Doxorubicina e carboplatina

** Aditivo flavorizante 13 g/kg, lisina (min) 13,8 g/kg, mananoligossacarídeos 64,7 g/kg, metionina 49 g/kg, proteína bruta (min) 200 g/kg, Saccharomyces cerevisiae (min) 1×10^8 UFC/g, treonina (min) 9.202 mg/kg, triptofano 3.200 mg/kg, vitamina E (min) 1.050 UI/kg.

***Teste de Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$)

TABELA 3 – Média e desvio padrão (DP), mediana, intervalo de confiança (IC) e coeficiente de variação (CV) obtidos para plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$), em cadelas com neoplasia mamária maligna submetidas à quimioterapia* e suplementadas (S) e não suplementadas (NS) com Promun dog® **. Goiânia, Goiás, 2014.

Momentos/ Variáveis	Média±DP		Mediana		Valor de P***	IC		CV	
	S	NS	S	NS		S	NS	S	NS
M0	363,13±248,19	346,8±159,89	302,00	331,00	1,00	171,99	110,80	68,35	46,11
M21	528,75±684,48	396,6±129,42	428,00	382,50	0,21	474,31	89,68	129,45	32,63
M42	592,00±772,87	341,8±83,60	483,00 ^a	342,50 ^b	0,02	535,56	57,93	130,55	24,46
M63	479,75±557,91	342,6±100,75	405,00	327,50	0,40	386,60	69,81	116,29	29,40
M84	450,00±726,91	289,5±90,35	337,00	282,00	0,13	503,71	62,61	161,53	31,21
M105	342,38±424,26	303,8±97,97	291,50	286,50	0,96	293,99	67,89	123,92	32,25
M126	367,43±391,03	270,9±73,76	255,00	276,50	0,67	270,97	51,11	106,42	27,23
M147	347,29±0, 379,72	268,8±109,49	300,00	273,00	0,29	263,13	75,87	109,34	40,74
M168	314,57±370,52	293,8±97,05	307,00	284,00	0,40	256,76	67,25	117,79	33,04

* Doxorubicina e carboplatina

** Aditivo flavorizante 13 g/kg, lisina (min) 13,8 g/kg, mananoligossacarídeos 64,7 g/kg, metionina 49 g/kg, proteína bruta (min) 200 g/kg, Saccharomyces cerevisiae (min) 1×10^8 UFC/g, treonina (min) 9.202 mg/kg, triptofano 3.200 mg/kg, vitamina E (min) 1.050 UI/kg

*** Teste de Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$)

TABELA 4 – Média e desvio padrão (DP), mediana, intervalo de confiança (IC) e coeficiente de variação (CV) referentes aos leucócitos totais (LT - $\times 10^3/\mu\text{L}$) e neutrófilos segmentados (Seg - $\times 10^3/\mu\text{L}$) em cadelas com neoplasia mamária maligna tratadas com quimioterapia* e suplementadas (S) e não suplementadas (NS) com Promun dog® **. Goiânia, Goiás, 2014

Momentos/ Variáveis		Média±DP		Mediana		Valor de P***	IC		CV	
		S	NS	S	NS		S	NS	S	NS
M0	LT	7,90±1,35	7,57±2,04	7,95	7,00	0,07	0,93	1,41	17,13	27,02
	Seg	5,00±1,62	5,05±2,87	5,56	4,28	0,83	1,12	1,44	32,53	41,33
M21	LT	10,52±4,82	7,80±2,67	10,10	9,10	0,32	3,34	1,85	45,83	34,33
	Seg	6,96±3,68	4,93±2,18	6,75	4,45	0,34	2,55	1,51	52,83	44,38
M42	LT	10,13±4,19	8,46±3,99	10,95	8,20	0,46	2,90	2,77	41,33	47,26
	Seg	6,52±3,84	5,93±2,82	5,61	5,55	0,92	2,66	1,95	59,00	47,65
M63	LT	9,30±2,64	7,37±2,94	8,70	7,20	0,21	1,83	2,03	28,43	39,90
	Seg	5,91±3,03	4,89±2,00	4,32	4,36	0,40	2,10	1,38	51,39	40,87
M84	LT	10,02±2,85	6,21±2,41	10,20 ^a	6,00 ^b	0,02	1,97	1,67	28,45	38,83
	Seg	7,37±3,80	4,40±2,21	6,62	3,66	0,09	2,63	1,53	51,52	50,32
M105	LT	9,68±4,71	6,57±3,16	8,60	6,65	0,29	3,26	2,19	48,64	48,13
	Seg	6,02±3,40	4,49±2,36	4,92	4,23	0,40	2,36	1,63	56,55	52,60
M126	LT	8,73±41,22	6,81±3,40	8,80	6,35	0,14	28,56	2,36	173,43	50,01
	Seg	5,24±2,88	4,90±3,56	4,44	3,96	0,40	1,99	2,46	54,99	72,71
M147	LT	9,17±3,41	6,22±1,33	8,60 ^a	6,10 ^b	0,05	2,36	0,92	37,20	21,50
	Seg	5,30±2,47	4,12±1,08	4,45	4,21	0,29	1,71	0,75	46,72	26,44
M168	LT	8,14±3,62	6,53±1,74	7,50	6,60	0,29	2,51	1,20	44,52	26,68
	Seg	4,62±1,62	4,61±1,79	3,28	4,76	0,92	1,12	1,24	32,53	38,88

* Doxorubicina e carboplatina

** Aditivo flavorizante 13 g/kg, lisina (min)13,8 g/kg, mananoligossacarídeos 64,7 g/kg, metionina 49 g/kg, proteína bruta (min) 200 g/kg, Saccharomyces cerevisiae (min) 1×10^8 UFC/g, treonina (min) 9.202 mg/kg, triptofano 3.200 mg/kg, vitamina E (min) 1.050 UI/kg

*** Teste de Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$)

TABELA 5 – Média e desvio padrão (DP), mediana, intervalo de confiança (IC) e coeficiente de variação (CV), referentes aos linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) em cadelas com neoplasia mamária maligna tratadas com quimioterapia* e suplementadas (S) e não suplementadas (NS) com Promun dog®**. Goiânia, Goiás, 2014

Momentos/ Variável	Média±DP		Mediana		Valor de P***	IC		CV		
	S	NS	S	NS		S	NS	S	NS	
M0	Linfócitos	2,13±0,88	1,61±0,67	1,92	1,71	0,40	0,61	0,46	41,19	41,64
	Monócitos	0,30±0,16	0,42±0,21	0,26	0,40	0,14	0,11	0,15	0,05	0,05
M21	Linfócitos	1,97±1,36	1,72±1,09	1,64	1,62	0,75	0,94	0,75	69,15	63,52
	Monócitos	0,44±0,31	0,49±0,20	0,45	0,47	0,67	0,21	0,14	0,07	0,04
M42	Linfócitos	2,98±2,60	1,51±0,97	2,53	1,87	0,17	1,80	0,67	87,31	64,04
	Monócitos	0,57±0,25	0,61±0,45	0,48	0,44	0,75	0,17	0,31	0,04	0,07
M63	Linfócitos	2,40±1,53	1,10±1,10	1,93	0,97	0,25	1,06	0,76	63,95	71,31
	Monócitos	0,67±0,49	0,56±0,28	0,52	0,48	1,00	0,34	0,19	0,07	0,05
M84	Linfócitos	2,96±2,54	1,19±0,83	2,52 ^a	1,07 ^b	0,05	1,76	0,57	85,60	70,29
	Monócitos	0,49±0,30	0,42±0,28	0,62	0,37	0,75	0,21	0,19	0,06	0,06
M105	Linfócitos	2,82±3,09	1,36±0,93	2,09	1,07	0,29	2,14	0,64	109,34	68,32
	Monócitos	0,50±0,33	0,49±0,22	0,49	0,51	0,83	0,23	0,15	0,07	0,04
M126	linfócitos	2,72±1,77	1,17±1,01	2,26 ^a	0,91 ^b	0,01	1,22	0,70	65,02	86,62
	monócitos	0,42±0,33	0,44±0,30	0,35	0,37	0,83	0,23	0,21	0,08	0,07
M147	Linfócitos	2,94±2,26	1,41±0,68	2,78	1,31	0,14	1,57	0,47	77,00	48,50
	Monócitos	0,59±0,51	0,31±0,11	0,31	0,34	0,25	0,36	0,80	0,09	0,04
M168	Linfócitos	2,68±2,59	1,16±0,54	2,25	1,17	0,83	1,80	0,37	96,86	46,67
	Monócitos	0,41±0,32	0,38±0,18	0,29	0,35	0,93	0,22	0,12	0,08	0,05

* Doxorubicina, carboplatina

** Aditivo flavorizante 13 g/kg, lisina (min)13,8 g/kg, mananoligossacarídeos 64,7 g/kg, metionina 49 g/kg, proteína bruta (min) 200 g/kg, Saccharomyces cerevisiae (min) 1x10⁸ UFC/g, treonina (min) 9.202 mg/kg, triptofano 3.200 mg/kg, vitamina E (min) 1.050 UI/kg

*** Teste de Kruskal-Wallis (P≤0,05)

3.4 Bioquímica sérica

Os valores medianos e as variações obtidas para os parâmetros bioquímicos séricos de ureia, creatinina e albumina estão descritos na Tabela 6.

As concentrações séricas de ureia foram semelhantes ($p \geq 0,05$) entre as cadelas dos dois grupos, em todos os momentos experimentais e estiveram dentro dos valores de referência [referência de 21 a 59 mg/dL - Kaneko et al.¹⁹].

No M147, o valor mediano da creatinina sérica foi maior no grupo S quando comparado ao grupo NS ($p \leq 0,03$). Os valores medianos nos demais momentos experimentais estiveram dentro dos limites fisiológicos para a espécie [referência de 0,5 a 1,5 mg/dL - Kaneko et al.¹⁹].

Com relação à albumina verificou-se que não houve diferença entre os grupos ($p \geq 0,05$) e os valores estiveram ligeiramente acima da referência [referência de 2,6 a 3,3 g/dL - Kaneko et al.¹⁹].

A atividade sérica da fosfatase alcalina (Tabela 7) foi superior ($p \leq 0,04$) no momento M147 no grupo S, entretanto, mais uma vez, os valores estiveram dentro dos limites da normalidade para a espécie estudada [referência de 20 a 150 U/L - Kaneko et al.¹⁹].

O valor de alanina aminotransferase (Tabela 7) foi menor no grupo S ($p \leq 0,03$) no M168. No entanto, a atividade enzimática foi considerada normal em todos os momentos do ensaio [referência de 10 a 80 U/L - Kaneko et al.¹⁹].

A atividade sérica da gama glutamiltransferase (Tabela 8) foi semelhante entre os grupos, exceto no M21, quando estava mais elevada no grupo S ($p \leq 0,01$), tendo sido evidenciada elevação de moderada a severa em todos momentos em um ou outro grupo [referência de 1,2 a 6,4 U/L - Kaneko et al.¹⁹].

Quanto à bilirrubina direta e total (Tabela 8) em ambos os grupos, os valores medianos estiveram dentro dos limites da normalidade [referência de bilirrubina direta 0,06 a 0,12 mg/dL e de bilirrubina total 0,1 a 0,3mg/ dL - Kaneko et al.¹⁹].

TABELA 6 – Média e desvio padrão (DP), mediana, intervalo de confiança (IC) e coeficiente de variação (CV) das concentrações séricas de uréia (mg/dL), creatinina (mg/dL) e albumina (g/dL) em cadelas com neoplasia mamária maligna tratadas com quimioterapia e suplementadas (S) e não suplementadas (NS) com Promun dog® **. Goiânia, Goiás, 2014.

Momentos/Variável	Média±DP		Mediana		Valor de P***	IC		CV		
	S	NS	S	NS		S	NS	S	NS	
	Uréia	34,74±15,67	35,47±9,68	34,47	37,00	0,71	10,86	6,71	45,12	27,29
M0	Creatinina	0,71±0,24	0,84±0,12	0,67	0,80	0,09	0,16	0,08	33,20	13,85
	Albumina	3,53±0,33	3,42±0,60	3,55	3,60	0,87	0,23	0,42	9,44	17,56
	Uréia	32,26±10,93	36,03±12,44	34,13	33,65	0,71	7,57	8,62	33,89	34,54
M21	Creatinina	0,94±0,25	0,80±0,28	0,96	0,83	0,83	0,17	0,19	26,82	34,69
	Albumina	3,42±0,20	3,66±0,53	3,40	3,55	0,22	0,14	0,37	5,90	14,44
	Uréia	32,61±10,38	40,35±21,80	33,00	39,84	0,40	7,20	15,11	31,84	54,03
M42	Creatinina	0,78±0,29	0,86±0,32	0,82	0,90	0,71	0,20	0,22	36,79	37,50
	Albumina	3,53±0,43	3,38±0,28	3,55	3,35	0,40	0,30	0,19	12,20	8,30
	Uréia	25,30±4,05	31,52±11,44	26,30	29,90	0,53	2,80	7,93	15,99	36,29
M63	Creatinina	0,81±0,28	0,87±0,21	0,75	0,88	0,87	0,19	0,15	34,25	24,16
	Albumina	3,36±0,31	3,26±0,37	3,40	3,30	0,20	0,21	0,26	9,14	11,48
	Uréia	28,07±8,46	34,26±17,34	26,70	33,10	0,60	5,86	12,01	30,13	50,61
M84	Creatinina	0,81±0,28	0,96±0,53	0,75	0,65	0,60	0,19	0,37	34,25	55,00
	Albumina	3,44±0,71	3,40±0,23	3,40	3,35	0,53	0,49	0,16	20,73	6,89
	Uréia	27,92±8,12	35,39±12,52	26,70	33,40	0,29	5,62	8,68	29,07	35,39
M105	Creatinina	0,74±0,25	0,70±0,31	0,87	0,60	0,53	0,17	0,21	34,04	43,69
	Albumina	3,33±0,38	3,45±0,18	3,50	3,50	0,46	0,26	0,13	11,34	5,30
	Uréia	30,77±9,83	43,85±23,89	26,00	36,85	0,64	6,81	16,55	31,94	54,47
M126	Creatinina	0,75±0,19	0,85±0,12	0,77	0,88	0,46	0,13	0,08	24,89	14,23
	Albumina	2,93±1,17	3,23±0,39	3,24	3,20	0,46	0,81	0,27	39,79	11,93
	Uréia	31,14±8,24	43,85±23,89	30,00	36,85	0,60	5,71	16,55	26,47	54,47
M147	Creatinina	1,16±0,31	0,91±0,21	1,18 ^a	0,92 ^b	0,03	0,22	0,14	27,12	22,66
	Albumina	2,73±1,14	3,43±0,33	3,40	3,45	0,49	0,79	0,23	41,64	9,49
	Uréia	30,83±12,00	37,86±9,84	33,20	34,00	0,40	8,31	6,82	38,91	26,00
M168	Creatinina	0,79±0,16	0,79±0,17	0,72	0,76	0,64	0,11	0,12	20,82	22,00
	Albumina	3,13±0,36	3,38±0,41	3,20	3,25	0,60	0,25	0,29	11,63	12,20

* Doxorubicina, carboplatina

** Aditivo flavorizante 13 g/kg, lisina (min)13,8 g/kg, mananoligossacarídeos 64,7 g/kg, metionina 49 g/kg, proteína bruta (min) 200 g/kg, Saccharomyces cerevisiae (min) 1x10⁸ UFC/g, treonina (min) 9.202 mg/kg, triptofano 3.200 mg/kg, vitamina E (min) 1.050 UI/kg

*** Teste de Kruskal-Wallis (P≤0,05)

Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis

TABELA 7 – Média e desvio padrão (DP), mediana, intervalo de confiança (IC) e coeficiente de variação (CV) das concentrações séricas de alanina aminotransferase - ALT (U/L) e fosfatase alcalina - ALP(U/L) em cadelas com neoplasia mamária maligna tratadas com quimioterapia* e suplementadas (S) e não suplementadas (NS) com Promun dog®
 **. Goiânia, Goiás, 2014.

