



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VINICIUS AQUILES GOMES ZAMBONI

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO SÉRICO E
TECIDUAL EM CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA.**

Londrina
2022

VINICIUS AQUILES GOMES ZAMBONI

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO SÉRICO E
TECIDUAL EM CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias do Departamento de Clínicas Veterinárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Giovana Wingeter Di Santis

Londrina
2022

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

ZAMBONI, Vinicius Aquiles Gomes.

Avaliação do estresse oxidativo sérico e tecidual em cadelas com neoplasia mamária. / Vinicius Aquiles Gomes ZAMBONI. - Londrina, 2022.
62 f.

Orientador: Giovana Wingeter Di Santis.

Coorientador: Breno Fernando Martins de Almeida.

Dissertação (Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Clínicas Veterinárias, 2022.

Inclui bibliografia.

1. tumor de mama - Tese. 2. neoplasia - Tese. 3. antioxidantes - Tese. 4. oxidantes - Tese. I. Di Santis, Giovana Wingeter . II. Almeida, Breno Fernando Martins de . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Clínicas Veterinárias. IV. Título.

CDU 619

VINICIUS AQUILES GOMES ZAMBONI

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO SÉRICO E
TECIDUAL EM CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias do Departamento de Clínicas Veterinárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Giovana Wingeter Di
Santis
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Ana Paula F. R. Loureiro
Bracarense
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Nazilton de Paula Reis Filho
Neopet Oncologia Veterinária

Londrina, 23 de fevereiro de 2022

Aos meus pais Paulo e Rosangela Zamboni, e a minha querida avó Irene Menegale Zamboni, que não mediram esforços na minha formação, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A presente dissertação de mestrado não poderia chegar ao final sem o precioso apoio de várias pessoas, fundamentais para a sua realização.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a minha orientadora, Profa. Dra. Giovana Wingeter Di Santis, por aceitar o desafio de me orientar na área de anatomia patológica e desenvolver uma pesquisa multidisciplinar, envolvendo também as áreas de clínica médica e patologia clínica. Obrigado pela sua disponibilidade, mesmo em período de férias, e pelo incentivo que foram fundamentais para realizar e prosseguir este estudo.

O meu enorme agradecimento ao meu coorientador Prof. Dr. Breno Fernando Martins de Almeida, grande pesquisador, amigo e uma pessoa extraordinária, que nunca poupou esforços para me incentivar e auxiliar no desenvolvimento deste projeto. Nesse momento obscuro e negacionista do país, nunca se precisou tanto de incentivadores da ciência e pesquisa. Sua contribuição, como de tantos outros cientistas, é essencial para o Brasil, e a resiliência é a característica fundamental que os pesquisadores brasileiros têm demonstrado. O meu sincero obrigado, sem você esse trabalho nunca seria concretizado.

A maravilhosa equipe de professores, residentes e funcionários, do Hospital Veterinário “Roque Quagliato” do Centro Universitário UniFio em Ourinhos, meu local de formação, extensão do meu lar, e que tenho o orgulho hoje de fazer parte dessa equipe fantástica, o meu muito obrigado. Em especial aos grandes amigos e Professores Marcos Cezar Sant'Anna, Freddi Bardela de Souza e Caio José Xavier Abimussi, que me auxiliaram e estimularam em todo o longo percurso. Todos foram fundamentais para a execução deste projeto, e sem vocês nada disso seria possível.

O meu sincero agradecimento ao Prof. Dr. Ademir Zacarias Júnior, diretor e responsável pelo serviço de clínica cirúrgica de pequenos animais do Hospital Veterinário Escola da Universidade do Norte do Paraná, por auxiliar no meu projeto de pesquisa. Não poderia de agradecer a todos os residentes e funcionários do HVE-UENP, em especial a residente Marcela Fernanda Moretti, que se dedicou para a cirurgia e coleta de amostras dos pacientes deste estudo, tornando possível a realização desse projeto.

A professora Dra. Valéria Marçal Felix de Lima responsável pelo laboratório de imunologia da Unesp de Araçatuba, por abrir as portas do laboratório para eu realizar

parte fundamental do meu projeto de pesquisa. Agradeço também a todos os pós-graduandos do laboratório de imunologia, que nesse período por me ajudaram de qualquer forma. O meu sincero obrigado a todos.

Meu verdadeiro agradecimento a todos os residentes e funcionários do Laboratório de Patologia Animal da Universidade Estadual de Londrina, em especial ao residente Felipe Martins Negreiros Navolar, que foi fundamental para processar um enorme volume de amostras de tecidos mamários e tornar possível em tão pouco tempo a realização desse estudo.

Desejo igualmente agradecer a todos os meus colegas do Mestrado em Clínicas Veterinárias, cujo apoio esteve presente em todos os momentos nesse caminho árduo. Em especial gostaria de agradecer ao grande amigo Allison Maldonado, ingressamos juntos no Mestrado e foi um grande parceiro nesse período, percorrendo lado a lado todas as dificuldades, mas sempre com bom humor.

Gostaria de agradecer aos membros da banca de defesa, Profa. Dra. Ana Paula F. R. Loureiro Bracarense e Prof. Dr. Nazilton de Paula Reis Filho, e da banca de qualificação Profa. Dra. Karina Keller Marques da Costa Flaiban e Prof. Dr. Fábio Nelson Gava, que muito acrescentaram ao trabalho, o meu sincero agradecimento.

Em especial, gostaria de agradecer a minha companheira e namorada Marcela Fernanda Moretti, obrigado pelas conversas, pela atenção, pelos conselhos, pelo elogio que só vem de quem ama e, principalmente, por se importar comigo.

Por fim gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação, o meu muito obrigado a todos.

“A vida não é encontrada em átomos ou moléculas ou genes como tal, mas na organização; Não na simbiose, mas na síntese.”