Momentos/Variável	Média±DP		Mediana		Valor de P***	IC		CV		
	S	NS	S	NS		S	NS	S	NS	
M0	ALT	27,97±14,29	36,17±17,55	25,51	33,94	0,14	9,90	12,16	51,08	48,52
	ALP	120,94±63,95	50,26±25,76	86,07	41,77	0,53	44,31	17,85	52,88	51,26
M21	ALT	23,34±9,67	33,80±10,89	23,57	35,24	0,06	6,70	7,55	41,43	32,22
	ALP	83,09±66,47	111,51±91,40	65,66	86,40	0,12	46,06	63,34	80,00	81,97
M42	ALT	25,47±6,74	28,13±12,21	22,31	25,27	0,92	4,67	8,46	26,46	43,39
	ALP	94,40±80,98	58,88±15,66	73,20	61,89	0,21	56,12	10,85	85,79	26,59
M63	ALT	28,51±28,51	41,01±32,49	29,63	29,80	1,00	9,42	22,52	47,67	79,23
	ALP	69,64±22,70	75,11±29,46	83,54	81,29	0,87	15,73	20,42	32,60	39,23
M84	ALT	25,84±7,24	29,44±11,43	26,18	27,61	0,53	5,01	7,92	28,01	38,84
	ALP	62,21±34,74	55,89±21,45	51,78	52,04	0,92	24,07	14,86	55,85	38,38
M105	ALT	29,44±11,81	43,82±25,10	27,45	38,60	0,14	8,18	17,39	40,11	57,27
	ALP	70,48±42,04	73,63±21,61	50,73	74,06	0,34	29,13	14,97	59,64	29,35
M126	ALT	30,77±9,30	26,10±7,62	21,70	27,68	0,40	6,44	5,28	43,00	29,21
	ALP	84,02±108,00	66,99±34,67	46,70	48,74	0,83	74,84	24,02	128,54	51,75
M147	ALT	17,08±5,53	46,94±23,20	18,52	43,94	0,67	3,83	16,08	32,35	49,43
	ALP	175,02±222,87	64,06±29,71	80,09 ^a	64,15 ^b	0,04	154,44	20,59	127,34	46,38
M168	ALT	29,00±7,74	49,44±15,57	29,80 ^b	44,45 ^a	0,03	5,36	10,79	26,68	31,49
	ALP	101,05±113,39	68,28±21,58	61,95	72,70	0,42	78,58	14,95	112,21	31,60

* Doxorubicina, carboplatina

** Aditivo flavorizante 13 g/kg, lisina (min)13,8 g/kg, mananoligossacarídeos 64,7 g/kg, metionina 49 g/kg, proteína bruta (min) 200 g/kg, Saccharomyces cerevisiae (min) 1x10⁸ UFC/g, treonina (min) 9.202 mg/kg, triptofano 3.200 mg/kg, vitamina E (min) 1.050 UI/kg

*** Teste de Kruskal-Wallis (P≤0,05)

TABELA 8 – Média e desvio padrão (DP), mediana, intervalo de confiança (IC) e coeficiente de variação (CV) das concentrações séricas de GGT (U/L), bilirrubina direta (BD - mg/dL) e bilirrubina total (BT - mg/dL) em cadelas com neoplasia mamária maligna tratadas com quimioterapia* e suplementadas (S) e não suplementadas (NS) com Promun dog®**. Goiânia, Goiás, 2014.

Momentos/ Variável	Média±DP		Mediana		Valor de P***	IC		CV		
	S	NS	S	NS		S	NS	S	NS	
M0	GGT	13,92±5,86	16,84±8,36	14,04	13,00	0,53	4,06	5,79	42,10	49,63
	BD	0,14±0,05	0,13±0,04	0,12	0,15	0,67	0,04	0,03	38,63	31,69
	BT	0,20±0,06	0,26±0,12	0,18	0,25	0,19	0,04	0,08	31,13	45,08
M21	GGT	26,03±18,43	37,71±5,31	21,20 ^a	5,47 ^b	0,01	12,77	3,68	70,82	68,87
	BD	0,18±0,15	0,15±0,08	0,13	0,12	0,87	0,11	0,06	83,96	58,29
	BT	0,30±0,23	0,21±0,10	0,19	0,19	0,92	0,16	0,07	78,56	45,72
M42	GGT	14,88±9,45	7,06±4,71	16,90	5,05	0,10	6,55	3,27	63,50	66,73
	BD	0,11±0,09	0,10±0,05	0,10	0,08	0,67	0,06	0,03	74,88	50,33
	BT	0,20±0,09	0,16±0,05	0,19	0,17	0,25	0,06	0,04	44,32	34,57
M63	GGT	20,72±18,64	13,83±9,18	12,61	11,10	0,34	12,92	6,36	89,97	66,43
	BD	0,12±0,05	0,18±0,11	0,10	0,17	0,56	0,04	0,08	43,17	62,25
	BT	0,22±0,08	0,30±0,14	0,20	0,35	0,60	0,06	20,42	39,23	47,41
M84	GGT	6,65±3,89	8,12±2,74	5,84	8,08	0,29	2,69	1,90	58,47	33,70
	BD	0,12±0,09	0,13±0,08	0,08	0,10	0,34	0,06	0,06	75,95	64,57
	BT	0,25±0,17	0,24±0,19	0,22	0,16	0,63	0,12	0,13	67,43	79,44
M105	GGT	11,33±8,87	14,13±7,03	8,07	15,36	0,25	6,15	4,87	78,32	49,77
	BD	0,09±0,06	0,11±0,05	0,07	0,11	0,20	0,04	0,03	64,02	40,68
	BT	0,14±0,09	0,20±0,08	0,11	0,18	0,10	0,06	0,06	64,83	41,79
M126	GGT	9,42±4,41	11,97±9,29	10,00	8,46	0,67	3,06	6,44	46,84	77,68
	BD	0,10±0,08	0,17±0,17	0,06	0,10	0,56	0,05	0,12	78,33	97,03
	BT	0,17±0,08	0,26±0,20	0,16	0,23	0,71	0,05	0,14	45,02	77,04
M147	GGT	12,58±5,00	13,70±11,08	12,96	12,80	0,17	3,46	7,68	39,73	80,88
	BD	0,09±0,04	0,16±0,12	0,07	0,12	0,10	0,03	0,08	43,68	74,92
	BT	0,12±0,03	0,23±0,12	0,12	0,21	0,21	0,02	0,09	25,00	53,14
M168	GGT	9,62±8,71	12,69±7,25	5,00	11,50	0,60	6,04	5,02	90,55	57,09
	BD	0,10±0,09	0,09±0,05	0,08	0,08	0,79	0,06	0,03	87,51	53,33
	BT	0,17±0,14	0,25±0,21	0,12	0,20	0,37	0,10	0,15	0,10	84,76

* Doxorubicina, carboplatina

** Aditivo flavorizante 13 g/kg, lisina (min)13,8 g/kg, mananoligossacarídeos 64,7 g/kg, metionina 49 g/kg, proteína bruta (min) 200 g/kg, Saccharomyces cerevisiae (min) 1x10⁸ UFC/g, treonina (min) 9.202 mg/kg, triptofano 3.200 mg/kg, vitamina E (min) 1.050 UI/kg***

Teste de Kruskal-Wallis (P≤0,05)

4 Discussão

A quimioterapia na neoplasia mamária é uma terapia adjuvante, que associada à cirurgia, objetiva a cura do animal. Os principais protocolos utilizados associam dois ou três fármacos²⁰. Neste estudo optou-se pela quimioterapia com dois fármacos, a doxorrubina e a carboplatina, em virtude da comprovada eficácia desta associação neste tipo de câncer¹⁷.

A suplementação com imunoestimulante nas cadelas com neoplasia mamária, submetidas à cirurgia e a quimioterapia, produziu melhor resposta clínica, quando comparada a das cadelas não suplementadas. O efeito benéfico pode ser atribuído à redução das ações deletérias da enfermidade e da quimioterapia sob o sistema digestivo, clinicamente traduzido por menos episódios de vômito e diarreia, com consequente ganho de peso corporal. Segundo Klemashevich et al.²¹ alterações na microbiota intestinal estão ligadas a disbioses induzidas pelo câncer, de modo que sua restauração ou fortalecimento, pela adição de probióticos ou prebióticos na dieta, representa uma alternativa para evitar a progressão da neoplasia.

O polissacarídeo β -glucana da parede do *Saccharomyces cerevisiae* é um biomodulador que reduz as respostas pró-inflamatórias associadas à septicemia bacteriana²², além de elevar o número de linfócitos no intestino, podendo ser considerado um importante estimulador de imunidade da mucosa do trato gastrointestinal²³.

Outro indicador clínico da efetividade da suplementação com nutracêuticos foi que, ao término do período de acompanhamento, as cadelas do grupo suplementado não apresentaram nenhum caso de recidiva ou metástase. No grupo das cadelas não suplementadas ocorreu uma recidiva da neoplasia de mama, que necessitou de reintervenção cirúrgica e dois casos de metástase pulmonar, que resultaram na morte das cadelas. Segundo Tzianabos et al.²² a β -glucana extraída do *Saccharomyces cerevisiae* modula a produção de óxido nítrico e de citocinas como TNF- α , IL-1 e IL-6 nos locais de inflamação, além de aumentar os mediadores anti-inflamatórios, como IL-10 e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1). Tian et al.²⁴ corroboram o mecanismo de ação

desempenhado pela β -glucana do *Saccharomyces cerevisiae*, ao descrever sua atividade moduladora das respostas inflamatórias inata e adaptativa, mediante suas propriedades anti-tumorais. Portanto, a capacidade de modular o processo inflamatório pode ser a ligação entre a suplementação com o imunestimulante e a melhor resposta clínica das cadelas.

Os valores médios de hemácias, hematócrito e hemoglobina observados nas cadelas dos dois grupos, mantiveram-se nos limites fisiológicos indicando que o protocolo de quimioterapia não induziu hipoplasia medular. Resultado semelhante em cães foi descrito por Santana e Oliveira²⁵ em animais recebendo metotrexato e por Calpa et al.²⁶ utilizando a cisplatina.

A contagem das plaquetas permaneceu dentro dos limites da normalidade evidenciando que a quimioterapia com doxorrubina e carboplatina não afetou sua produção. Santana e Oliveira²⁵ constataram redução no número de plaquetas em cães submetidos a quimioterapia com metotrexato. Weiss et al.²⁷ descreveram a quimioterapia, sem identificação do fármaco, para linfoma e outras neoplasias em cães de várias. A menor toxicidade dos fármacos utilizado neste estudo pode justificar o número adequado de plaquetas. No estadiamento da neoplasia das cadelas deste estudo, foi estabelecido o grau II conforme Misdorp¹⁶ e, para Stockhaus et al.²⁸, as plaquetas apresentam redução no seu número em neoplasias mamárias de grau III e grau IV.

O número de leucócitos esteve dentro dos limites da normalidade nos dois grupos, mas ao longo do experimento apresentou gradativa redução (Tabela 4), evidenciada a partir do M105 nas cadelas suplementadas e do M63 nas cadelas não suplementadas com imunestimulante. Sendo que, neste último grupo, a redução foi mais evidente. Calpa et al.²⁶ utilizando a cisplatina para quimioterapia relatou valores médios de leucócitos de $9,4 \times 10^3/\mu\text{l}$ e não descreveu redução no número de leucócitos ao longo do tratamento, entretanto o período máximo de observação dos cães foi de 84 dias. Santana e Oliveira²⁵ avaliando cães saudáveis, sob quimioterapia com metotrexato, durante 36 dias também não observaram diminuição expressiva e uniforme de leucócitos. A redução dos leucócitos aqui observada pode ser atribuída ao maior período de quimioterapia, bem como ao fato das cadelas serem portadoras de neoplasia mamária, o que é

corroborado por Weiss et al.²⁷, que relata acentuada redução de leucócitos em cães com neoplasia recebendo quimioterápicos.

A contagem média dos neutrófilos e dos monócitos das cadelas dos dois grupos, ao longo do período acompanhado, permaneceu nos limites da normalidade, semelhante aos resultados obtidos por Santana e Oliveira²⁵. Weiss et al.²⁷ relataram neutropenia severa em cães com neoplasias mais graves que a apresentada pelas cadelas deste estudo.

A suplementação com imunoestimulante evitou o decréscimo dos linfócitos uma vez que as cadelas do grupo suplementado apresentaram contagens mais elevadas e dentro dos limites fisiológicos para a espécie, durante todo o período acompanhado. No grupo não suplementado as contagens dos linfócitos estiveram próximas do mínimo para a espécie, ocorrendo linfopenia em alguns momentos. Santana e Oliveira²⁵ ao avaliarem cães sob quimioterapia com metotrexato, observaram a presença de linfopenia, cuja gravidade aumentava com a elevação da dose do fármaco. Quanto ao mecanismo de ação do imunoestimulante sob o número dos linfócitos, pode-se inferir que, assim como ele ocasiona aumento de linfócitos no intestino²³, também poderia apresentar a mesma ação com relação às células precursoras linfoides.

A função renal das cadelas deste estudo não foi afetada pela quimioterapia com doxorrubina e carboplatina, pois as concentrações séricas de creatinina e uréia mantiveram-se dentro dos parâmetros fisiológicos para a espécie. Esse resultado era esperado uma vez que, apesar da excreção da carboplatina ser renal, é um fármaco seguro que pode ser utilizado inclusive em pacientes nefropatas. A doxorubicina apresenta efeito nefropático cumulativo para felinos, para caninos o efeito tóxico relevante é sobre o coração²⁸.

Na avaliação do fígado, considerando os parâmetros relacionados a integridade morfológica dos hepatócitos (ALT), das células dos ductos biliares (ALP), função de síntese (albumina) e de excreção (bilirrubina total e indireta) das cadelas deste estudo verificou-se que não ocorreu hepatotoxicidade. O que também era esperado uma vez que os quimioterápicos empregados no estudo não causam toxicidade hepática²⁸.

Ausência de alterações na bioquímica sérica (creatinina, uréia e ALT) em cadelas com tumor mamário tratadas com doxorrubicina e ciclofosfamida também foram relatadas por Daleck et al.²⁹.

A única alteração detectada na bioquímica clínica foi a elevação da atividade sérica da GGT, presente desde antes do início da quimioterapia. Em praticamente todos os momentos do estudo os valores estiveram muito acima da normalidade. Ao término da avaliação o grupo não suplementado ainda apresentava atividade sérica elevada de GGT, enquanto que o grupo suplementado apresentou a média dentro do normal. A GGT é uma enzima chave envolvida no metabolismo da glutatona, cuja expressão está significativamente aumentada em neoplasias humanas malignas³⁰. Na medicina estudos têm sido desenvolvidos focados na possível relação entre a GGT e o risco de câncer, na progressão tumoral, invasão e resistência aos medicamentos ^{30,31,32}.