(Edwin Conklin)

ZAMBONI, Vinicius Aquiles Gomes. **Avaliação do estresse oxidativo sérico e tecidual em cadelas com neoplasia mamária**. 2022. 62 p. Dissertação. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

As neoplasias mamárias são os tumores mais frequentes que acometem as cadelas. São enfermidades complexas que envolvem diversas alterações genéticas e bioquímicas, sistêmicas e no microambiente tumoral, e estresse oxidativo. As espécies reativas de oxigênio podem promover danos às macromoléculas celulares críticas, incluindo DNA, lipídios e proteínas, participando da oncogênese e da diferenciação celular. O objetivo deste trabalho foi avaliar o estresse oxidativo, sistêmico e tecidual, em cadelas com neoplasia mamária. Foram incluídas 26 cadelas portadoras de tumor de mama e oito saudáveis (grupo controle). Todas as amostras de tecido mamário foram submetidas ao exame histopatológico. Dessas, foram utilizadas amostras teciduais de 22 neoplasias malignas e sete neoplasias benignas, além de 26 amostras de glândulas mamárias não neoplásicas e saudáveis, de pacientes com neoplasia mamária, e oito amostras de tecido mamário saudável, do grupo controle. Para avaliação do estresse oxidativo, foi determinado do soro e do homogeneizado de tecido mamário, a capacidade antioxidante total (CAT), pela redução do cátion ABTS sozinho (CAT-ABTS) ou associado à peroxidase (CAT-ABTS+HRP), redução cúprica (CAT-CUPRAC) e redução férrica (CAT-FRAP), e pela capacidade oxidante total (COT) e peroxidação lipídica (TBARS), e o antioxidante ácido úrico. Para verificar as diferenças nas dosagens séricas entre os grupos controle e neoplasia maligna, foi utilizado teste de t não pareado ou Mann-Whitney, quando $p < 0,05$. Para verificar as diferenças nas dosagens teciduais entre todos os grupos, foi utilizado o teste ANOVA e pós-teste de Tukey ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn quando, $p < 0,05$. No presente estudo, os animais com neoplasias mamárias malignas apresentam estresse oxidativo sérico e tecidual. No âmbito sistêmico houve redução da CAT, e aumento de oxidantes associado à peroxidação lipídica. Enquanto no tecido mamário neoplásico e normal, dos animais portadores de tumores mamários, houve aumento de antioxidantes e redução dos oxidantes, sem diferença na peroxidação lipídica.

Palavras-chave: tumor de mama, neoplasia, antioxidantes, oxidantes, cães.

ZAMBONI, Vinicius Aquiles Gomes. **Evaluation of serum and tissue oxidative stress in bitches with mammary neoplasia**. 2022. 62 p. Dissertation. State University of Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Mammary neoplasms are the most frequent tumors that affect female dogs. These tumors are complex diseases that involve several genetic, biochemical, systemic and tumor microenvironmental changes, and oxidative stress. Reactive oxygen species can induce damage to critical macromolecules, including DNA, lipids and proteins, thus participating in oncogenesis and cell differentiation. The objective of this study was to assess both plasma and tissue oxidative stress in bitches with mammary tumors. Twenty-six bitches with mammary tumors and eight healthy female dogs (control group) were included. Every breast tissue sample was subjected to histopathological examination. Of these, tissue samples from 22 malignant neoplasms and seven benign neoplasms were used, in addition to 26 samples of non-neoplastic breast cells from patients with breast cancer, and eight samples of healthy breast tissue for the control group. To assess oxidative capacity, total antioxidant (TAC) was determined through reduction of the ABTS cation alone (TAC-ABTS) or associated with peroxidase (TAC-ABTS+HRP), copper reduction (TAC-CUPRAC) and ferric reduction (TAC-FRAP), and total oxidizing capacity (TOC) and lipid peroxidation (TBARS), and the uric antioxidant were determined on serum and breast tissue homogenate. To verify the differences in serum levels between the control and malignant neoplasm groups, data were analyzed using unpaired t test or Mann-Whitney test, with $p < 0.05$. To verify the differences in the technical dosages between all groups, data were compared using ANOVA followed by Tukey's post-test or Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-test, $p < 0.05$. In the study, animals with malignant mammary neoplasms showed serum and tissue oxidative stress. Systemically, there was a reduction in TAC, and an increase in oxidants associated with lipid peroxidation. While there was an increase in antioxidants and a decrease in oxidants in the neoplastic and normal mammary tissue of the animals with mammary tumors, no difference was found in lipid peroxidation.

Keywords: mammary tumor, neoplasm, antioxidants, oxidants, dogs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1** - Marcadores de estresse oxidativo sérico Ácido Úrico (A), CAT-ABTS (B), CAT-ABTS-HRP (C), CAT-CUPRAC (D), CAT-FRAP (E), COT (F) e peroxidação lipídica pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) sérica (G). A diferença estatisticamente significativa é indicada por * ($p < 0,05$). 38
- FIGURA 2** - Marcadores de estresse oxidativo tecidual Ácido Úrico (A), CAT-ABTS (B), CAT-ABTS-HRP (C), CAT-CUPRAC (D), CAT-FRAP (E), COT (F) e peroxidação lipídica pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) sérica (G). A diferença estatisticamente significativa é indicada por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) ou **** ($p < 0,0001$). 40

LISTA DE QUADROS

- QUADRO 1** - Critérios para a determinação do estadiamento clínico (TNM) dos tumores de mama em cadelas21
- QUADRO 2** - Estadiamento clínico de tumor de mama em cadelas em função dos resultados obtidos quanto ao tamanho tumoral (T), acometimento nodal (N) e detecção de metástase a distância (M)21
- QUADRO 3** - Espécies Reativas de Oxigênio23
- QUADRO 4** - Principais Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) envolvidas no dano oxidativo..... 245
- QUADRO 5** - Divisão dos subgrupos dos tecidos mamários neoplásicos e normais.....35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
HRP	Enzima peroxidase
CAT	Capacidade antioxidante total
CATA	Enzima catalase
COT	Capacidade oxidante total
CUPRAC	Capacidade antioxidante de redução cúprica
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FRAP	Capacidade de redução de ferro do plasma
GPx	Glutathiona peroxidase
GR	Glutathiona redutase
GST	Glutathiona transferase
MDA	Malondialdeído
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidases
OH	Ovariohisterectomia
SOD	Superóxido dismutase

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	NEOPLASIA MAMÁRIA EM CADELAS	16
2.1.1	Fatores de Risco	16
2.1.2	Idade	17
2.1.3	Exposição Hormonal.....	17
2.1.4	Outros Fatores.....	18
2.1.5	Histórico e Apresentação Clínica	19
2.1.6	Avaliação Clínica, Diagnóstico e Estadiamento	20
2.1.7	Tratamento	21
2.2	ESTRESSE OXIDATIVO	22
2.2.1	Espécies Reativas de Oxigênio	23
2.2.2	Avaliação do estresse oxidativo.....	25
2.2.3	Estresse oxidativo e câncer	27
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL.....	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	LOCAIS DE REALIZAÇÃO / ÓRGÃOS ENVOLVIDOS.....	31
4.2	APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA.....	31
4.3	SELEÇÃO DOS ANIMAIS	31
4.4	ABORDAGEM CLÍNICA	32
4.5	COLETA DAS AMOSTRAS SÉRICAS E TECIDUAIS	32
4.5.1	Clivagem das peças e seleção das amostras teciduais	33
4.6	PROCESSAMENTO E AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	33
4.7	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E PARÂMETROS PARA A AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO	34
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5	RESULTADOS	37
5.1	CARACTERÍSTICA DOS ANIMAIS E DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO.....	37
5.2	AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO	37
5.2.1	Sistêmico.....	37

5.2.2	Tecidual.....	39
6	DISCUSSÃO	41
7	LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	45
8	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	47
	APÊNDICE A – ANIMAIS COM NEOPLASIA MAMÁRIA MALIGNA UTILIZADOS NO ESTUDO.....	61
	APÊNDICE B – ANIMAIS COM NEOPLASIA MAMÁRIA BENIGNA UTILIZADOS NO ESTUDO.....	62

1. INTRODUÇÃO

A neoplasia mamária em cadelas possui grande importância em Medicina Veterinária e vem sendo objeto de muitos estudos, sendo ainda modelo biológico para o estudo do câncer de mama na mulher (FELICIANO *et al.*, 2012). Alterações no estado oxidativo em animais portadores de neoplasias, incluindo as mamárias, foram evidenciadas por meio da mensuração de biomarcadores de dano, como a peroxidação lipídica, determinada pelas substâncias reativas ao ácido barbitúrico (TBARS) e óxido nítrico, concentrações de metais como ferro, cobre e zinco e antioxidantes como o ácido ascórbico (ASKAR *et al.*, 2009).

O desequilíbrio entre os compostos oxidantes e antioxidantes causado por um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou pela baixa disponibilidade de antioxidantes é a principal causa do estresse oxidativo. Esse processo leva à oxidação de diversas moléculas culminando na perda de suas funções biológicas e desequilíbrio homeostotático, gerando alterações em âmbito celular (ANDRADE; SENEDA; ALFIERI, 2010; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). As substâncias oxidantes e antioxidantes são formadas em reações de oxido-redução nas quais ocorre a perda (oxidação) ou ganho (redução) de elétrons (POLI *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009).

A determinação de fatores prognósticos em neoplasias, inclusive as mamárias, tem sido objeto de interesse crescente na oncologia veterinária, principalmente com a utilização de imunohistoquímica e métodos de diagnóstico molecular que podem detectar a presença de marcadores frequentemente pesquisados nas neoplasias da mama, como Ki-67, E-caderina, HER-2, COX-2, VEGF, p-53, entre outros (LAVALLE *et al.*, 2009; MARTÍN DE LAS MULAS *et al.*, 2003; THURÓCZY *et al.*, 2007). No entanto, os dados referentes a utilização de biomarcadores de dano oxidativo, bem como sua possível utilização como marcador de prognóstico são escassos na literatura veterinária.

O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de estresse oxidativo sérico e no tecido mamário em cadelas portadoras de neoplasias mamárias, benignas e malignas, e em cadelas saudáveis.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NEOPLASIA MAMÁRIA EM CADELAS

As neoplasias mamárias são comuns em cães, gatos e humanos, mas são raras na maioria das outras espécies (RAPOSO *et al.*, 2017; SCHNEIDER, 1970). São tumores comuns em fêmeas intactas e raramente ocorrem nos machos (SORENMO *et al.*, 2009).

Nos cães, a taxa de incidência varia com a localização geográfica e está relacionada diretamente à ovariectomia (OH) e à idade em que é realizada (SCHNEIDER; DORN; TAYLOR, 1969; SORENMO *et al.*, 2011). No Brasil, a estimativa de incidência de neoplasias malignas em cadelas é superior a 80% na maioria dos estudos (OLIVEIRA *et al.*, 2003; OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2010). Nos Estados Unidos, onde a castração é prática comum em fêmeas ainda jovens, a incidência de neoplasia mamária foi reduzida drasticamente (SORENMO, 2003).

As neoplasias mamárias são comuns em animais seniores, com a faixa etária entre 7 e 12 anos (DE NARDI *et al.*, 2016). Diversos estudos relataram variações raciais significativas na incidência de tumor mamário, sugerindo que, além da idade e fatores hormonais, a suscetibilidade genética associada à hereditariedade também contribui para o risco de tumor mamário (GOLDSCHMIDT; PEÑA; ZAPPULLI, 2016). No entanto, existem muitos outros fatores, como por exemplo a popularidade da raça, fatores de manejo e socioeconômicos.

As raças caninas com maior incidência de neoplasia mamária são Poodle, Dachshund, Yorkshire Terrier, Maltês, Cocker Spaniel, Pastor Alemão, Boxer, Pointer e, Fox Terrier, além dos animais sem raça definida (EGENVALL *et al.*, 2005; NARDI *et al.*, 2002).

2.1.1 Fatores de Risco

Os estudos epidemiológicos além de fornecerem dados sobre a incidência, também ajudam na identificação de fatores de risco para os tumores de mama (DIAS *et al.*, 2016). Três fatores parecem desempenhar papéis importantes no risco de tumor de mama: idade, exposição hormonal e raça (EGENVALL *et al.*, 2005; NUNES *et al.*, 2018; RIBAS *et al.*, 2012). Em menor grau, dieta e o escore de condição corporal, ou obesidade, também podem contribuir para elevar o risco (CALLE; KAAKS, 2004; CARMICHAEL; BATES, 2004).

2.1.2 Idade

Os tumores de mama afetam cães de meia-idade e mais velhos (SCHNEIDER, 1970). As neoplasias de mama, especialmente as malignas, são raras em animais com menos de cinco anos de idade (SANTOS *et al.*, 2013). O risco de desenvolvimento de tumor aumenta conforme a idade aumenta, e torna-se significativo quando os cães completam 7 ou 8 anos de idade, e continua a aumentar até a idade de 11 a 13 anos (SORENMO *et al.*, 2009).

Os tumores malignos são mais comuns em animais mais idosos, com idade média entre 9 e 11 anos, enquanto os tumores benignos são comuns em animais mais jovens, em média de 7 a 9 anos (SCHNEIDER; DORN; TAYLOR, 1969; TAYLOR *et al.*, 1976).

O ápice na idade de incidência varia conforme a raça, pois a expectativa de vida muda conforme o porte, com as raças grandes tendo uma expectativa de vida menor e, portanto, tendem a ser mais jovens que raças de porte menor (SORENMO 2003).

2.1.3 Exposição Hormonal

Muitos estudos demonstraram que os hormônios esteroidais têm influência no desenvolvimento de tumores mamários e a castração nos animais jovens pode prevenir o desenvolvimento das neoplasias mamárias (THURÓCZY *et al.*, 2007). O efeito protetor da castração diminui muito rapidamente durante os primeiros ciclos estrais (CHANG *et al.*, 2009).