Na medicina veterinária ainda não está caracterizada a relação entre a neoplasia e a elevação da atividade sérica da GGT, entretanto Kumaraguruparan et al.³³ ao avaliarem a relação entre os diferentes estádios clínicos do tumor mamário canino e a metabolização enzimática de xenobióticos, na fase I (citocromo P450 e b5) e na fase II (glutaciona S-transferase [GST], γ -glutamil transpeptidase [GGT], DT-diaforase [DTD] e [NADPH-diaforase], descreveram concentrações de GGT em tecido neoplásico mamário maiores que as detectadas em tecido mamário normal. A fase I da biotransformação de xenobióticos compreende um conjunto de reações de oxidação, redução e hidrólise que preparam os toxicantes para as reações da fase II. Essas reações, geralmente, modificam a estrutura química da substância mediante adição de um grupo funcional (-OH, -NH₂, -SH, ou -COOH), o que resulta em um pequeno aumento de hidrofiliabilidade. As reações de biotransformação de fase II, também chamadas de reações de conjugação, incluem glicuronidação, sulfonação, acetilação, metilação, conjugação com glutatona e conjugação com aminoácidos. É exatamente na fase II que atua a GGT. Desse modo é possível inferir que a elevação da atividade sérica da GGT teve relação com a neoplasia mamária e não com a aplicação dos quimioterápicos.

5 Conclusão

Cadelas com neoplasia mamária, submetidas à cirurgia e a quimioterapia, suplementadas com imunoestimulante apresentam melhor condição clínica, traduzida por ganho de peso e menor ocorrência de recidivas ou metástases. Quanto ao perfil hematológico a suplementação minimiza a diminuição dos leucócitos e mantém o número de linfócitos dentro dos parâmetros considerados normais para a espécie. O protocolo quimioterápico AP1, estabelecido neste estudo não comprometeu as funções renais e hepáticas das cadelas em ambos os grupos. Na avaliação da bioquímica clínica de cadelas com tumor mamário é importante avaliar a atividade sérica da GGT.

Referências

1. Seleeckx N, Rooster H, Kroeze EJBV, Ginneken CV, Brantegem LV. Canine mammary tumors, an overview. *Reprod Domes Anim.* 2011; 46:1112-31.
2. Novosad CA. Principles of treatment for mammary gland tumors. *Clin Tech Small An P.* 2003; 18(2)107-9.
3. Bower RH. Nutrition and immune function. *Nutr Clin Pract.* 1990; 5:199-5.
4. Padilha PC, Pinheiro RL. O papel dos alimentos funcionais na prevenção e controle do câncer de mama. *Rev Bras Cancerol.* 2004; 50:251-60.
5. Singh K, Kallali B, Kumar A, Thaker V. Probiotics: A review. *APJTM.* 2011; 287-90.
6. Gibson GR., Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995; 125:1401-12.
7. Magnani M, Castro-Goméz RJH. β – glucana de *Saccaromyces cerevisiae*: constituição, bioatividade, obtenção. *Semin Cienc Agrar.* 2008; 29(3):631-50.
8. Stechmiller JK, Childress B, Porter T. Arginine immunonutrition in critically ill patients: a clinical dilemma. *Am J Crit Care.* 2004; 13:17-23.
9. Childress MO. Hematologic abnormalities in the small animal cancer patient. *J Small Anim Pract.* 2011; 42:123-55.
10. Mundim AV, Coelho AO, Hortêncio SM, Guimarães EE, Espindola FS. Influence of age and sex on the serum biochemical profile of Doberman dogs in the growth phase. *J Comp Path.* 2007; 46:16-41.

11. Knight K, Wadw S, Balducci L. Prevalence and outcomes of anemia in cancer: A systematic review of the literature. *Am J Med.* 2004; 116:11-26.
12. Ludwig H, Belle SV, Barret-Lee P, Birgegard CB, Gascón P, Kosmidis P, Krzakowskowi JN, Olmi P, Schneider M, Schrijvers D. The European cancer anaemia survey (ECAS): A large, multinational, prospective survey defining the prevalence, incidence, and treatment of anaemia in cancer patients. *Eur J Cancer.* 2004. 40:2293-306.
13. Aapro M, Spivak JL. Update on erythropoiesis-stimulating agents and clinical trials in oncology. *The Oncologist.* 2009; 40:6-15.
14. Pavletic MM. 2010. Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery. 3ªEd. Iowa:Blackwell's. 480p.
15. Meuten DJ. 2002. Tumors in domestic animals. 4ªEd. Iowa:Iowa State Press.
16. Misdorp W, Else RW, Hellmen E. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. *AFIP.* 1999; 7(1):1-69.
17. Lanore D, Delprat C. 2004. Quimioterapia anticancerígena. 1ªEd. Editora Roca, São Paulo. 191p.
18. Jain NC. 1993. Essentials of veterinary hematology. Philadelphia: Lea & Febiger. 417p.
19. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. In: Kaneko JJ. 1997. Clinical biochemistry of domestic animals. 5ªed. San Diego: Academic Press. 932p.
20. Cirillo JV. Tratamento quimioterápico das neoplasias mamárias em cadelas e gatas. *J Health Sci Inst.* 2008; 26(3):325-7.

21. Klemashevich C, Wu C, Howsmon D, Calaniz R, Lee K, Jayaraman A. Rational identification of diet-derived postbiotics for improving intestinal microbiota function. *Curr Opin Biotechnol.* 2014; 26: 85-90.
22. Tzianabos AO. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13(4):523-33.
23. Tsukada C, Yokoyama H, Miyaji C, Ishimoto Y, Kawamura H, Abo T. Immunoprotection of intraepithelial lymphocytes in the intestine by oral administrations of β -glucan. *Cell Immunol.* 2003; 221:1-5.
24. Tian J, Ma J, Ma K, Guo H, Baidoo YZ, Yan J, Lu L, Xu H, Wang S. β -Glucan enhances antitumor immune responses by regulating differentiation and function of monocytic myeloid-derived suppressor cells. *Eur J Immunol.* 2013; 43:1220-30.
25. Santana AE, Oliveira VF. Evaluation of hematological profile, liver and kidney function after administration of methotrexate in dogs (*Cannis familiaris*, Linnaeus, 1758). In: Proceedings... WORLD VETERINARY CONGRESS. World Veterinary Association. 2002. Tunis. Tunísia. 3p.
26. Calpa CO, Daleck C, Castro JT. Evaluación del hemograma en caninos sanos sometidos a la administración de cisplatina. *Rev MVZ Córdoba.* 2010; 15(2):2102-10.
27. Weiss DJ, Evanson OA, Sykes J. A retrospective study of canine pancytopenia. *Vet Clin Path.* 1999; 28(3):83-8.
28. Withrow SJ, Macwen EG. 2007. Small animal clinical oncology. 4ªEd. St. Louis:Saunders.

29. Stockhaus C, Kohn B, Rudolph R, Brunnberg L, Giger U. Correlation of haemostatic abnormalities with tumor stage and characteristics in dogs with mammary carcinoma. *J Small Anim Pract.* 1999; 40:326-31.
30. Daleck CR, Franceschini PH, Alessi AC, Santana AE, Martins MIM. Aspectos clínicos e cirúrgicos do tumor mamário canino. *Cienc Rural.* 1998; 28(1):95-100.
31. Corti A, Franzini M, Paolicchi A, Pompella A. Gamma-glutamyltransferase of cancer cells at the crossroads of tumor progression, drug resistance and drug targeting. *Anticancer Res.* 2010; 30:1169-82.
32. Strasak AM, Rapp K, Brant LJ, Hilbe W, Gregoty M, Oberaigner W, Ruttman E, Concin H, Diem G, Pfeiffer KP, Ulmer H, Study Group Vhm&Pp. Association of γ -glutamyltransferase and risk of cancer incidence in men: a prospective study. *Cancer Res.* 2008; 68(10):3970-7.
33. Strasak AM, Goebel G, Concin H, Pfeiffer RM, Brant LJ, Nagel G, Oberaigner W, Concin N, Diem G, Ruttmann E, Gruber-Moesenbacher U, Offner F, Pompella A, Pfeiffer KP, Ulmer H, Study Group Vhm&Pp. Prospective study of the association of serum γ -glutamyltransferase with cervical intraepithelial neoplasia iii and invasive cervical cancer. *Cancer Res.* 2010; 70(9):3586-93.
34. Kumaraguruparan R, Subapriya R, Balachandran C, Manohar BM, Thangadurai A, Nagini S. Xenobiotic-metabolizing enzymes in canine mammary tumors. *Vet J.* 2006; 172:364-8.

CAPÍTULO 3 – PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA MALIGNA SUPLEMENTADAS COM IMUNOESTIMULANTE

Resumo

Para determinar a atividade imunomoduladora do nutracêutico Promundog®, o presente estudo propôs analisar as proteínas de fase aguda (PFA) albumina, haptoglobina, ceruloplasmina, alfa-1 glicoproteína ácida e alfa-1 antitripsina como marcadores não específicos de atividade inflamatória em câncer. Utilizaram-se 16 cadelas de diferentes raças e idades mastectomizadas, com diagnóstico de neoplasia mamária maligna, divididas em dois grupos: suplementadas (S) e não suplementadas (NS), submetidas à quimioterapia com doxorubicina e carboplatina alternadamente, em intervalos de 21 dias por oito sessões. A determinação laboratorial das PFA foi realizada no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV/UNESP/Campus de Jaboticabal/SP, pela técnica de eletroforese em SDS Page. Para a análise estatística dos dados, obtiveram-se as médias, medianas, desvio padrão, coeficiente de variação, intervalo de confiança. As variáveis mostraram-se não homogêneas e a distribuição não obedeceu à normalidade; optou-se, então, pela utilização do teste não paramétrico de Kruskal Wallis com significância estatística igual 5%. Os resultados obtidos não demonstraram diferença significativa nas variáveis analisadas entre os distintos grupos, notou-se tendência dos animais suplementados apresentarem menores concentrações de proteínas de fase aguda positiva. A PFA mais indicada para o acompanhamento clínico da neoplasia mamária em cadelas é a haptoglobina e a suplementação com imunoestimulante em cadelas com neoplasia mamária produz leve efeito na modulação da atividade inflamatória, caracterizada por redução nas PFA positivas haptoglobina e ceruloplasmina. As cadelas suplementadas com imunoestimulante apresentaram poucos transtornos gastrointestinais, melhor condição clínica, além de ganho de peso em relação ao grupo não suplementado ($p=0,002$).

Palavras-chave: câncer, eletroforese, Promundog®, SDS PAGE

CHAPTER 3 – ACUTE-PHASE PROTEIN IN FEMALE DOGS WITH MALIGNANT MAMMARY NEOPLASIA AND SUPPLEMENTED WITH IMMUNOSTIMULANTY

Abstract

In order to determine the immunomodulatory activity of the nutritional supplement Promun dog®, the present study aimed at analyzing the acute-phase proteins (APP) albumin, haptoglobin, ceruloplasmin, alpha-1 acid glycoprotein and alpha-1 antitrypsin, as non-specific markers of inflammatory activity in cancer. A total of 16 mastectomized female dogs of several breeds and ages, diagnosed with malignant mammary neoplasia, were allocated into two groups: supplemented (S) and non-supplemented (NS), and submitted to chemotherapy with doxorubicin and carboplatinalternately in eight sessions with 21-day intervals alternately. The laboratory determination of the APP was done at Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária of FCAV/UNESP/Campus de Jaboticabal/SP, employing the polyacrylamide gelelectrophoresistechnique with sodium dodecyl sulfate (SDS Page). For the statistical analysis of data, the means, medians, standard deviation, coefficient of variation and confidence interval were obtained. The variables were not homogeneous and did not obey the normal distribution; hence, the option was made to employ the non-parametric Kruskal Wallis test, with statistical significance of 5%. The results obtained by the statistical analysis did not demonstrate significant difference on the variables analyzed between the groups, and it was noticed a tendency of the supplemented animals to present lower positive concentration of acute-phase proteins. The most recommended APP for the clinical follow up of mammary neoplasia in female dogs is haptoglobin, and nutritional supplementing with Immunostimulanty female dogs with mammary neoplasia, has a slight effect on the modulation of inflammatory activity, characterized by a decrease in the positive APP haptoglobin and ceruloplasmin.

Keywords: cancer, electrophoresis, Promun dog®, SDS PAGE

1 Introdução

A oncogênese corresponde ao momento em que uma determinada célula sofre uma sequência de alterações genéticas, decorrente de mutações herdadas, de erros aleatórios na replicação do DNA, de fatores extrínsecos, como radiação, substâncias químicas ou de infecções virais. Uma única mutação dificilmente leva a formação de um tumor, para que esse processo ocorra são necessárias de duas a seis modificações genéticas, que irão progressivamente interferir com mecanismos responsáveis por proliferação, diferenciação e morte celular¹.

A detecção de um câncer subclínico em medicina veterinária por meio de biomarcadores é uma ferramenta útil, porém de difícil aplicação, uma vez que depende do desenvolvimento de uma medicina veterinária preventiva². A avaliação de proteínas de fase aguda tem sido utilizada no monitoramento da inflamação e como ferramenta de diagnóstico no acompanhamento das neoplasias, principalmente as mamárias que constituem o tipo mais comum de câncer em cães, com prevalência de 41% a 53%³.

Reação de fase aguda (RFA) compreende a resposta sistêmica a uma ampla gama de reações altamente inespecíficas, resultantes da ativação de proteínas de fase aguda (PFA), mediada pela hipercitocinemia pró-inflamatória, podendo se desenvolver em condições como traumas físicos e químicos, infecções fúngicas e bacterianas, ou ainda o câncer⁴.

As PFAs negativas são representadas pela pré-albumina (transtiretina), albumina, transferrina, transcortina e proteína de ligação do retinol. As de fase aguda positivas são a alfa-1 antitripsina, alfa-1 antitripsina, alfa-2 macroglobulina, protrombina, fator VIII, fator Von-Willebrand, fatores do complemento, ferritina, plasminogênio, alfa-1 glicoproteína ácida (GPA), haptoglobina (Hp), alfa-2 macroglobulina, ceruloplasmina (CP), amiloide A sérica (SAA), fibrinogênio, C3 e proteína C reativa (PCR). As PFA positivas também podem ser classificadas quanto a intensidade da sua concentração em elevadas e moderadas^{4,5,6,7}.

As PFA negativas normalmente presentes em indivíduos saudáveis, reduzem suas concentrações diante da RFA⁷. A albumina, responde por 60% do total de proteínas plasmáticas. Em condições de desnutrição, infecções crônicas e frente à RFA, tem suas concentrações plasmáticas reduzidas em relação aos valores normais⁸.

As determinações de haptoglobina e ceruloplasmina auxiliam na avaliação da inflamação em cães. Estas proteínas são consideradas seis vezes mais sensíveis na detecção da inflamação do que o fibrinogênio, a contagem de leucócitos totais e a contagem de neutrófilos segmentados e bastonetes. A concentração da haptoglobina aumenta em processos inflamatórios agudos, estresse e, às vezes, durante processos neoplásicos recentes. Seus valores médios normais ficam em torno de 104mg/dL. A concentração de ceruloplasmina altera-se significativamente após a indução de processo inflamatório em cães, ao contrário do que se observa em humanos⁹.