O consenso entre os especialistas é que os efeitos essenciais e irreversíveis dos hormônios ovarianos sobre as glândulas mamárias, em termos de risco de câncer, ocorrem no início da vida, provavelmente durante a puberdade, quando há o desenvolvimento e amadurecimento glandular (GOLDSCHMIDT; PEÑA; ZAPPULLI, 2016). Segundo Schneider *et al.* (1969), quando as cadelas são castradas antes do primeiro cio, a redução do risco de desenvolvimento de tumores mamários é de 99,5%, enquanto antes do segundo cio a redução é de 92%, e antes do terceiro ciclo é de 84%, não apresentando diferença após o terceiro estro. Apesar desses dados continuarem atuais, estudos recentes indicam que em algumas raças, a castração precoce pode aumentar o risco de doenças ósseas, musculares, dos órgãos genitais, do sistema imunológico e de algumas neoplasias como osteossarcoma, hemangiossarcoma, linfoma e mastocitoma (BELANGER *et al.*, 2017; COOLEY *et al.*,

2002; HOULIHAN, 2017; SMITH, 2014; TORRES DE LA RIVA *et al.*, 2013; ZINK *et al.*, 2014). Em uma revisão sistemática a respeito do tema Beauvais *et al.* (2012) não encontraram fortes evidências que a castração precoce possa reduzir o risco de tumores mamários. Atualmente, segundo o Consenso Brasileiro para Diagnóstico, Prognóstico e Tratamento de Tumores de Mama em Cadelas, é preconizada a castração no primeiro anestro por ser mais segura, porém existem fatores raciais a serem considerados (CASSALI *et al.*, 2014; HART, 2021; HOULIHAN, 2017; HOWE, 2015; MARVEL, 2022).

A importância da exposição hormonal na juventude pode explicar por que outros fatores, que resultam em variação fisiológica dos hormônios ovarianos sobre a glândula mamária após esse período inicial, como hiperplasia endometrial cística, pseudogestação, gestação ou paridade, que normalmente ocorrem após vários ciclos estrais, não influenciam significativamente o risco de tumor mamário (BRODEY; FIDLER; HOWSON, 1966; DE NARDI *et al.*, 2016; VERONESI *et al.*, 2003).

Por sua vez, a exposição à hormônios exógenos, progestágenos e/ou estrógenos, aumenta o risco do desenvolvimento de tumor mamário (GILES *et al.*, 1978; SELMAN *et al.*, 1995). Em dois amplos estudos com animais que utilizaram progestágenos como método contraceptivo, houve um aumento do risco de desenvolvimento de tumores mamários (MISDORP, 1988; STØVRING; MOE; GLATTRE, 1997).

Outros estudos investigaram o efeito de dose, duração e tipo de hormônios (progestágenos, estrógenos ou a combinação de ambos) no desenvolvimento de tumores mamários, e embora haja alguma discordância, a maioria concluiu que os progestágenos mesmo em baixas doses, aumentaram o risco de tumores principalmente benignos, enquanto a combinação de estrógenos e progestágenos foi mais propensa a provocar tumores malignos (CHANG *et al.*, 2009; ESTRÊLA DA SILVA *et al.*, 2004; GEIL; LAMAR, 1977; GILES *et al.*, 1978; MISDORP, 1988; SELMAN *et al.*, 1995; STØVRING; MOE; GLATTRE, 1997).

2.1.4 Outros Fatores

Outros fatores de risco que também podem contribuir para o desenvolvimento de neoplasias mamárias em cães estão relacionados à obesidade e aos fatores nutricionais no período da puberdade (9 a 12 meses). Ocorre um aumento no risco de desenvolvimento de neoplasia mamária em cadelas obesas e que se alimentem de

uma dieta rica em gordura, principalmente nesse período de vida (PÉREZ ALENZA *et al.*, 1998; SONNENSCHNEIN *et al.*, 1991).

2.1.5 Histórico e Apresentação Clínica

Os cães com tumores de mama geralmente são apresentados ao Médico Veterinário com um ou mais nódulos, circunscritos e de tamanho variado. Como a maioria dos animais com tumores mamários está clinicamente bem, é comum os nódulos serem observados apenas durante um exame clínico de rotina (SORENMO, 2003).

Nas cadelas, é comum a presença de mais de um tumor acometendo uma ou mais mamas (70% dos casos) e frequentemente são independentes, apresentando tipos histológicos distintos (SORENMO *et al.*, 2011). Os dois pares de glândulas mamárias caudais (inguinais e abdominais caudais) são geralmente as mais acometidas, naturalmente por serem maiores e mais vascularizadas, dessa forma uma palpação cuidadosa é importante para detectar pequenos tumores durante o exame clínico (SORENMO *et al.*, 2011; TAYLOR *et al.*, 1976).

Os nódulos menores (< 1cm de diâmetro) e de crescimento lento tendem a serem benignos, enquanto os maiores (>3-5 cm de diâmetro) e que exibem crescimento rápido, tendem a ser malignos e mais invasivos (DE NARDI *et al.*, 2016; SASSI *et al.*, 2010). No entanto, todos os nódulos mamários, independentemente do tamanho, devem ser avaliados histologicamente para essa diferenciação (FELICIANO *et al.*, 2012; RIBAS *et al.*, 2012). As ulcerações de pele estão presentes geralmente nos tumores maiores e irregulares, levando à inflamação e infecção, além de poderem estar aderidos à musculatura (NUNES *et al.*, 2018).

Os carcinomas mamários inflamatórios representam uma exceção a essa apresentação clínica. Eles caracterizam um tipo raro, mas clinicamente importante subgrupo nas neoplasias mamárias. Os cães têm uma apresentação clínica que pode facilmente ser confundida com uma mastite ou dermatite severa, pois ao invés de lesões nodulares bem delimitadas, toda a cadeia mamária se apresenta edemaciada, eritematosa, quente e dolorida (SOUZA *et al.*, 2009). A maioria dos animais com carcinoma inflamatório apresenta metástase em locais distantes e sinais de doença sistêmica, e tem uma sobrevida em média de 25 dias após o diagnóstico, portanto maus candidatos à cirurgia (MARCONATO *et al.*, 2009; PÉREZ ALENZA; TABANERA; PEÑA, 2001).

2.1.6 Avaliação Clínica, Diagnóstico e Estadiamento

O estadiamento clínico do paciente com neoplasia mamária, antes do início da terapia, é altamente recomendado devido ao risco de metástases. O estadiamento mínimo inclui hemograma, bioquímica sérica, radiografias torácicas de três projeções, citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) de linfonodos regionais, mesmo se normais à palpação (SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013).

A ultrassonografia abdominal pode ser indicada em cães com suspeita de envolvimento de linfonodos regionais ou quando não foi possível de realizar CAAF dos mesmos, quando existem alterações na bioquímica sérica ou para investigação de outros sítios de metástase além dos pulmões (SLEECKX *et al.*, 2011).