A alfa-1 antitripsina e a alfa-1 glicoproteína ácida, também chamadas de alfa-1 globulinas, se elevam frente a doenças inflamatórias agudas e crônicas, neoplasia, gravidez, estrogênioterapia e após cirurgias, os níveis das PFAs, após um único estímulo, permanecem inalterados por 48 horas ou mais⁸.

A resposta inflamatória é caracterizada por febre, leucocitose, produção de diversos hormônios e citocinas como interleucinas (IL-1, IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF α), LIF (*leukemia inhibitory factor*) e oncostatina M (OSM), produzidas no local da inflamação, que desempenham um papel crucial na RFA uma vez que são elas que induzem a produção de PFA pelo fígado. Além disso, a magnitude do aumento das citocinas inflamatórias está relacionada à agressividade do tumor, à caquexia por ele induzida e ao prognóstico do câncer^{10,11,12,13,14}.

Em condições fisiológicas existe equilíbrio entre proteases e seus inibidores. Por outro lado, evidências sugerem que um desequilíbrio entre estas podem estar relacionadas a danos nos tecidos e progressão do câncer. A alfa-1 antitripsina, denominada serpina A1 é uma inibidora de protease principalmente de elastase leucocitária, tripsina e plasminogênio¹⁵.

A suplementação com ácidos graxos ômega 3 e outros nutracêuticos, avaliada em estudo minimizou a resposta aguda, tanto em pacientes humanos

quanto em cães portadores de neoplasia maligna. A presença de proteína de resposta de fase aguda esteve fortemente associada há um tempo menor de sobrevida em pacientes com câncer¹⁶.

A síntese de poliaminas pode ser importante para a fidelidade da tradução da transcrição do DNA e RNA, que ocorre em resposta a infecção e durante a reparação de tecidos. Fenilalanina, tirosina, triptofano serina, e cisteína são liberados em quantidades mais próximas às necessidades. A arginina, a S-adenosil metionina (SAM) e a ornitina contribuem para manter a integridade tecidual durante períodos de crescimento celular rápido, nesse sentido a adição de pequenas quantidades de poliaminas na dieta pode melhorar os aspectos associados a microbiota intestinal do hospedeiro¹⁷.

Os efeitos quimiopreventivos, antimutagênicos e antígenotóxicos da β -glucana, um polímero extraído do *Saccharomyces cerevisiae* foram avaliados em camundongos submetidos à quimioterapia com ciclofosfamida. Sua utilização como adjuvante à quimioterapia antineoplásica parece ser capaz de diminuir os efeitos mutagênicos, prevenindo ou reduzindo danos ao DNA que são induzidos por quimioterápicos em células não tumorais. Ainda pode-se atribuir esses efeitos a sua atividade antioxidante¹⁸. Ao se avaliar os efeitos na resposta imune inata e adaptativa em camundongos com neoplasia o suplemento foi capaz de melhorar a qualidade de vida dos animais inibindo a mielossupressão e a esplenomegalia induzidas pelo tumor. Foi observado também aumento das células progenitoras de macrófagos na medula óssea, regulando positivamente IL1 e IL6, resultando em uma maior atividade das NK e interferon γ ¹⁹.

As proteínas de fase aguda têm sido pesquisadas, entre outras situações patológicas, como na condição de câncer, como biomarcadores auxiliares do diagnóstico e determinação de prognóstico. Assim, no presente estudo objetivou-se avaliar a atividade imunoestimulante do suplemento alimentar por meio da determinação das proteínas de fase aguda negativa (albumina) e positiva (haptoglobina, ceruloplasmina, alfa-1 glicoproteína ácida, alfa-1-antitripsina), como marcadores não específicos da atividade inflamatória no câncer de mama canino.

2 Material e métodos

2.1 Delineamento experimental

Neste estudo 16 pacientes foram selecionadas dentro de um universo de 50 cadelas oriundas do atendimento no Setor de Oncologia do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (HV/EVZ/UFG).

Os proprietários que aceitaram participar do estudo assinaram o termo de anuência. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, sob o número 221/11.

Para a inclusão dos animais no experimento, os critérios considerados após exame clínico minucioso, foram a presença de nódulos mamários não ulcerados de diâmetro inferior a 5cm, inexistência de doenças infecto contagiosas constatadas em exames laboratoriais e ausência de metástases detectáveis nos exames radiográfico de tórax e ultrassonográfico de abdômen.

O procedimento cirúrgico de mastectomia total²⁰ foi realizado e os fragmentos submetidos a exame histopatológico²¹.

Os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais aleatoriamente (Quadro 1). Aos proprietários do grupo suplementado (S) foi instituída a adição na dieta o suplemento Promun dog® (Grupo Organnact, Curitiba, Paraná. Níveis de garantia - aditivo flavorizante 13 g/kg, lisina (min)13,8 g/kg, mananoligossacarídeos 64,7 g/kg, metionina 49 g/kg, proteína bruta (min) 200 g/kg, *Saccharomyces cerevisiae* (min) 1×10^8 UFC/g, treonina (min) 9.202 mg/kg, triptofano 3.200 mg/kg, vitamina E (min) 1.050 UI/kg, na dose de dois tabletes para cada 10kg de peso vivo, em intervalos de 24h e pela via oral. O grupo não suplementado (GNS) recebeu a dieta fornecida pelo proprietário.

Quadro 1 Distinção dos grupos experimentais.

Caracteres	Grupo suplementado (n=8)	Grupo não suplementado (n=8)
Idade	8,88±3,64	9,00±1,31
Peso médio	13,71±11,38	7,33±2,63
Numero de animais	8	8
Tipo histológico	Carcinoma sólido de mama (n=1)	Carcinoma túbulo papilar (n=1)
	Carcinoma túbulo papilar (n=1)	Carcinoma em tumor misto/papilar (n=1)
	Carcinoma tubular (n=1)	Carcinoma sólido de mama (n=2)
	Carcinoma complexo de mama (n=2)	Carcinoma complexo de mama (n=2)
	Carcinossarcoma de mama (n=3)	Carcinossarcoma de mama (n=2)

O estadiamento foi estabelecido por meio da avaliação histopatológica para estabelecer o protocolo quimioterápico²².

A quimioterapia com doxorrubicina e carboplatina foi realizada alternadamente em oito ciclos consecutivos em intervalos de 21 dias, sendo a primeira a doxorrubicina, em todos os momentos foram feitas avaliações laboratoriais (hemograma, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, gama glutamiltransferase, albumina, uréia, creatinina, bilirrubina total e bilirrubina direta).

2.2 Protocolo quimioterápico

Para este estudo o protocolo quimioterápico estabelecido as cadelas foi o AP-1, descrito por Lanore e Delprat²³. Alternadamente foi aplicado 30mg/m² doxorrubicina (Fauldoxo[®], Libbs Farmaceutica Ltda) e 300mg/m² carboplatina, (Fauldocarbo[®], Libbs Farmaceutica Ltda). Os quimioterápicos foram diluídos em 100mL de solução salina a 0,9% e aplicados em perfusão lenta na veia cefálica com auxílio de cateter de 22G. Para induzir diurese as pacientes receberam 2mg/kg de furosemida por via intravenosa e 2mg/kg de difenidramina por via intramuscular, aplicada antes do início da administração de doxorrubicina. Em seguida, administrou-se mais 100mL de solução salina a 0,9%, com intuito de

eliminar resquícios do quimioterápico no vaso puncionado para evitar lesão vascular.

O tempo transcorrido entre a preparação do paciente e administração do quimioterápico era de duas horas e previamente a cada sessão de quimioterapia as cadelas eram reavaliadas por meio do exame clínico e peso corporal.

2.3 Avaliações laboratoriais

A colheita do material para a avaliação laboratorial ocorreu com os animais em jejum alimentar de 12 horas. Foram obtidos 8,0mL de sangue por venopunção jugular, em tubo sem anticoagulante, que foi centrifugado após a retração do coágulo e, em seguida, o soro foi separado por aspiração, sendo divididas em alíquotas em microtubos de polipropileno de 1,5mL (Eppendorf®) e submetidas ao congelamento (-20° C) até o momento da realização dos exames.

O proteinograma foi processado no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV/UNESP/Campus de Jaboticabal/SP. A separação das frações protéicas foi realizada utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS PAGE), conforme técnica descrita por Laemmli²⁴. Realizou-se a mensuração das frações proteicas em densitômetro computadorizado (Shimadzu, Tóquio, Japão). Empregou-se solução marcadora Sigma, Saint Louis, EUA com pesos moleculares de 29.000, 45.000, 66.000, 97.000, 97.400, 116.000 e 205.000 dáltons (D) e, as proteínas purificadas albumina, haptoglobina, ceruloplasmina, α 1- antitripsina e α 1- glicoproteína ácida.

2.4 Análise estatística

O delineamento experimental foi em parcelas subdivididas, considerando como tratamento principal a suplementação (grupos suplementado e não suplementado) e como tratamento secundário, os momentos de colheita para os exames que antecederam cada ciclo de quimioterapia (M0 a M168).

Em princípio realizou-se a estatística descritiva dos dados, obtendo-se as medianas, médias, coeficientes de variação, intervalos de confiança e desvios padrão. Como as variáveis mostraram-se não homogêneas e a distribuição não obedeceu à normalidade, optou-se então pela utilização do teste não paramétrico de Kruskal Wallis e Qui-quadrado. A significância estatística adotada foi menor ou igual a 5%.

Os valores de peso das cadelas no M0 e M168 foram submetidos ao teste T pareado com nível de significância $\leq 0,05$

3 Resultados

As cadelas que constituíram o grupo suplementado com imunoestimulante apresentaram condições clínicas gerais superiores às aquelas observadas no grupo não suplementado.

O peso corporal das cadelas suplementadas foi crescente ($p \leq 0,002$) do início ($13,71 \pm 11,38$ kg) ao final do estudo ($15,71 \pm 12,48$ kg). Enquanto que, no grupo não suplementado o peso decresceu ($p \leq 0,002$) de $7,33 \pm 2,63$ para $5,90 \pm 2,03$ (Tabela 1).

TABELA 1 – Média e desvio padrão (DP) do peso corporal inicial e final (Kg), das cadelas com neoplasia mamária maligna submetidas à quimioterapia* e suplementadas e não suplementadas com Promun dog® **. Goiânia, Goiás, 2014.

Animal	Suplementadas		Não suplementadas	
	Peso inicial	Peso final	Peso inicial	Peso final
1	9,4	11,0	8,1	7,5
2	5,9	6,4	8,65	7,1
3	8,4	NA	10,3	7,3
4	31,3	33,3	6,3	5,0
5	8,1	8,9	6,2	5,0
6	3,8	4,4	3,3	2,6
7	35,0	37,0	11,4	9,0
8	7,7	9,0	4,3	3,7
Média	13,7 ^a	15,7 ^b	7,3 ^a	5,9 ^b
Desvio-padrão	11,4	12,5	2,6	2,0

Letras diferentes informam sobre a diferença pelo Teste de T pareado ($P \leq 0,05$)

NA amostra não analisada, óbito por atropelamento.

* Doxorubicina, carboplatina

** Aditivo flavorizante 13 g/kg, lisina (min) 13,8 g/kg, mananoligossacarídeos 64,7 g/kg, metionina 49 g/kg, proteína bruta (min) 200 g/kg, *Saccharomyces cerevisiae* (min) 1×10^8 UFC/g, treonina (min) 9.202 mg/kg, triptofano 3.200 mg/kg, vitamina E (min) 1.050 UI/kg

Os valores da mediana, média, coeficiente de variação, desvio padrão e intervalo de confiança obtidos e o comportamento da mediana ao longo do tempo, das diversas proteínas de fase aguda estão apresentados nas tabelas 2, 3 e 4.

Os valores da albumina não diferiram estatisticamente ($p \geq 0,05$) ao longo do estudo entre os grupos e os valores ficaram próximos da normalidade (TAB. 2).

TABELA 2 – Média e desvio padrão (DP), mediana, intervalo de confiança (IC) e coeficiente de variação (CV) obtidos para albumina (mg/dL), em cadelas com neoplasia mamária maligna tratadas com quimioterapia* e suplementadas (S) e não suplementadas (NS) com Promun dog® **. Goiânia, Goiás, 2014.

Momentos/Variável	Média±DP		Mediana		Valor de P***	IC		CV	
	S	NS	S	NS		S	NS	S	NS
M0	4766,99±14,29	4919,98±499,43	4657,41	4835,78	0,53	9,90	346,08	51,08	10,15
M21	4416,02±9,67	4587,20±927,98	4419,76	4470,40	0,75	6,70	643,05	41,43	20,23
M42	4778,51±6,74	4314,17±555,96	4916,19	4182,72	0,67	4,67	385,25	26,46	12,89
M63	4402,19±13,59	4292,64±571,99	4222,98	4084,03	0,92	9,42	396,36	47,67	13,32
M84	4295,88±7,24	4043,56±217,46	4393,21	4002,23	0,21	5,01	150,69	28,01	5,38
M105	4385,99±11,81	4404,18±556,47	4146,01	4304,57	0,46	8,18	385,60	40,11	12,63
M126	4636,32±9,30	4217,42±261,18	4543,24	4244,03	0,25	6,44	180,99	43,00	6,19
M147	4468,58±5,53	4491,91±852,58	4579,59	4529,24	0,83	3,83	590,80	32,35	18,98
M168	4125,47±7,74	4797,86±1540,62	4082,33	4562,81	0,62	5,36	1067,57	26,68	32,11

* Doxorrubicina, carboplatina

** Aditivo flavorizante 13 g/kg, lisina (min)13,8 g/kg, mananoligossacarídeos 64,7 g/kg, metionina 49 g/kg, proteína bruta (min) 200 g/kg, Saccharomyces cerevisiae (min) 1x10⁸ UFC/g, treonina (min) 9.202 mg/kg, triptofano 3.200 mg/kg, vitamina E (min) 1.050 UI/kg

*** Teste de Kruskal-Wallis (P≤0,05)

A concentração da haptoglobina não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos em nenhum momento do estudo e as médias foram ligeiramente superiores às apresentadas por animais saudáveis (TAB. 3).

Em relação à ceruloplasmina, não houve diferença significativa ($p\geq 0,05$) entre os grupos, entretanto em todos os momentos, o grupo suplementado (S) apresentou concentrações séricas dessa proteína inferior as do grupo não suplementado (NS). Os valores ficaram dentro dos limites relatados para animais clinicamente saudáveis (TAB. 3).

TABELA 3 – Média e desvio padrão (DP), mediana, intervalo de confiança (IC) e coeficiente de variação (CV) obtidos para haptoglobina (Hp - mg/dL) e ceruloplasmina (CP - mg/dL) em cadelas com neoplasia mamária maligna tratadas com quimioterapia* e suplementadas (S) e não suplementadas (NS) com Promun dog® **. Goiânia, Goiás, 2014.