O exame de CAAF é muito utilizado nas neoplasias mamárias, sendo um exame rápido, barato e que permite diferenciar os tumores mamários dos dérmicos e subcutâneos. Foram reportadas correlações entre o exame citológico e histopatológico entre 63% e 93% (CASSALI *et al.*, 2007; SIMON *et al.*, 2009; ZUCCARI; SANTANA; ROCHA, 2001).

Um estudo demonstrou que o exame citológico teve sensibilidade de 88% e especificidade de 96% para o diagnóstico de malignidade (SIMON *et al.*, 2009). Pela sua sensibilidade abaixo de 90%, a CAAF não deve ser utilizada isoladamente como método de diagnóstico, mas sim no intuito de auxiliar, de forma simples, barata e imediata, na conduta clínica com relação ao prognóstico e tratamento do paciente (ZUCCARI; SANTANA; ROCHA, 2001).

O diagnóstico definitivo é realizado por biópsia excisional e avaliação histopatológica para determinação do grau de malignidade tumoral. No Brasil, foi proposta uma nova classificação histológica para os tumores mamários de cadelas, a fim de padronizar os critérios de diagnóstico e tratamento para tumores mamários em cães (CASSALI *et al.*, 2014).

Com o intuito de se obter uma padronização no estadiamento clínico dos pacientes caninos com tumores de mama, a Organização Mundial da Saúde (OMS), propôs o sistema de estadiamento TMN, com a finalidade de avaliar o tamanho do tumor (T), o comprometimento dos linfonodos regionais (N) e a presença ou não de metástases distantes (M) (OWEN, 1980). Esse sistema foi modificado posteriormente por Sorenmo *et al.* (2013) e foi adotado por Cassali *et al.* (2014) (Quadros 1 e 2).

QUADRO 1 – Critérios para a determinação do estadiamento clínico (TNM) dos tumores de mama em cadelas

Tumor Primário (T)	T1 Tumor < 3 cm T2 Tumor entre 3 e 5 cm T3 Tumor > 5 cm
Linfonodos Regionais (N)	N0 Sem metástase N1 Metastático
Metástases (M)	M0 Sem metástase à distância M1 Metástase à distância

Fonte: Cassali *et al.* (2014)

QUADRO 2 – Estadiamento clínico de tumor de mama em cadelas em função dos resultados obtidos quanto ao tamanho tumoral (T), acometimento nodal (N) e detecção de metástase a distância (M)

Estágio	Tamanho Tumoral	Situação Linfonodo	Metástases
Estágio 1	T1	N0	M0
Estágio 2	T2	N0	M0
Estágio 3	T3	N0	M0
Estágio 4	Qualquer T	N1	M0
Estágio 5	Qualquer T	Qualquer	M1

Fonte: Cassali *et al.* (2014)

2.1.7 Tratamento

A cirurgia continua a ser o tratamento padrão-ouro para a maioria dos tipos de tumores mamários, exceto para os carcinomas mamários inflamatórios (CASSALI *et al.*, 2019; MISDORP *et al.*, 1999; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013). A excisão cirúrgica permite o envio de material para o diagnóstico histopatológico e tem alta probabilidade de ser curativa se as margens estiverem preservadas e não houver metástases (DE NARDI *et al.*, 2016; DIAS *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2013; SORENMO, 2003).

A abordagem cirúrgica depende de características tumorais como tamanho, localização e consequente drenagem linfática, e do paciente, como estadiamento clínico e estado geral do paciente (DE NARDI *et al.*, 2016; STRATMANN *et al.*, 2008). As técnicas cirúrgicas incluem a retirada de um nódulo por lumpectomia, mastectomia simples, mastectomia regional, mastectomia radical unilateral, mastectomia radical bilateral e mastectomia radical bilateral estagiada (FOSSUM, 2021). A escolha do tipo de cirurgia mais adequado ainda é controversa, com cada uma apresentando vantagens e desvantagens (SORENMO, KARIN; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013).

Estudos antigos em cães mostraram que o tipo de técnica cirúrgica não tem influência no tempo livre de doença e sobrevida quando todo o tumor é retirado e as margens estão livres (MACEWEN *et al.*, 1985; MISDORP; HART, 1979). Em outro estudo prospectivo com 99 cadelas mostrou desenvolvimento de novos tumores em 58% dos cães no tecido mamário remanescente após mastectomia regional (STRATMANN *et al.*, 2008).

Dessa forma, não há um estudo definitivo quanto a melhor técnica a ser usada em cadelas com neoplasia mamária. Contudo, mastectomia radical unilateral ou bilateral pode ser empregada de forma preventiva, com o objetivo de diminuir a incidência de novos tumores mamários (CASSALI *et al.*, 2014; HORTA *et al.*, 2014). A nodulectomia pode ser utilizada de forma paliativa nos pacientes que possuem nódulos ulcerados e metástase à distância (DE NARDI *et al.*, 2016).

A quimioterapia pode ser utilizada como tratamento adjuvante nos pacientes que têm invasão de vasos linfáticos ou sanguíneos, em linfonodos e para os tipos histológicos agressivos como carcinoma sólido, anaplásico e micropapilar, carcinossarcoma e sarcomas mamários, e que estão ligados a um pior prognóstico (CASSALI *et al.*, 2014).

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO

As espécies reativas de oxigênio (ERO), incluindo RL e espécies não radicais, são geradas como subprodutos do metabolismo celular normal. Em condições normais, são importantes para produção de energia por meio de ATP na cadeia de transporte de elétrons, ativação de genes, fertilização e formação do oócito, regulação do crescimento celular e no sistema imunológico, participando dos mecanismos de defesa celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Porém, em condições que sua produção é excessiva, apresentam efeitos prejudiciais, causando danos às macromoléculas (lipídios, carboidratos, proteínas e/ou ácidos nucleicos) celulares, teciduais ou das organelas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Acredita-se que o dano oxidativo a esses componentes, por um excesso de ERO, esteja envolvido na patogênese do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante e parece desempenhar um papel significativo na patogênese de muitas doenças, como doenças cardiovasculares, neuropatias, doenças inflamatórias, AIDS, diabetes

mellitus, distúrbios renais e vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama (SZCZUBIAŁ *et al.*, 2004; SÁNCHEZ-PÉREZ *et al.*, 2005; SIES, 2015; THIPPANI; KUMAR, 2020).

As ERO têm como alvo principalmente os ácidos graxos poli-insaturados nas membranas celulares e causam peroxidação lipídica. Os produtos da peroxidação lipídica podem induzir danos ao DNA e, conseqüentemente, mutagênese e carcinogênese (RAJNEESH *et al.*, 2008). Os biomarcadores de peroxidação lipídica que podem ser medidos no sangue e nos tecidos são as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e o malondialdeído (MDA) (SZCZUBIAŁ *et al.*, 2004; SZCZUBIAŁ *et al.*, 2008).