Momentos/ Variável	Média±DP		Mediana		Valor de P***	IC		CV		
	S	NS	S	NS		S	NS	S	NS	
M0	Hp	16,83±10,44	16,74±6,80	19,25	18,79	0,92	7,24	4,71	62,05	40,59
	CP	16,30±16,36	13,94±10,74	9,99	11,12	0,92	11,34	7,44	100,39	77,02
M21	Hp	17,17±11,52	25,59±10,19	13,37	22,46	0,32	7,99	7,06	67,12	39,83
	CP	12,40±13,80	20,22±14,75	6,51	0,25	17,44	9,56	10,22	111,27	72,94
M42	Hp	21,92±11,52	24,05±9,01	18,93	25,12	0,60	7,98	6,24	52,55	37,45
	CP	16,61±11,03	22,16±10,10	14,63	22,05	0,21	7,64	7,00	66,39	45,55
M63	Hp	14,01±4,06	23,42±10,35	12,57	23,78	0,06	2,81	7,17	28,96	44,19
	CP	15,31±10,52	19,94±11,54	11,47	15,12	0,25	7,29	8,00	68,72	57,87
M84	Hp	18,85±8,18	16,96±5,40	18,98	17,99	1,00	5,67	3,74	43,39	31,84
	CP	17,89±14,95	29,42±27,19	12,32	20,99	0,40	10,36	18,84	83,60	92,42
M105	Hp	20,27±11,32	21,49±7,83	15,83	18,86	0,29	7,85	5,43	55,87	36,45
	CP	19,93±15,39	20,44±15,05	15,52	17,83	0,60	10,66	10,43	77,20	73,59
M126	Hp	20,48±4,00	19,43±6,09	20,45	20,46	0,60	2,77	4,22	19,52	31,34
	CP	18,28±19,36	24,66±14,04	10,25	29,75	0,75	13,41	9,73	105,88	56,92
M147	Hp	13,63±9,09	23,76±17,50	9,40	18,29	1,00	6,30	12,12	66,71	73,63
	CP	18,52±19,42	40,08±37,92	14,38	34,98	0,92	13,46	26,27	104,88	94,59
M168	Hp	23,31±7,34	17,05±6,80	23,02	15,67	0,12	5,09	4,71	31,50	40,59
	CP	17,15±17,54	38,07±25,87	10,17	29,84	0,29	12,16	17,93	102,32	67,96

* Doxorubicina, carboplatina

** Aditivo flavorizante 13 g/kg, lisina (min)13,8 g/kg, mananoligossacarídeos 64,7 g/kg, metionina 49 g/kg, proteína bruta (min) 200 g/kg, Saccharomyces cerevisiae (min) 1x10⁸ UFC/g, treonina (min) 9.202 mg/kg, triptofano 3.200 mg/kg, vitamina E (min) 1.050 UI/kg***

Teste de Kruskal-Wallis ($P\leq 0,05$)

Em relação à alfa-1 antitripsina, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o grupo suplementado (S) ou não (NS). Os valores foram inferiores aos relatados na literatura para animais normais (TAB 4).

A alfa-1 glicoproteína ácida, somente no momento M63 apresentou valores significativamente maiores ($p \leq 0,02$) para o grupo não suplementado (NS). As concentrações foram maiores para o grupo NS, exceto nos momentos M147 e M168. Os valores ficaram dentro dos limites relatados para animais clinicamente saudáveis (TAB 4).

TABELA 4 – Média e desvio padrão (DP), mediana, intervalo de confiança (IC) e coeficiente de variação (CV) obtidos para alfa-1 antitripsina (AAT - mg/dL) e alfa-1 glicoproteína ácida (GPA - mg/dL) em cadelas com neoplasia mamária maligna tratadas com quimioterapia* e suplementadas (S) e não suplementadas (NS) com Promun dog® **. Goiânia, Goiás, 2014.

Momentos/Variável		Média±DP		Mediana		Valor de P***	IC		CV	
		S	NS	S	NS		S	NS	S	NS
M0	AAT	100,60±31,31	101,51±17,21	106,93	96,81	0,92	21,70	11,93	31,12	16,95
	GPA	26,58±28,07	16,75±7,63	14,84	16,69	0,75	19,45	5,29	105,61	45,55
M21	AAT	105,84±19,84	114,91±50,86	101,75	127,11	0,10	13,75	35,25	18,75	44,26
	GPA	25,89±15,57	26,40±7,98	22,22	28,80	0,75	10,79	5,53	60,14	30,24
M42	AAT	117,02±57,08	123,76±24,96	103,19	117,54	0,09	39,56	17,30	48,78	20,17
	GPA	21,63±15,63	24,87±16,91	16,04	17,08	0,46	10,83	11,72	72,27	67,98
M63	AAT	119,86±37,06	107,33±49,33	104,80	97,55	0,75	25,68	34,19	30,92	45,97
	GPA	12,90±7,06	27,04±14,89	11,16 ^b	23,65 ^a	0,02	4,89	10,32	54,70	55,04
M84	AAT	118,55±50,56	102,40±43,16	110,26	85,74	0,29	35,04	29,91	42,65	42,15
	GPA	17,36±8,66	18,27±5,34	17,21	18,05	0,53	6,00	3,70	49,92	29,25
M105	AAT	118,24±88,26	135,38±62,66	93,90	125,12	0,29	61,16	43,42	74,65	46,29
	GPA	18,69±9,60	20,33±7,48	17,80	17,31	0,53	6,65	5,18	51,36	36,79
M126	AAT	116,64±53,53	133,01±58,57	93,05	110,68	0,83	37,09	40,59	45,89	44,04
	GPA	15,54±10,14	18,03±8,68	11,00	19,29	0,83	7,02	6,02	65,24	48,15
M147	AAT	111,29±14,90	169,02±144,36	110,16	109,82	0,67	10,32	100,04	13,39	85,41
	GPA	24,32±10,80	14,48±4,62	25,44	13,59	0,25	7,49	3,20	44,42	31,91
M168	AAT	157,23±98,07	97,70±15,56	104,20	98,62	0,40	67,96	10,78	62,37	15,92
	GPA	26,33±19,10	16,63±5,44	17,93	15,16	0,21	13,24	3,77	72,54	32,70

* Doxorubicina, carboplatina

** Aditivo flavorizante 13 g/kg, lisina (min)13,8 g/kg, mananoligossacarídeos 64,7 g/kg, metionina 49 g/kg, proteína bruta (min) 200 g/kg, Saccharomyces cerevisiae (min) 1x10⁸ UFC/g, treonina (min) 9.202 mg/kg, triptofano 3.200 mg/kg, vitamina E (min) 1.050 UI/kg

*** Teste de Kruskal-Wallis (P≤0,05)

Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis

4 Discussão

Neste estudo as pacientes com neoplasia mamária maligna mastectomizadas e posteriormente submetidas ao tratamento quimioterápico associado à suplementação alimentar com iminoestimulante, evidenciaram-se clinicamente melhores que as não suplementadas (NS). Provavelmente esse efeito se deve a ação dos probióticos, prebióticos e nutracêuticos com relação à flora microbiana do intestino, atuando como bioterapêuticos, bioprotetores e bioprofiláticos, além de prevenir as infecções entéricas e gastrointestinais²⁵. Roudebush et al.²⁶ verificaram que pacientes em tratamento quimioterápico instituído com protocolo multifármacos e suplementados com ômega 3 e arginina apresentaram sobrevida adicional de 397 dias.

O monitoramento da condição clínica de pacientes com câncer por meio da mensuração de proteínas de fase aguda, como o realizado neste estudo, pode ser uma ferramenta importante de diagnóstico e monitoramento do tratamento de pacientes com neoplasia. Eckersall e Bell²⁷ consideraram que a redução sérica das PFAs contribui na diminuição da atividade neoplásica, sendo assim um bom indicador de prognóstico. Segundo Eckersall²⁸, as PFAs representam uma maneira simples, prática e rápida de diagnóstico e acompanhamento de doenças inflamatórias, infecciosas em animais de companhia, assim como em humanos. Uma das principais abordagens trata-se da comparação de proteínas de fase aguda maior positiva, outra moderada e uma negativa.

A concentração média da albumina sérica esteve entre 4.002,23 e 4.916,19 mg/dL. Para cães saudáveis esses valores são ligeiramente inferiores aos de Vieira et al.²⁹ (3.360 a 3.880 mg/dL) e para Battisti et al.³⁰ (3.023 a 4.402 mg/dL). Considerando os valores relatados para cães com neoplasia, percebe-se que a média é um pouco maior, portanto mais próxima dos resultados desse estudo. Vieira et al.²⁹ relata valores de 2.870 a 4.150 mg/dL em cães com linfoma e Battisti et al.³⁰ concentrações de 2.325 a 4.785 mg/dL em cadelas com neoplasia mamária. Na avaliação dos valores de PFAs entre os grupos estudados ao longo do experimento a albumina no grupo não suplementado apresentou

diminuição até o M84 e ao final do estudo os valores de ambos os grupos foram muito próximos. Pereira e Burini³¹ consideram a albumina uma proteína de fase aguda negativa que diminui sua concentração sérica diante de um processo inflamatório, pela ação de citocinas pró-inflamatórias.

As concentrações médias de haptoglobina do grupo S estiveram entre 9,40 e 23,02 mg/dL e as do grupo NS entre 15,67 e 25,12 mg/dL, valores ligeiramente superiores aos relatados para cães saudáveis (Vieira et al.²⁹ = 8,43 – 17,97 mg/dL e Battisti et al.³⁰ = 7,9 – 17,1 mg/dL). Por outro lado, esses valores quando confrontados com os obtidos de cães com neoplasia, ficaram mais próximos. Vieira et al.²⁹ avaliando cães com linfoma encontrou concentrações de 7,33 a 38,05 mg/dL e Battisti et al.³⁰ estudando cadelas com neoplasia mamária relatou valores de 11,1 a 33,5 mg/dL. O que reforça a característica de proteína de fase aguda positiva. Huntoon et al.³² consideram a Hp como reguladora da resposta imunológica, agindo como um marcador de resposta para controle ou progressão de doenças degenerativas e câncer.

Verificou-se concentrações médias de ceruloplasmina no grupo S entre 6,51 e 15,52 mg/dL e as do grupo NS entre 11,12 e 34,98 mg/dL. Os valores de ceruloplasmina foram semelhantes aos relatados na literatura, que não aponta diferenças importantes nos valores de animais saudáveis quando comparados com cães com neoplasia. Vieira et al.²⁹ descrevem intervalo de 8,02 a 32,26 mg/dL para cães saudáveis e 6,01 a 24,67 mg/dl para cães com linfoma. Battisti et al.³⁰ encontraram concentrações de 20,9 a 37,1 mg/dL em animais saudáveis e de 16,0 a 37,4 mg/dL em cadelas com neoplasia mamária. Varela et al.³³ relataram que a concentração sérica Cp elevou-se sensivelmente nos pacientes humanos com tumores sólidos de mama, pulmão, gastrointestinal, cabeça e pescoço, tornando-se um bom indicador prognóstico e merecendo maiores estudos nesse sentido. Planellas et al.³ investigaram as HP e proteína C-reativa em cadelas com neoplasias mamárias e encontraram aumentos moderados nas concentrações séricas de ambas as proteínas quando comparadas a cadelas híidas.

É importante salientar que a haptoglobina, na maioria dos momentos estudados, e a ceruloplasmina, em todos os momentos avaliados, foram inferiores no grupo suplementado, sugerindo que a suplementação com o imunoestimulante

pode modular a resposta inflamatória do organismo frente à neoplasia. Esse efeito imunológico pode ser atribuído a β -glucana extraída do *Saccharomyces cerevisiae*, pois já é sabido que a utilização da β -glucana como adjuvante à quimioterapia, produz efeito anti-inflamatório³⁴, bem como estimula a multiplicação de células progenitoras de macrófagos na medula óssea, regulando positivamente IL1 e IL6, resultando em uma maior atividade da NK e do interferon γ ¹⁹.

A alfa-1 antitripsina no presente estudo, em todos os momentos e grupos apresentou valores (85,74 a 127,11 mg/dL) menores que os descritos na literatura. Vieira et al.²⁹ descrevem intervalo de 340 a 600 mg/dL para cães saudáveis e 170 a 490 mg/dL para cães com linfoma. Battisti et al.³⁰ encontraram concentrações de 294 a 406 mg/dL em animais saudáveis e de 322 a 373 mg/dL em cadelas com neoplasia mamária. A alfa-1 antitripsina é uma serina protease inibidora atuando como bloqueadora de leucócitos e de enzimas proteolíticas lisossomais⁸. Em adição, Anes et al.¹⁵ consideram a serina protease inibidora que protege os tecidos de ataque de elastase de neutrófilos, bem como atua estimulando diretamente a proliferação de fibroblastos e produção de matriz extracelular. Neste estudo, apesar de ser esperada sua ação na cascata da inflamação, a proteína não se comportou como PFA positiva para neoplasia mamária canina.

Os valores de alfa-1 glicoproteína ácida dos cães deste estudo (11,0 a 28,8 mg/dL) foram semelhantes aos relatados na literatura para cães saudáveis (Vieira et al.²⁹ = 10 – 30 mg/dL e Battisti et al.³⁰ = 5,1 – 17,3 mg/dL) e inferiores aos encontrados em cães com neoplasia (Vieira et al.²⁹ = 10 – 70 mg/dL e Battisti et al.³⁰ = 2,0 – 47,8 mg/dL). YUKI et al.^{37,38} consideram que esta glicoproteína apresenta-se elevada durante a inflamação e está envolvida em mecanismos de defesa biológica como a atividade fagocitária dos neutrófilos e blastogênese de linfócitos por meio da modulação da IL1 e 6, além do TNF. Desta maneira, permanece mais tempo na circulação, o que a torna um excelente marcador de resposta terapêutica ao tratamento de doenças, principalmente aqueles que envolvem reações inflamatórias contínuas como o câncer. Neste estudo, a alfa-1 glicoproteína ácida também não se comportou como PFA positiva para neoplasia mamária canina.

5 CONCLUSÃO

A suplementação com imunomodulador, em cadelas com neoplasia mamária produz efeito na modulação da atividade inflamatória, caracterizada por redução nas proteínas de fase aguda positivas haptoglobina e ceruloplasmina.

A proteína de fase aguda mais indicada para o acompanhamento clínico da neoplasia mamária em cadelas é a haptoglobina.

Referências

1. Onuchic AC, Chammas R. Câncer e o microambiente tumoral. Rev Med Minas Gerais. 2010; 89:21-31.
2. Henry CJ. Biomarkers in veterinary cancer screening: Applications, limitations and expectations. Vet J. 2010. 185:10-4.
3. Planellas M, Bassols A, Siracusa C, Saco Y, Gime'nez M, Pato R, Pastor J. Evaluation of serum haptoglobin and C-reactive protein in dogs with mammary tumors. Vet Clin Path. 2009. 38:348-352.
4. Hansen MK. Canine C-reactive protein - a study on the applicability of canine serum C-reactive protein [Tese]. Department of Small Animal Clinical Sciences. (Veterinary Clinical Pathology) The Royal Veterinary and Agricultural University Frederiksberg Denmark. 2004. 125f.
5. Silva DGKC, Teodoro GM, Sena LV, Sousa ZM, Rezende AA. Perfil eletroforético de proteínas plasmáticas: estudo em crianças atendidas no Hospital de Pediatria – Hosped/UFRN da Cidade de Natal – RN. RBAC. 2005. Rio de Janeiro, v.37, p.239-42.
6. Jain S, Gautam V, Naseem S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. JBBS-Journal. 2011; 3:118-27.
7. Kent J. Acute phase proteins: theirs use in veterinary diagnosis. Br Vet J. 1992; 148:279-82.
8. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. J Zhejiang Univ Sci. 2005; 11:1045-56.
9. Kogika MM, Pereira DA, Elias F, Notomi MK, Delayte EH, Kawahara R, Hagiwara MK. Determinação sérica de haptoglobina, ceruloplasmina e α

glicoproteína ácida em cães com gastroenterite hemorrágica. Cienc rural. 2003; 33(3):513-7.

10. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. N Engl J Med. 1999; 340:448-54.

11. Kallio R, Bloigu A, Surcel HM, Syrjala H. C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate in differential diagnosis between infections and neoplastic fever in patients with solid tumours and lymphomas. Support Care Cancer. 2001; 9(2):124-8.

12. Bilate AMB. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. Rev Bras Reumatol. 2007; 8(2)47-51.

13. Bolayrl M, Turna H, Orhanoglu T, Ozaras R, Ilhan M, Ozguroglu M. C-reactive protein as no acute phase protein in câncer patients. Med Oncol. 2007; 24:338-44.

14. Taveira VC, Reis MA, Silva MF, Sala BRC, Novaes MRCG. Efeitos do tratamento com *Agaricus sylvaticus* sobre a anemia e os níveis de proteína C reativa em animais com tumor sólido de Walker 256. Comun Cienc Saude. 2007; 18:221-6.

15. Anes AB, Nasr HB, Hammann P, Kuhn L, Trimeche M, Hamrita B, Bougmiza I, Chaieb A, Khairi H, Chahed K. Assessment of the clinical significance of antigenic and functional levels of α 1- proteinase inhibitor (α 1- Pi) in infiltrating ductal breast carcinomas. Clin Biochem. 2012; 45:1421-31.

16. Davenport DJ. The use of nutraceuticals in cancer therapy. NAVC. 2006; 20:7-11.

17. Grimble RF, Grimble GK. Immunonutrition: Role of Sulfur Amino Acids, Related Amino Acids, and Polyamines. Nutrition. 1998; 14(7/8)605-10.

18. Oliveira RJ, Salles MJS, Silva AF, Kanno TYN, Lourença ACS, Leita VS, et al. In vivo evaluation of the antimutagenic and antigenotoxic effects of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* in acute treatment with multiple doses. *Genet Mol Biol.* 2013; 36(3)413-24.
19. Torello CO, Queiroz JS, Queiroz MLS. β -1, 3-glucan given orally modulates immunomyelopoietic activity and enhances the resistance of tumour – bearing mice. *Clin exp pharmacol physiol.* 2012; 39:209-17.
20. Pavletic MM. Atlas of Small animal wound management and reconstructive surgery. 3^aEd. 2010. Iowa:Blackwell's. p.433-480.
21. Meuten DJ. Tumors in domestic animals. 4^aEd. 2002. Iowa:Iowa State Press.
22. Misdorp W, Else RW, Hellmen E. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. *AFIP.* 1999; 7(1):1-69.
23. Lanore D, Delprat C. Quimioterapia anticancerígena. 2004. São Paulo:Editora Roca, 191p.
24. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227:680-5.
25. Reig ALC, Anesto JB. Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. *Rev Cub Aliment Nutr.* 2002; 16(1)63-8.
26. Roudebush P, Davenport DJ, Novotny BJ. The use of nutraceuticals in cancer therapy. *Vet Clin N Am Small. Journal.* 2004; 34:249-69.
27. Eckersall PD, Bell R. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J.* 2010; 185:23-7.

28. Eckersall PD. The time is right for acute phase protein assays. *Vet J.* 2004; 168:3-5.
29. Vieira MC. Eletroforetograma de proteínas séricas em cães linfomatosos, submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin [Tese]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal; 2009. 111f.
30. Battisti MKB, Silva DM, Reusing SO, Beltrame CO, Schmidt MS, Fagliari JJ, Dittrich RL, Guérios SD. Proteínas de fase aguda em cadelas com neoplasia mamária. *Cienc rural.* 2013; 43(5)902-7.
31. Pereira PCM, Burini RC. Reação metabólica à infecção no hospedeiro. *Ver Hosp Clin Fac Med. Sao Paulo.* 1992; 47:111-5.
32. Huntoon MK, Wang Y, Eppolito CA, Barbour KW, Berger FG, Shrikant PA, Baumann H. The acute phase protein haptoglobin regulates host immunity. *J leukoc Biol.* 2008; 84:1- 12.
33. Varela AS, Saez JJBL, Senra D. Q. Serum ceruloplasmin as a diagnostic marker of cancer. *Cancer Lett.* 1997; 121:139-145.
34. Murphy EA, Davis JM, Carmichael MD. Immune modulation effects of β -glucan. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010; 13:656-61.
35. Yuki M, Itoh H, Tamura K, Nishii N, Takase K. Isolation, characterization of canine alpha- 1 acid glycoprotein. *Vet Res Commun.* 2008; 32:533-42.
36. Yuki M, Itoh H, Takase K. Serum α -1 acid glycoprotein concentration in clinically healthy puppies and adult dogs and in dogs with various diseases. *Vet Clin Pathol.* 2009; 39:65-7.

CAPÍTULO 4- METABOLISMO DO FERRO EM CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA MALIGNA SUBMETIDAS À QUIMIOTERAPIA E SUPLEMENTADAS COM IMUNOESTIMULANTE

Resumo

O eletrólito ferro fundamental para o correto funcionamento do metabolismo corporal colabora, entre outros, com o funcionamento dos sistemas hematopoiético e imunológico. Porém, quando em desequilíbrio apresenta comportamento ambíguo, atuando citotxicamente no desenvolvimento de neoplasias. Sob este aspecto, o presente trabalho objetivou utilizar os parâmetros de metabolismo do ferro com a mensuração das concentrações séricas do ferro, ferritina, transferrina e índice de saturação da transferrina. Para tal, foram utilizadas 16 cadelas de diferentes raças e idades, mastectomizadas, diagnosticadas para neoplasia mamária maligna, divididas em dois grupos: suplementadas com imunoestimulante (S) e não suplementadas (NS), submetidas a quimioterapia com doxorrubicina e caborplatina, alternadamente. O ferro foi determinado utilizando-se reagente comercial padronizado, a transferrina foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS Page), o IST foi calculado pela fórmula $IST = [Ferro / (Ferro + IBC)] \times 100$ e a ferritina foi determinada por turbidimetria com reagente específico. Como as variáveis mostraram-se não homogêneas e a distribuição não obedeceu à normalidade, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal Wallis. Cadelas com neoplasia mamária, submetidas à quimioterapia com doxorrubicina apresentaram elevadas concentrações séricas de ferro. A transferrina, reduzida nos animais dos dois grupos, é uma PFA negativa que pode ser usada para o diagnóstico e acompanhamento clínico da neoplasia mamária em cadelas submetidas à quimioterapia. A suplementação com imunoestimulante, em cadelas com neoplasia mamária, produziu leve efeito na modulação da atividade inflamatória, caracterizada por redução na PFA positiva ferritina.

Palavras-chave: IST, ferritina, alimento funcional, quimioterapia, transferrina

CHAPTER 4 – IRON METABOLISM IN FEMALE DOGS DIAGNOSED WITH MALIGNANT MAMMARY NEOPLASIA, SUBMITTED TO CHEMOTHERAPY AND SUPPLEMENTED WITH IMMUNOSTIMULANTY

Abstract

The electrolyte iron, which is vital to the correct functioning of body metabolism, collaborates, amongst others, with the functioning of the hematopoietic and immune systems. However, when imbalanced, it presents ambiguous behavior, acting in a cytotoxic manner on the development of neoplasia. Considering such a contingency, the present study aimed to employ iron metabolism parameters, by measuring blood serum concentration of iron, ferritin, transferrin and transferrin saturation. Thus, 16 mastectomized female dogs of several ages and breeds, diagnosed with malignant mammary neoplasia, were allocated into two groups: supplemented with immunostimulanty (S) and non-supplemented (NS), both submitted to chemotherapy with doxorubicin and carboplatin. The Iron concentration was determined by employing a commercial standard reagent, the transferrin concentration was determined by polyacrylamide gel electrophoresis technique with sodium dodecyl sulfate (SDS Page). The Transferrin Saturation Index (TSI) was calculated by the formula $TSI = [Iron / (Iron + IBC)] \times 100$, and the ferritin was determined by turbidimetry with an specific reagent. The variables were not homogeneous and did not obey the normal distribution; hence, the option was made to employ the non-parametric Kruskal Wallis test, with statistical significance of 5%. Female dogs with mammary neoplasia, submitted to chemotherapy with doxorubicin, presented increased serum concentrations of iron. The transferrin, decreased in animals from both groups, it is a negative-APP, which may be employed on the diagnostic and clinical follow up of mammary neoplasia in female dogs submitted to chemotherapy. Nutritional supplementation with immunostimulanty in female dogs with mammary neoplasia produced a slight effect over inflammatory activity modulation, characterized by positive-APP ferritin decrease.

Keywords: TSI, ferritin, functional foods, chemotherapy, transferrin

1 Introdução

Substâncias anticarcinogênicas são conceituadas quanto à capacidade de impedir, retardar ou reduzir o surgimento, ou desenvolvimento de neoplasias. Nesta perspectiva a utilização de suplementos alimentares tem o propósito de melhorar a capacidade funcional do organismo acometido por câncer e prolongar a vida destes pacientes, com qualidade, podendo ser uma estratégia terapêutica a ser validada na medicina veterinária¹.

A microbiota intestinal é fundamental em uma variedade de funções, incluindo a homeostasia corporal. Estudos recentes relacionam as alterações na microbiota com disbioses induzidas pelo câncer, considerando a restauração ou o fortalecimento desta, com base em uma dieta acrescida de probióticos, prebióticos e nutraceuticos como uma alternativa saudável para a prevenção ou mesmo para evitar a progressão dessa doença².

Neste contexto, os probióticos são organismos vivos, benéficos à saúde quando ingeridos, dentre eles o *Saccharomyces cerevisiae* ocupa um importante papel na indústria de medicamentos e alimentos funcionais, objetivando a prevenção e a minimização dos efeitos deletérios de doenças como o câncer³. E os prebióticos são os hidratos de carbono de cadeia curta não digeríveis por enzimas digestivas, capazes de potencializar seletivamente alguns grupos de bactérias benéficas no intestino, para a produção de ácidos graxos de cadeia curta. Estes também podem reduzir o risco de cancer, além de aumentar a absorção de cálcio e de magnésio pelo intestino. Os prebióticos são encontrados em vários legumes e frutas e a sua adição melhora as características sensoriais dos alimentos, tais como sabor e textura⁴.

A ingestão de probióticos, prebióticos ou a combinação simbiótica de ambos representa uma opção terapêutica na redução dos danos causados por microorganismos patogênicos no trato gastrointestinal, e parece exercer um importante papel na inibição de progressão e desenvolvimento de neoplasias mediante a inibição da inflamação. A atividade anti-tumorigênica ocorre por meio de ligação a agentes potencialmente carcinógenos, incluindo toxinas em produtos

de origem animal e em enzimas de origem bacterianas como a beta-glucoronidase que hidrolisam compostos pre-carcinogenicos⁵.

Polissacarídeos extraídos de probióticos como as β -glucanas, que se diferenciam pelo tipo de ligação presente entre as unidades de glicose, são constituintes estruturais da parede celular de fungos, alguns cereais e leveduras como o *Saccharomyces cerevisiae*⁶. É um biomodulador que apresenta habilidade para deprimir respostas pró-inflamatórias associadas à septicemia bacteriana. Essa ação dá-se por meio da remoção de óxido nítrico e células produtoras de citocinas do tipo TNF- α , IL-1 e IL-6 dos locais de inflamação e pelo aumento das concentrações de mediadores anti-inflamatórios, como IL-10 e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1)⁷.

Em camundongos suplementados diariamente com β -glucana por via oral foi observado que ocorreu aumento no número de linfócitos intra-epiteliais no intestino, sugerindo ser esta um importante estimulador de imunidade de mucosa do trato gastrointestinal⁸.

Adicionalmente, a arginina é um aminoácido classificado como quase essencial e está presente em um importante número de processos biológicos e fisiológicos. Este é sintetizado primariamente no rim por meio do ciclo da ureia, além de desintoxicar amônia também facilita a excreção de nitrogênio. A ornitina é um metabolito da arginina e está envolvido na síntese de poliaminas, que são importante para a divisão celular. Entre as funções da arginina, em sua segunda via metabólica ela é responsável pela produção de óxido nítrico. Durante o estresse e as reações imunológicas o óxido nítrico é liberado em grande quantidade, envolvendo-se na imunidade não específica e na fisiopatologia de choque séptico, inflamação e outros estados hiperdinâmicos. O óxido nítrico media os efeitos citotóxicos dos macrófagos sobre microorganismos, parasitas e tumores⁹.

Desta maneira, a suplementação com polissacarídeos pode auxiliar na prevenção do desenvolvimento do câncer por sua habilidade evitar danos no DNA¹⁰.

Em pacientes com câncer o sistema imunológico frequentemente apresenta-se comprometido, podendo ocorrer o desenvolvimento de anemia de causa multifatorial, seja por deficiência absoluta ou relativa de ferro, ou por

sangramentos causados pelas neoplasias. Assim, pacientes com câncer podem apresentar também deficiência funcional de ferro, secundária a sua retenção pelos macrófagos com conseqüente diminuição de ferro para eritropoiese, apesar da biodisponibilidade no sistema mononuclear fagocitário. Os pacientes tratados com quimioterapia normalmente aumentam a produção de citocinas inflamatórias, como a IL6, que é capaz de elevar as concentrações de hepcidina, uma proteína de fase aguda considerada a principal responsável pela deficiência funcional do ferro. Nestes casos a administração de ferro ao paciente com câncer deve ser considerada após a avaliação dos níveis de ferritina e do índice de saturação da transferrina (IST)¹¹.

O ferro é um mineral vital para a homeostasia celular e essencial para o transporte de oxigênio, em função da síntese de DNA e metabolismo energético. Nos mamíferos é utilizado principalmente na síntese de hemoglobina (Hb) situado nos eritroblastos, da mioglobina nos músculos e dos citocromos do fígado¹².

O fígado como um órgão complexo desempenha um papel central no metabolismo e armazenamento do ferro (Fe) essencial ao organismo, além de ser responsável pela síntese de proteínas plasmáticas tais como transferrina (Tf) e a ceruloplasmina (Cp). Assim, o armazenamento do ferro ocorre sob a forma de ligação com a ferritina e hemossiderina, bem como o transporte no plasma ocorre por meio da ferroportina ¹³.

A ferritina principal fonte de armazenamento de ferro no meio intracelular, principalmente nos hepatócitos, sendo, portanto a melhor indicação de conteúdo total de ferro no organismo saudável. Trata-se de uma proteína de fase aguda (PFA) que aumenta seus níveis com a inflamação. Na circulação o ferro está ligado à proteína de transporte transferrina, que pode estar aumentada frente à deficiência de ferro¹³.

A transferrina é uma glicoproteína carreadora de ferro para o organismo, associada à resposta imunológica inata. Esta é uma proteína de fase aguda negativa, portanto suas concentrações plasmáticas reduzem na inflamação^{14,15}. Por outro lado, a transferrina representa um mecanismo de proteção contra o ferro livre presente no plasma, que poderia ser extremamente tóxico as células. Esta ação protetora depende de dois fatores da transferrina: sua

alta afinidade ao Fe^{3+} e as moléculas de transferrina apresentarem dois sítios de ligação ao ferro que depende das condições de saturação da transferrina¹⁶.

Para uma avaliação dos riscos de câncer, o IST foi utilizado com base em uma meta-análise populacional realizada durante o período de 15 anos, em humanos de ambos os sexos. Observou-se que em indivíduos com genótipo para hemocromatose, o IST elevado estava associado ao aumento do risco de câncer¹⁷.

A elevação do IST e do aumento do estoque do ferro corporal, com o risco de câncer também foi considerada em uma população de pessoas com idade entre 25 e 75 anos. Indivíduos que apresentaram IST acima de 41%, considerado como normal, porém recebendo dieta rica em ferro apresentaram risco de câncer. Por outro lado, aqueles indivíduos que apresentaram elevado IST com ingestão normal de ferro, não apresentaram risco de câncer¹⁸.

Em relação a estes parâmetros como avaliador do risco de câncer a ferritina funciona como protetora do organismo, sobretudo dos efeitos tóxicos do ferro e por se tratar de uma PFA positiva que se eleva em condições de inflamação, doenças degenerativas e câncer. Nas neoplasias, principalmente a mamária, o ferro pode induzir estresse oxidativo e danos no DNA. Mulheres com neoplasia mamária mostraram que o excesso de ferro é potencialmente carcinogênico. O produto final resultante da liberação do íon férrico pela ferritina e hemosiderina é um radical hidroxil, este com capacidade de promover peroxidação lipídica e com isso induzir a mutagênese, quebra nos filamentos de DNA, ativação de oncogêneses, inibição do gene de supressão tumoral e por fim o câncer de mama¹⁹.

A análise dos parâmetros de metabolismo do ferro, bem como os efeitos da suplementação com imunomodulador em cadelas com neoplasia mamária maligna e tratadas com quimioterapia, constituiu-se como objetivo desse trabalho. Além de reforçar o uso destes parâmetros como ferramentas fundamentais na oncologia clínica veterinária para a correta utilização de terapias anti-anêmicas.

2 Material e métodos

2.1 Delineamento experimental

No Setor de Oncologia do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (HV/EVZ/UFG) foram selecionadas 16 pacientes dentro de uma população de 50 cadelas.

Os proprietários que aceitaram participar do estudo assinaram o termo de anuência. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, sob o número 221/11.

Os animais selecionados após exame clínico rigoroso, obedeceram aos seguintes critérios de inclusão: a presença de nódulos mamários não ulcerados de diâmetro inferior a 5cm, inexistência de doenças infecto contagiosas constatadas em exames laboratoriais e metástases não detectadas nos exames radiográfico de tórax e ultrassonográfico de abdômen.

Os fragmentos dos tumores foram submetidos a exame histopatológico²⁰ após procedimento cirúrgico de mastectomia total²¹.

Para a composição de dois grupos experimentais os animais foram aleatoriamente distribuídos. Aos proprietários do grupo suplementado (S) foi instituída a adição na dieta o suplemento Promun dog® (Grupo Organnact, Curitiba, Paraná - Níveis de garantia - aditivo flavorizante 13 g/kg, lisina (min)13,8 g/kg, mananoligossacarídeos 64,7 g/kg, metionina 49 g/kg, proteína bruta (min) 200 g/kg, *Saccharomyces cerevisiae* (min) 1×10^8 UFC/g, treonina (min) 9.202 mg/kg, triptofano 3.200 mg/kg, vitamina E (min) 1.050 UI/kg, na dose de dois tabletes para cada 10kg de peso vivo, em intervalos de 24h e pela via oral. O grupo não suplementado (NS) recebeu a dieta fornecida pelo proprietário

A composição dos grupos caracterizou-se da seguinte forma: grupo suplementado (S) n=8, idade $8,88 \pm 3,64$, peso $13,71 \pm 11,38$, tipo histológico [carcinoma sólido de mama (n=1), carcinoma túbulo papilar (n=1), carcinoma tubular (n=1), carcinoma complexo de mama (n=2), e carcinossarcoma de mama (n=3)]; grupo não suplementado (NS) n=8, idade $9,00 \pm 1,31$, peso $7,33 \pm 2,63$, tipo

histológico [carcinoma túbulo papilar (n=1), carcinoma em tumor misto/papilar (n=1), carcinoma sólido de mama (n=2), carcinoma complexo de mama (n=2), e carcinosarcoma de mama (n=2)].

Após a realização do exame histopatológico foi estabelecido o estadiamento clínico e o protocolo quimioterápico²².

A quimioterapia com doxorrubicina e carboplatina foi realizada alternadamente em oito ciclos consecutivos em intervalos de 21 dias, sendo a primeira a doxorrubicina, em todos os momentos foram feitas avaliações laboratoriais (hemograma completo, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, gama glutamiltransferase, albumina, uréia, creatinina, bilirrubina total e bilirrubina direta).

2.2 Protocolo quimioterápico

Para este estudo o protocolo quimioterápico estabelecido as cadelas foi o AP-1, descrito por Lanore e Delprat²³. Alternadamente foi aplicado 30mg/m² doxorrubicina (Fauldoxo[®], Libbs Farmaceutica Ltda) e 300mg/m² carboplatina, (Fauldocarbo[®], Libbs Farmaceutica Ltda). Os quimioterápicos foram diluídos em 100mL de solução salina a 0,9% e aplicados em perfusão lenta na veia cefálica com auxílio de cateter de 22G. Para induzir diurese as pacientes receberam 2mg/kg de furosemida por via intravenosa e 2mg/kg de difenidramina por via intramuscular, aplicada antes do início da administração de doxorrubicina. Em seguida, administrou-se mais 100mL de solução salina a 0,9%, com intuito de eliminar resquícios do quimioterápico no vaso puncionado para evitar lesão vascular.

O tempo transcorrido entre a preparação do paciente e administração do quimioterápico foi de duas horas e previamente a cada sessão de quimioterapia as cadelas foram reavaliadas por meio do exame clínico e peso corporal.

2.3 Avaliações laboratoriais

A colheita do sangue para a avaliação laboratorial do metabolismo do ferro ocorreu com os animais em jejum alimentar de 12 horas. Foram obtidos 8,0mL de sangue por venopunção jugular, em tubo sem anticoagulante, que foi centrifugado após retração do coágulo e, em seguida, o soro foi separado por aspiração, sendo divididos em alíquotas em microtubos de polipropileno de 1,5mL (Eppendorf®) e submetidos ao congelamento (-20°C) até o momento da realização dos exames.

As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da EVZ/UFG. O ferro foi determinado utilizando reagente comercial padronizado (Labtest® - Labtest Diagnóstica S. A., Lagoa Santa, MG), em temperatura de 37°C, sendo a leitura realizada em analisador bioquímico automático (Cobas Mira Plus® fabricado pela Roche, Jacarepaguá, Rio de Janeiro). A ferritina foi determinada por turbidimetria, utilizando o reagente específico Ferritina Turbiquest Labtest®, e a leitura feita no aparelho Cobas Mira PlusRoche®.

A transferrina foi quantificada no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV/UNESP/Campus de Jaboticabal/SP. A separação das frações protéicas foi realizada utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS PAGE) segundo técnica descrita por Laemmli²⁴. A mensuração das frações protéicas foi determinada em densitômetro computadorizado (Shimadzu, Tóquio, Japão). Foram ainda empregadas a solução marcadora Sigma, Saint Louis, EUA com pesos moleculares de 29.000, 45.000, 66.000, 97.000, 97.400, 116.000 e 205.000 dáltons (D), além da proteína purificada transferrina.

2.4 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado estruturado em parcelas subdivididas, considerando como tratamentos principais os grupos S e NS.

Para a análise dos dados primeiramente realizou-se a estatística descritiva dos dados, obtendo-se as medianas, médias, intervalo de confiança, desvio padrão, calculou-se em seguida o coeficiente de variação para determinar a instabilidade relativa de cada um dos parâmetros avaliados. Como as variáveis mostraram-se não homogêneas e a distribuição não obedeceu à normalidade, optou-se então pela utilização do teste não paramétrico de Kruskal Wallis. A significância estatística adotada foi $\leq 0,05\%$.

Aos valores de peso corporal inicial e final das cadelas foi aplicado o teste T pareado, com $p \leq 0,05\%$.

3 Resultados

Neste estudo, as cadelas do grupo suplementado com imunoestimulante apresentaram condições clínicas melhores que àquelas observadas no grupo não suplementado. Não foi observada anemia nas cadelas dos dois grupos.

O peso corporal das cadelas suplementadas foi crescente do início (13,71±11,38kg) ao final do estudo (15,71±12,48kg) e apresentou-se estatisticamente significativo (pelo teste T pareado $p \leq 0.002$). De outra maneira, no grupo não suplementado o peso decresceu de 7,33±2,63 para 5,90±2,03, também apresentando significativamente diferente ($p \leq 0.002$) (Tabela 1).

TABELA 1 – Média e desvio padrão (DP) do peso corporal inicial e final (Kg), das cadelas com neoplasia mamária maligna submetidas à quimioterapia* e suplementadas e não suplementadas com Promun dog® **. Goiânia, Goiás, 2014.

Animal	Suplementadas		Não suplementadas	
	Peso inicial	Peso final	Peso inicial	Peso final
1	9,4	11,0	8,1	7,5
2	5,9	6,4	8,65	7,1
3	8,4	NA	10,3	7,3
4	31,3	33,3	6,3	5,0
5	8,1	8,9	6,2	5,0
6	3,8	4,4	3,3	2,6
7	35,0	37	11,4	9,0
8	7,7	9,0	4,3	3,7
Média	13,7 ^a	15,7 ^b	7,3 ^a	5,9 ^b
Desvio-padrão	11,4	12,5	2,6	2,0

Letras diferentes informam sobre a diferença pelo Teste de T pareado ($P \leq 0,05$)

NA amostra não analisada, óbito por atropelamento.

* Doxorubicina, carboplatina

** Aditivo flavorizante 13 g/kg, lisina (min) 13,8 g/kg, mananoligossacarídeos 64,7 g/kg, metionina 49 g/kg, proteína bruta (min) 200 g/kg, Saccharomyces cerevisiae (min) 1×10^8 UFC/g, treonina (min) 9.202 mg/kg, triptofano 3.200 mg/kg, vitamina E (min) 1.050 UI/kg

Não se constatou diferença significativa entre as concentrações séricas de ferro ($p \geq 0,05$) em nenhum dos momentos, todavia, estes situaram-se acima da faixa de normalidade para a espécie, em ambos os grupos, na maioria dos momentos avaliados (Tabela 2).

Os valores medianos para o índice de saturação da transferrina (IST) não diferiram estatisticamente ($p \geq 0,05$) entre os grupos suplementados (S) e não suplementados (NS) e estiveram, na maioria dos momentos avaliados, dentro dos limites normais para a espécie (Tabela 2).

Em relação à transferrina os valores medianos encontrados não apresentaram diferença estatística significativa ($p \geq 0,05$) entre os grupos e foram inferiores aos observados em cães saudáveis (Tabela 3).

A avaliação das concentrações da ferritina revelou que, em quase todos os momentos, os cães suplementados apresentaram valores inferiores aos não suplementados (Tabela 3), com diferença significativa entre os grupos no momento M105 ($p \leq 0,02$).

TABELA 2 – Média e desvio padrão (DP), mediana, intervalo de confiança (IC) e coeficiente de variação (CV) das concentrações séricas ferro (Fe - µg/dL) e índice de saturação da transferrina (IST - %) em cadelas com neoplasia mamária maligna tratadas com quimioterapia* e suplementadas (S) e não suplementadas (NS) com Promun dog® **. Goiânia, Goiás, 2014.

Momentos/Variável	Média±DP		Mediana		Valor de P*	IC		CV		
	S	NS	S	NS		S	NS	S	NS	
M0	Fe	162,24±54,05	178,60±46,03	169,00	185,00	0,54	37,46	31,90	33,32	25,78
	IST	28,32±12,17	37,67±13,36	27,00	39,28	0,12	8,44	9,26	42,98	35,47
M21	Fe	152,34±66,95	201,63±74,61	183,50	185,20	0,46	46,39	51,70	43,94	37,00
	IST	22,57±18,02	36,65±16,57	16,64	40,90	0,11	12,49	11,48	79,85	45,20
M42	Fe	189,91±71,14	241,13±53,60	158,00	235,95	0,25	49,30	37,15	37,46	22,23
	IST	33,36±20,91	38,88±11,48	31,94	39,65	0,30	14,49	7,96	62,66	29,53
M63	Fe	133,71±77,35	279,51±144,47	99,22	286,00	0,11	53,60	100,11	57,85	51,69
	IST	36,73±18,42	41,23±16,22	38,83	43,70	0,10	12,76	11,24	50,14	39,34
M84	Fe	228,69±48,64	221,93±82,29	223,80	197,35	0,40	33,71	57,02	21,27	37,08
	IST	44,73±9,69	35,94±16,84	46,16	34,58	0,22	6,72	11,67	21,67	46,87
M105	Fe	179,55±91,87	199,70±115,79	203,65	185,00	0,56	63,66	80,24	51,16	57,98
	IST	36,21±19,17	27,94±19,60	38,75	21,57	0,11	13,28	13,58	52,94	70,17
M126	Fe	185,16±71,26	247,37±106,06	184,00	246,20	0,34	49,38	73,49	38,49	42,87
	IST	40,90±16,79	55,07±14,31	43,07	50,80	0,33	11,63	9,91	41,05	25,98
M147	Fe	231,72±151,70	211,91±100,45	235,20	218,90	0,06	35,83	69,61	22,31	47,40
	IST	50,20±23,62	46,00±20,17	48,98	42,72	0,23	16,37	13,98	47,06	43,85
M168	Fe	187,19±36,30	178,56±95,21	180,00	152,00	0,42	25,15	65,97	19,39	53,32
	IST	41,66±11,25	37,73±21,19	43,17	41,18	0,11	7,80	14,68	27,01	56,16

* Doxorubicina, carboplatina

** Aditivo flavorizante 13 g/kg, lisina (min)13,8 g/kg, mananoligossacarídeos 64,7 g/kg, metionina 49 g/kg, proteína bruta (min) 200 g/kg, Saccharomyces cerevisiae (min) 1x10⁸ UFC/g, treonina (min) 9.202 mg/kg, triptofano 3.200 mg/kg, vitamina E (min) 1.050 UI/kg***

Teste de Kruskal-Wallis (P≤0,05)

TABELA 3 – Média e desvio padrão (DP), mediana, intervalo de confiança (IC) e coeficiente de variação (CV) das concentrações séricas de transferrina (Tf - mg/dL) e ferritina (FT - ng/mL) em cadelas com neoplasia mamária maligna tratadas com quimioterapia* e suplementadas (S) e não suplementadas (NS) com Promun dog® **. Goiânia, Goiás, 2014.