Os mecanismos de defesa antioxidante usando enzimas endógenas e antioxidantes derivados da dieta moderam os efeitos das ERO. Estudos de perfil oxidante-antioxidante foram realizados em tecidos de cânceres humanos (RAJNEESH *et al.*, 2008; RAY *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2014) e poucos estudos semelhantes foram realizados em tumores caninos (KUMARAGURUPARAN *et al.*, 2002; RUSSO *et al.*, 2021; THIPPANI; KUMAR, 2020; KARAYANNOPOULOU *et al.*, 2013).

2.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio

As ERO são compostos químicos derivados do oxigênio e em sua grande maioria possuem alta instabilidade molecular, portanto são extremamente reativas e capazes de transformar outras moléculas com as quais interagem (MAGDER, 2006). Podemos dividir as ERO em dois grupos, os RL e as espécies reativas não radicais (Quadro 1) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

QUADRO 3 – Espécies Reativas de Oxigênio

Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)	
Radicais Livres	Não Radicais
Superóxido (O ₂ •)	Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)
Hidroxila (OH•)	Ácido Hipobromoso (HOBr)
Hidroperoxila (HO ₂ •)	Ácido hipocloroso (HOCl)
Peroxila (RO ₂ •)	Ozônio (O ₃)
Alcoxila (RO•)	Oxigênio Singlet (¹ O ₂)
Carbonato (CO ₃ •)	Peróxidos Orgânicos (ROOH)
Dióxido de Carbono (CO ₂ •)	Peroxinitrito (ONOO)
	Ácido Peroxinitroso (ONOOH)

Fonte: Adaptado de Ribeiro *et al.* (2005).

Os RL são átomos ou moléculas que possuem um número ímpar de elétrons em sua última camada elétrica (VAN LENTE, 1993). Isso permite a transferência de elétrons com outras moléculas, resultando em alta instabilidade energética e cinética, no qual precisam doar ou retirar um elétron de outra molécula para se manterem estáveis (RIBEIRO *et al.*, 2005). Apesar de existirem espécies reativas não radicais, que não tem um elétron desemparelhado na última camada, alguns ainda podem atuar como oxirredutores (COTINGUIBA *et al.*, 2013). As principais ERO envolvidas no dano oxidativo estão listadas no Quadro 2.

A principal fonte de ERO no organismo é o próprio metabolismo normal do oxigênio, ocorrendo normalmente nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma (ANDREYEV; KUSHNAREVA; STARKOV, 2005). Os íons ferro e cobre estão envolvidos em várias reações de RL e podem favorecer a geração de ERO (MILLER; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA; MADSEN, 1993). A mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte endógena geradora de RL (TURRENS, 2003).

Outra importante fonte geradora de RL são as enzimas NADPH oxidase, presentes nas membranas com a função de transferir elétrons (LAMBETH; KAWAHARA; DIEBOLD, 2007). Essas enzimas também participam da atuação de células do sistema imunológico e produzem uma grande quantidade de $O_2^{\bullet-}$ capaz de matar microrganismos invasores (MAGDER, 2006).

Os neutrófilos parecem desempenhar papel importante no mecanismo de desequilíbrio do estresse oxidativo, uma vez que são fagócitos especializados que possuem uma grande capacidade de produção de ERO, que a partir do ânion superóxido resultam em compostos altamente reativos como o peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso (NATHAN, 2006; ZAMZAMI *et al.*, 1996).

A produção das ERO constitui um processo fisiológico, sendo indispensáveis para funções como a sinalização celular e a defesa contra microrganismos. Durante os processos metabólicos, essas ERO atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Entretanto, a produção excessiva pode conduzir a lesões oxidativas (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007) e estar associada ao desenvolvimento de diversas doenças como a anemia hemolítica (STOCKS; DORMANDY, 1971), aterosclerose (SAKURAI; SAWAMURA, 2003), lesões de reperfusão tecidual (PARK; LUCCHESI, 1999) além

de ter um potencial cancerígeno (SHACTER *et al.*, 1988) incluindo o câncer de mama (SÁNCHEZ-PÉREZ *et al.*, 2005; SIES, 2015; SZCZUBIAŁ *et al.*, 2004; THIPPANI; KUMAR, 2020). Ainda existem poucos trabalhos a respeito do estresse oxidativo relacionados a neoplasia mamária em animais, e outra dificuldade é a respeito dos métodos utilizados para determinação do estresse oxidativo diferirem entre a literatura.

QUADRO 4 – Principais ERO envolvidas no dano oxidativo.

Espécies	Estrutura química	Descrição	Ocorrência	Ação
Radical superóxido	$O_2^{\cdot-}$	Radical mais ponte na indução de dano celular	Aproximadamente em todas as células aeróbicas	Na maioria das reações atua como agente redutor
Radical hidroxila	$HO\cdot$	Altamente reativo	Formado a partir da homólise da água	Ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídeos
Radical hidroperoxil	$HO_2\cdot$	Protonado a partir do $O_2^{\cdot-}$	Através do peróxido de hidrogênio	Membranas biológicas
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2	Não é um radical livre	Reações para produção de $HO\cdot$	Proteínas e lipídios
Oxigênio singleto	1O_2	Molécula de oxigênio excitada. Não é um radical livre	Produzidos pelos fagócitos, indução luminosa e reações catalisadas pelos peroxidases	Mutações no DNA

Fonte: Adaptado de Halliwell e Whiteman (2004).

2.2.2 Avaliação do estresse oxidativo

Para a avaliação dos marcadores de estresse oxidativo, são utilizados métodos espectrofotométricos que avaliam a capacidade antioxidante total (CAT), que é um método frequentemente usado para avaliar o estado antioxidante de amostras biológicas e pode avaliar a resposta antioxidante contra os radicais livres (RL) produzidos em uma determinada doença. A capacidade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC), capacidade de redução férrica do plasma (FRAP) e capacidade antioxidante cúprica redutora (CUPRAC) são diferentes ensaios utilizados para determinar a CAT de uma amostra (RUBIO *et al.*, 2016b). A CAT mensura todas as

substâncias antioxidantes presentes no plasma e a interação entre elas, obtendo-se assim, o *status* antioxidante do indivíduo (EREL, 2004).

Além dos ensaios TEAC, FRAP, CUPRAC para a avaliação da CAT, a peroxidação lipídica e a concentração de ácido úrico são dois importantes marcadores utilizados para avaliação do estresse oxidativo no meio biológico. Já a capacidade oxidante total (COT) diz respeito ao conjunto das substâncias plasmáticas que atuam como agentes pró-oxidantes, favorecendo o estresse oxidativo e atua como marcador do estresse oxidativo (EREL, 2005).

O ácido úrico é considerado um importante antioxidante nos sistemas biológicos, ele é capaz de proteger o DNA e os lipídios da ação das ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN). Esse se encontra na forma de ânion radical urato capaz de reagir rapidamente com o radical hidroxila (HO), mas sua reação com os radicais peroxila (ROO) e NO₂ é a base do seu efeito antioxidante. Além disso, o ácido úrico também exerce importante ação na estabilização do ascorbato no plasma sanguíneo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia de RL que, uma vez iniciada, promove a propagação de produtos primários chamados hidroperóxidos de lipídios (BARRETO, 2008), que ao se decompor resultam em radicais de hidroxila que apresentam maior reatividade e toxicidade e promovem o aumento do oxigênio molecular singlete (¹O₂), por meio da combinação com dois radicais peroxila. O ¹O₂ gera danos às biomoléculas como aminoácidos, lipídios e bases de DNA (MIYAMOTO, 2005).

A peroxidação lipídica ocorre como resultado do estresse oxidativo em que as ERO danificam os ácidos graxos insaturados da camada lipídica celular dos diversos tecidos orgânicos (PRYOR; STANLEY; BLAIR, 1976), podendo ser mensurada pela dosagem direta do malondialdeído, resultado da peroxidação lipídica, ou indiretamente por meio da dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (DEVASAGAYAM; BOLOOR; RAMASARMA, 2003).

Outros métodos de avaliação do estresse oxidativo incluem a mensuração dos agentes antioxidantes enzimáticos, como a catalase (CATA), superóxido dismutase (SOD), glutatona redutase (GR) e peroxidase (GPx), além dos antioxidantes não enzimáticos, como por exemplo o ácido ascórbico, o tocoferol, betacaroteno, selênio, entre outros (SZCZUBIAŁ *et al.*, 2004; SÁNCHEZ-PÉREZ *et al.*, 2005; SIES, 2015; THIPPANI; KUMAR, 2020).

2.2.3 Estresse oxidativo e câncer

O câncer está entre os processos patológicos que a participação do estresse oxidativo já foi descrito (REUTER *et al.*, 2010). As células possuem mecanismos bioquímicos e genéticos complexos para manter o equilíbrio oxidativo, e sua alteração tem graves consequências fisiopatológicas (MILLER; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA; MADSEN, 1993).

Em doses baixas as ERO levam a processos naturais de sobrevivência e renovação celular, entretanto em altas concentrações podem estar relacionadas a destruição celular e processos mutagênicos por oxidação dos ácidos nucleicos, entre outras moléculas (SIES, 2015). Níveis elevados de ERO foram retratados em diversos tumores humanos e de cães, incluindo melanoma, linfoma, mieloma múltiplo, carcinomas gástricos, mamários, prostáticos e de cólon (MCMICHAEL, 2007; REUTER *et al.*, 2010; VALKO *et al.*, 2006).

A influência do estresse oxidativo na evolução do câncer é aparentemente contraditória. Pode agir estimulando a tumorigênese em virtude de aumentar a transformação, proliferação e migração das células cancerígenas, ou induzir a morte celular (HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020). As ERO são capazes de induzir danos no DNA, levando a lesões genéticas que iniciam a tumorigenicidade e subsequente progressão do tumor (REUTER *et al.*, 2010). Por outro lado, as ERO também podem induzir a senescência e apoptose celular e, portanto, podem funcionar como agentes antitumorigênicos (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016). Se as ERO promovem a sobrevivência das células tumorais ou atuam como agentes antitumorigênicos, depende da célula e dos tecidos, da localização, da produção de ERO e da concentração de ERO individuais (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; JAKUBCZYK *et al.*, 2020).

O microambiente tumoral está exposto condições de estresse, como hipóxia, perda de adesão intercelular e da matriz extracelular, e o desbalanço no metabolismo oxidativo (DHILLON *et al.*, 2007). Os estudos com o ecossistema tumoral que começaram com componentes celulares do estroma tumoral, se concentram agora no meio acelular, hostil até mesmo para as células malignas, porém é incrível a capacidade adaptativa das células tumorais à hipóxia e aos efeitos tóxicos do oxigênio (HALLIWELL, 2007; HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020; SILVA e JASIULIONIS, 2014). Por essa importância o estresse oxidativo e a desregulação

mitocondrial foram incorporados ao modelo original de Hannah e Weinberg como uma das *hallmarks* do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A hiperproliferação das células tumorais tem como consequência uma alta produção de ERO, porém ocorre uma resposta adaptativa e ela se mantém mesmo com a alta carga oxidativa (BREITZIG *et al.*, 2016). Nesse cenário é esperado que a peroxidação lipídica cause efeitos inflamatórios, senescência e apoptose, contudo as células tumorais ativam mecanismos de oxirredução, aumentando a transcrição de fatores antioxidantes para criar condições mais favoráveis e continuar sua proliferação, evitando a morte por senescência, apoptose ou ferroptose (DODSON; CASTRO-PORTUGUEZ; ZHANG, 2019; REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016).

A resposta adaptativa da célula tumoral é complexa, por meio de sinalizadores celulares de estresse oxidativo ativados em cadeia, a depender dos níveis de ERO. Por regular um amplo espectro de genes antioxidantes e de desintoxicação, o NRF2 fornece a principal defesa induzível contra o estresse oxidativo (DODSON; CASTRO-PORTUGUEZ; ZHANG, 2019; SIES; BERNDT; JONES, 2017). No entanto, essa adaptação inicial mediada pelo NRF2 é estratificada e regulada, e uma vez que os genes antioxidantes induzidos por NRF2 são sobrecarregados, outros fatores de transcrição e vias antioxidantes são ativados (CHHUNCHHA; KUBO; SINGH, 2019; ZUCKER *et al.*, 2014).

Os mecanismos *redox* adicionais após a saturação do NRF2 incluem a resposta orquestrada de outros fatores de transcrição antioxidantes, modulando genes como BACH1, AP-1, FOXO, HIF1A, NFKB, TP53, PTEN e ATM, de forma estratificada e sequencial (EIJKELENBOOM; BURGERING, 2013; FARAONIO *et al.*, 2006; HIEMSTRA *et al.*, 2017; SÁNCHEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2019; XIAO *et al.*, 2003). Cada um desses fatores de transcrição é ativado em um patamar diferente ERO, e o resultado são várias vias celulares distintas de reprogramação metabólica, reparo de danos, parada de ciclo celular, senescência, apoptose e ferroptose (XIAO *et al.*, 2003).