Momentos/Variável	Média±DP		Mediana		Valor de P*	IC		CV		
	S	NS	S	NS		S	NS	S	NS	
M0	Tf	213,62±106,01	216,08±102,61	189,18	202,29	0,92	73,46	71,10	49,63	47,49
	FT	65,96±36,84	93,67±51,85	59,45	88,60	0,21	25,53	35,93	55,85	55,35
M21	Tf	237,80±73,88	193,67±117,89	216,62	209,52	0,67	51,20	81,69	31,07	60,87
	FT	54,23±18,50	80,17±36,66	57,60	78,60	0,25	12,82	25,41	34,12	45,73
M42	Tf	190,24±68,90	160,36±160,36	175,27	124,91	0,60	47,74	35,34	36,22	31,80
	FT	108,33±131,67	83,26±31,27	49,05	67,40	0,21	91,24	21,67	121,55	37,55
M63	Tf	188,15±70,24	192,76±89,56	191,79	161,26	0,67	48,67	62,06	37,33	46,46
	FT	102,81±53,32	95,07±50,35	92,80	75,90	0,60	36,95	34,89	51,87	52,96
M84	Tf	169,96±66,91	188,15±77,88	161,96	160,44	0,83	46,37	53,96	39,37	41,39
	FT	100,11±115,49	141,16±136,21	65,60	105,30	0,19	80,03	94,39	115,36	96,50
M105	Tf	191,28±78,97	159,06±23,82	173,86	164,62	0,92	54,72	16,51	41,29	14,98
	FT	45,58±28,16	91,54±49,95	38,40 ^b	76,05 ^a	0,02	19,51	34,61	61,78	54,56
M126	Tf	160,14±86,40	231,66±95,59	168,72	231,11	0,83	59,87	66,24	53,95	41,26
	FT	40,90±31,93	102,28±84,43	48,50	60,90	0,83	22,13	58,50	47,80	82,55
M147	Tf	177,62±46,71	174,03±63,59	191,25	161,75	0,60	32,37	44,07	26,30	36,54
	FT	77,30±47,78	135,20±92,73	45,40	133,75	0,83	33,11	64,26	61,81	68,59
M168	Tf	132,67±56,50	224,99±126,86	116,72	178,53	0,40	39,15	87,91	42,59	56,38
	FT	72,12±31,29	75,66±37,34	67,80	64,90	0,40	21,68	25,88	43,39	49,36

* Doxorubicina, carboplatina

** Aditivo flavorizante 13 g/kg, lisina (min)13,8 g/kg, mananoligossacarídeos 64,7 g/kg, metionina 49 g/kg, proteína bruta (min) 200 g/kg, Saccharomyces cerevisiae (min) 1x10⁸ UFC/g, treonina (min) 9.202 mg/kg, triptofano 3.200 mg/kg, vitamina E (min) 1.050 UI/kg

*** Teste de Kruskal-Wallis (P≤0,05)

Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis

4 Discussão

Neste estudo a melhor condição clínica, bem como o ganho de peso apresentada pelas cadelas do grupo suplementado com imunoestimulante pode estar relacionada com a capacidade de o mesmo prevenir e minimizar os efeitos deletérios do câncer²⁵.

Os resultados obtidos para as concentrações médias de ferro neste trabalho foram para os dois grupos, na maioria dos momentos, superiores aos descritos como parâmetros de normalidade para cães por Jain et al.²⁶ [55,6 a 117,2 µg/dL], Pires et al.²⁷ [134,0 a 174,6 µg/dL] e Caro et al.²⁸ [125,5 a 144,5 µg/dL]. As maiores medianas foram observadas no grupo não suplementado. A elevação do valor sérico de ferro nos cães deste estudo pode estar relacionada ao uso da doxorubicina, que tem como princípio ativo o antibiótico adriamicina. Conforme Muraoka e Miura²⁹ a adriamicina é de elevada eficácia antitumoral, porém têm sua utilização limitada por apresentar toxicidade cardíaca, renal, hematológica e testicular. Esta toxicidade está associada a danos no DNA, inibição da topoisomerase, sequestro de ferro e subsequente geração de radicais livres. Extratos de adriamicina retiram ferro da ferritina, formando adriamicina-Fe³⁺ (ADR-Fe³⁺) responsáveis por injúria mitocondrial. Contudo, a superoxidase dismutase e os radicais hidroxil responsáveis pela inibição da atividade citotóxica não são efetivos. O efeito da doxorubicina elevando os valores séricos de ferro é reafirmado por Ai-Harbil et al.³⁰ ao descreverem o efeito protetor do quelante de ferro desferrioxamina, usado clinicamente para prevenir os efeitos tóxicos cardíacos e hematológicos do fármaco.

O IST dos cães deste estudo estiveram muito próximos dos valores observados em cães saudáveis por Pires et al.²⁷ [36,6% a 46,1%] e Caro et al.²⁸ [26,1% a 31,5%], o que é esperado uma vez que os cães deste estudo não apresentaram anemia ao longo do período acompanhado. É importante a avaliação do IST no câncer, uma vez que na anemia da inflamação é esperado redução deste índice³¹. Por outro lado, Mainous et al.¹⁸ e Ellervik et al.¹⁷ observaram relação da elevação do IST e do aumento do estoque do ferro corporal, com o risco de câncer em populações humanas.

Os valores de transferrina observados nas cadelas deste estudo, independente da suplementação com imunoestimulante foram inferiores aos observados em cães saudáveis (Vieira et al.³² - 190,0 a 230,0 mg/dL / Pires et al.²⁷ a 241,7 a 291,1 mg/dL e Nakajim et al.³³ – 180 mg/dL). As menores concentrações de transferrina no soro das cadelas do estudo são o resultado do processo inflamatório associado à neoplasia, pois já está bem estabelecido que a transferrina é uma proteína de fase aguda negativa e seus valores decrescem frente a diversos processos mórbidos^{14,34}.

A mensuração de ferritina sérica das cadelas deste estudo indicou resultados dentro dos valores de normalidade citados por Jain et al.²⁶, que situam-se entre 36 a 117 mg/dL. A suplementação com imunoestimulante mostrou efeito benéfico, uma vez que os animais suplementados apresentaram valores inferiores aos não suplementados, inclusive com diferença significativa entre os grupos em um dos momentos. As concentrações mais elevadas não são desejáveis, pois como PFA positiva, sua concentração eleva-se em resposta a infecções, traumatismos, inflamações agudas, neoplasias, anemias hemolíticas e nas lesões hepáticas³⁵. Entre os efeitos benéficos da suplementação estão as funções imunomoduladoras da β -glucana, extraída a partir do *Saccharomyces cerevisia*^{7,8}.

A avaliação criteriosa dos níveis séricos de ferro, ferritina, IST e transferrina em pacientes com câncer, principalmente o de mama se faz necessário porque estes pacientes geralmente apresentam anemia. De acordo com Steegmann-Olmedillas³⁶ o tratamento de anemia com ferro tem sérias desvantagens, por se tratar de um metal utilizado como nutriente por uma diversidade de microrganismos e inibir a atividade do interferon gama (IFN γ), assim prejudicando a resposta imune. Além, de o ferro promover reações oxidativas, formando radicais livres de oxigênio, os quais causam significativos danos teciduais e aumentam o risco de desenvolvimento de novos tumores. Por todas estas razões, a suplementação com ferro não deve ser usada em pacientes sem a real deficiência de ferro.

O ferro em condições basais é um componente essencial para a formação dos constituintes orgânicos, entretanto o excesso do mesmo é danoso, citotóxico e oncogênico. O desconhecimento do metabolismo do ferro com todos

os seus constituintes pode trazer conseqüências na maioria das vezes irreversíveis. Assim, as proteínas envolvidas no metabolismo do ferro e os elementos associados a estes devem ser avaliados pelo oncologista clínico veterinário ao utilizarem parâmetros de dosagem sérica de ferro, transferrina, índice de saturação do ferro e ferritina como ferramentas auxiliares no estabelecimento do diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer.

5 Conclusão

Cadelas com neoplasia mamária, submetidas à quimioterapia apresentam elevadas concentrações séricas de ferro.

A transferrina é uma proteína de fase aguda negativa que pode ser usada para o diagnóstico e acompanhamento clínico da neoplasia mamária em cadelas submetidas à quimioterapia.

A suplementação com imunoestimulante, em cadelas com neoplasia mamária produz leve efeito na modulação da atividade inflamatória, caracterizada por redução na proteína de fase aguda positiva ferritina.

Referências

1. Kuroda Y, Hara Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutat Res.* 1999, 436:69-97.
2. Klemashevich C, Wu C, Howsmon D, Calaniz R, Lee K, Jayaraman A. Rational identification of diet-derived postbiotics for improving intestinal microbiota function. *Curr Opin Biotechnol.* 2014, 26:85-90.
3. Mombelli B, Gismondo MR. The use of probiotics in medical practice. *Int J Antimicrob Agents.* 2000, 16:531-6.
4. Al-Sheraji SH, Ismail A, Manap MY, Mustafa S, Yusof RM, Hassan FA. Prebiotics as functional foods: A review. *J Funct Foods.* 2013, 5:1542-53.
5. Geier MS, Butler RN, Howarth GS. Probiotics, prebiotics and synbiotics: a role in chemoprevention for colorectal cancer? *Cancer Biol Ther.* 2006, 5(10):1265-69.
6. Magnani M, Castro-Goméz RJH. β – glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade, obtenção. *Semin Cienc Agrar.* 2007, 29(3):631-50.
7. Tzianabos AO. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: Structural aspects and biologic function. *Clin Microbiol Rev.* 2000, 134:523-33.
8. Tsukada C, Yokoyama H, Miyaji C, Ishimoto Y, Kawamura H, Abo T. Immunoprotection of intraepithelial lymphocytes in the intestine by oral administrations of β -glucan. *Cell Immunol.* 2003, 221:1-5.
9. Stechmiller JK, Childress B, Porter T. Arginine immunonutrition in critically ill patients: a clinical dilemma. *Am J Crit Care.* 2004; 13:17-23.
10. Oliveira RJ, Salles MJS, Silva AF, Kanno TYN, Lourença ACS, Leita VS, et al. In vivo evaluation of the antimutagenic and antigenotoxic effects of β -glucan

extracted from *Saccharomyces cerevisiae* in acute treatment with multiple doses. Genet Mol Biol. 2013, 36(3):413-24.

11. Calabrich AFC, Katz A. Deficiência de ferro no paciente com câncer. Rev Bras Hematol Hemoter. 2010, 32(suplem.2):95-8.
12. Grotto HZW. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. Rev Bras Hematol Hemoter. 2008, 30:390-7.
13. Anderson GJ, Frazer DM. Hepatic Iron metabolism. Semin Liver Dis. 2005, 25(4):420-32.
14. Jain S, Gautam V, Naseem S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. JPBS-Journal. 2011, 3:118-27.
15. Mackenzie EL, Iwasaki K, Tsuji Y. Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. Antioxid Redox Sign. 2008, 10:997-1.030.
16. Baker HM, Anderson BF, Baker EN. Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. Proc Natl Acad Sci U. S. A. 2003, 100:3579-83.
17. Ellervik C, Hansen AT, Nordestgaard BG. Risk of cancer by transferring saturation levels and haemochromatosis genotype: population – based study and meta-analysis. J Intern Med. 2011, 271:51-63.
18. Mainous AG, Gill JM.; Everett, C. J. Transferrin saturation, dietary iron intake, and risk of cancer. Ann Fam Med. 2005, 3(2):131-6.
19. Knovich MA, Storey JA, Coffman LG, Torti VS, Torti FM. Ferritin for the clinician. Blood rev. 2009; 23:95-104.

20. Meuten DJ. 2002. Tumors in Domestic Animals. 4^aEd. Iowa:Iowa State Press.
21. Pavletic MM. 2010. Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery. 3^aEd. Iowa:Blackwell's. 480p.
22. Misdorp W, Else RW, Hellmen E. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. AFIP. 1999; 7(1)1-69.
23. Lanore D, Delprat C. Quimioterapia anticancerígena. 2004. São Paulo:Editora Roca LTDA. 191p.
24. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227:680-5.
25. Mombelli B, Gismondo MR. The use of probiotics in medical practice. Int j antimicrob ag. 2000; 16:531-6.
26. Jain NC. Essentials of veterinary hematology. 1993. Philadelphia: Lea & Febiger. 417p.
27. Pires LSA, Dittrich RL, Souza AC, Bertol MAF, Patricio LFL. Parâmetros utilizados na avaliação do metabolismo do ferro em cães. Cienc Rural. 2011; 41(2):272-7.
28. Caro JT, Marín LM, Lazbik MC, Zaldivar-López S, Borghese H, Couto CG. Markers of iron metabolism in retired racing Greyhounds with and without osteossarcoma. Vet Clin Path. 2013; 42(3)360-3.
29. Muraoka S, Miura T. Free radicals mediate cardiac toxicity induced by adriamycin. Yakugaku Zasshi. 2003; 123(10)855-66.
30. Ai-Harbil MM, Ai-Gharably NM, Ai-Shabanahl OA, Ai-Bekairi AM, Osmanl A. MM, Tawfik HN. Prevention of doxorubicin-induced myocardial and

haematological toxicities in rats by the iron chelator desferrioxamine. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1992; 31:200-4.

31. Cançado RD, Chiattoni CS. Anemia de doença crônica. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2002; 24(2)127-136.
32. Vieira MC. Eletroforetograma de proteínas séricas em cães linfomatosos, submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin [Tese]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal; 2009. 111f.
33. Nakajim M, Ohno K, Goto-Koshino Y, Fujino Y, Tsujimoto H. Plasma transferrin concentration as a nutritional marker in malnourished dogs with nutritional treatment. *J Vet Med Sci.* Forthcoming 2013.
34. Fuhrman MP, Charney P, Mueller CM. Hepatic proteins and nutrition assessment. *J Am Diet Assoc.* 2004; 104(8)1258-64.
35. Friedrichs KR, Thomas C, Plier M, Andrews GA, Chavey PS, Young KM. Evaluation of serum ferritin as a tumor marker for canine histiocytic sarcoma. *J Vet Intern Med.* 2010; 24:904-11.
36. Steegmann-OlmedillaS JL. The role of iron in tumor cell proliferation. *Clin Transl Oncol.* 2011; 13:71-6.

CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao se tratar de uma doença crônica e multifatorial como o câncer, capaz de desencadear múltiplas reações bioquímicas com consequências danosas para os tecidos, manifestando sinais e sintomas na maioria das vezes imperceptíveis e comuns a várias outras enfermidades. Assim, se estabelece de forma definitiva, utilizando o hospedeiro como um aliado.

Desta maneira, para um profissional devidamente atento a mínima alteração nos exames de rotina no monitoramento de seu paciente, o hemograma completo e bioquímicas clínicas poderão ser ferramentas fundamentais na possibilidade de uma doença neoplásica. Pacientes com neoplasia mamária maligna apresentam atividade elevada de gama-gutamil transferase, podendo assim ser utilizada como um biomarcador. Bem como, em inflamações contínuas em consequência das reações tumorais, a mensuração de haptoglobina pode ser útil no diagnóstico e avaliação de prognóstico desta.

O ferro em condições basais é um componente essencial para a formação dos constituintes orgânicos, entretanto o excesso do mesmo é danoso, citotóxico e oncogênico. Portanto, o desconhecimento do metabolismo do ferro com todos os seus constituintes pode trazer consequências na maioria das vezes irreversíveis.

Outro aspecto importante são os parâmetros de metabolismo do ferro e os elementos associados a este, que devem ser avaliados pelo oncologista clínico veterinário que auxiliam no monitoramento do paciente com câncer.

Atualmente tem se realizado pesquisas que busquem contribuir na melhor qualidade de vida de animais de estimação, como o uso de imunoestimulante na forma de suplementação alimentar como adjuvante ao tratamento de quimioterápicos. Além, de ter demonstrado efeitos benéficos principalmente durante o período de tratamento, contribui para uma sobrevida maior nestes pacientes.

Novas pesquisas objetivando o bem estar animal é cada vez mais comum no universo científico, as exigências da comunidade no sentido de um mínimo de sofrimento àquele animal que estará sendo objeto de uma determinada

pesquisa, é o maior desafio dessa nova era da ciência, mais tecnológica, mais virtual e nem por isso menos real.

Entretanto, as doenças insidiosas, como o câncer, são capazes de perpetuarem-se apesar de toda evolução.