O estresse oxidativo e a resposta das células tumorais são fatores de pressão seletivo, especialmente nos tumores mais avançados, e podem explicar o motivo pelo qual o uso de antioxidantes está envolvido no desenvolvimento de metástase com a multiplicação de diferentes tipos de clones tumorais (GAL *et al.*, 2015; GILL; PISKOUNOVA; MORRISON, 2016; PEIRIS-PAGÈS *et al.*, 2015; PISKOUNOVA *et al.*, 2015). Como a terapia antioxidante não tem se mostrado eficaz no combate ao câncer,

recentemente o aumento do estresse oxidativo é considerado um novo alvo para a terapia anticâncer (AZMANOVA; PITTO-BARRY, 2022; PERILLO *et al.*, 2020).

Aumentar os níveis de ERO nas células cancerígenas e, assim, cruzar o limiar de morte de células cancerígenas, pode ser feito aumentando a produção direta de ERO por meio de abordagens exógenas e/ou inibindo os mecanismos antioxidante celulares endógenos das células tumorais (HABTETSION *et al.*, 2018; KIM; KIM; SEO, 2019; OZBEN, 2007; VAN LOENHOUT *et al.*, 2020). Vários estudos são sugestivos do fato de que o mecanismo de ação subjacente e a eficácia das terapias convencionais (por exemplo, radioterapia e quimioterapia) induzindo a morte de células tumorais, é a geração de níveis elevados de ERO durante tratamento, e essas novas abordagens poderiam além de ter ação direta no combate as células cancerígenas, também melhorar a resposta as terapias convencionais (HABTETSION *et al.*, 2018; KIM; KIM; SEO, 2019; OZBEN, 2007; ZHANG; WANG; SU, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o estresse oxidativo sistêmico e tecidual em cadelas com neoplasia mamária em comparação a cadelas saudáveis.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se o tecido mamário neoplásico e normal e o soro das cadelas acometidas por neoplasia mamária benigna ou maligna apresentam variação da CAT e COT em relação ao tecido mamário e o soro de cadelas saudáveis.
- Avaliar se há diferença na peroxidação lipídica sérica e tecidual entre cadelas acometidas por neoplasia mamária benigna, maligna, e cadelas saudáveis.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAIS DE REALIZAÇÃO / ÓRGÃOS ENVOLVIDOS

A avaliação clínica e tratamento dos pacientes foram realizadas pelo Hospital Veterinário “Roque Quagliato” do Centro Universitário das Faculdades Integras de Ourinhos (HV-UNIFIO) e Hospital Veterinário Escola da Universidade do Norte Pioneiro (HVE-UENP).

O processamento laboratorial das amostras e diagnóstico histopatológico foi realizado no Laboratório de Patologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina.

Os fragmentos de tecidos mamários foram homogeneizados no Laboratório de Imunologia Celular da Faculdade de Medicina Veterinária da Unesp de Araçatuba.

A realização dos testes para avaliação de estresse oxidativo ocorreu no setor de Patologia e Análises Clínicas Veterinária do HV-UNIFIO.

4.2 APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro Universitário de Ourinhos (sob o número de protocolo 004/2021), ocorrendo de acordo com os princípios éticos. A inclusão dos cães controles utilizados no experimento ocorreu mediante autorização expressa por seu tutor, por meio de assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, enquanto as amostras dos cães com neoplasia mamária eram provenientes da rotina do Hospital Veterinário “Roque Quagliato” do Centro Universitário das Faculdades Integras de Ourinhos (HV-UNIFIO), e do Hospital Veterinário Escola da Universidade do Norte Pioneiro (HVE-UENP), sem que houvesse qualquer interferência deste estudo nos protocolos clínicos instituídos.

4.3 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Foram incluídas neste estudo cadelas portadoras de neoplasia mamária, sem outras comorbidades clinicamente detectáveis, que passaram por atendimento e tratamento no HV-UNIFIO e HVE-UENP, entre o período de maio a outubro de 2021. Para o grupo controle, foram incluídas cadelas clinicamente saudáveis, sem tumores mamários macroscopicamente identificáveis, com idade mínima de sete anos, ou seja,

compatível com a idade das cadelas portadoras de neoplasia, admitidas no HV-UNIFIO para OH eletiva no mesmo período.

No intervalo de tempo supracitado foram admitidas 34 cadelas, oito cadelas atenderam os critérios para o grupo controle e 26 para o grupo neoplasia mamária.

Grupo controle (GC): oito cadelas adultas sem neoformações mamárias, consideradas saudáveis após avaliação clínica e laboratorial. Nesses pacientes, mediante autorização dos proprietários, foi realizada a coleta de tecido mamário saudável por meio de biópsia incisional da mama inguinal direita.

Grupo neoplasia mamária (GNM): foram incluídas 26 cadelas adultas com neoformação mamária única ou múltipla, sem comorbidades clinicamente detectáveis, e sem presença de metástase após avaliação clínica, laboratorial e exames de imagem. Esses animais passaram por cirurgia de mastectomia de acordo com a recomendação individual de cada paciente, todos provenientes da rotina do HV-UNIFIO e HVE-UENP, durante o período do estudo.

4.4 ABORDAGEM CLÍNICA

Os animais do grupo neoplasia mamária passaram por estadiamento clínico oncológico de acordo com Cassali *et al.* (2014), realização de ultrassonografia abdominal e radiografias de tórax para investigação de metástase, e avaliação laboratorial com hemograma e dosagens séricas de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), albumina, globulina, proteína total, creatinina e ureia.

Após o estadiamento clínico, os pacientes foram submetidos ao tratamento cirúrgico por meio de mastectomia regional, radical unilateral ou radical bilateral. Os animais incluídos nesse estudo e submetidos ao tratamento cirúrgico tiveram os mesmos protocolos anestésicos.

Os animais do grupo controle passaram pela mesma avaliação clínica e laboratorial que os animais grupo neoplasia mamária, exceto os de imagem.

4.5 COLETA DAS AMOSTRAS SÉRICAS E TECIDUAIS

As amostras de soro para avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo são provenientes do dia do procedimento cirúrgico, coletadas antes de qualquer procedimento anestésico, de amostra de sangue colhida por punção jugular (10 mL) e acondicionado em tubos sem aditivo (BD Vacutainer[®], Becton-Dickson, New Jersey, USA), centrifugado 20 min e separado em alíquotas de 2ml. Todo o processamento

ocorreu o máximo possível na ausência de luz e as amostras foram armazenadas a -20°C sob proteção da luz até o momento das determinações por um período máximo de 180 dias.

4.5.1 Clivagem das peças e seleção das amostras teciduais

As peças provenientes de mastectomia foram avaliadas macroscopicamente para identificação das neoformações mamárias referidas e verificação da existência de outras lesões não identificadas previamente. Todas as mamas que compunham a peça cirúrgica foram amostradas, contendo ou não alterações macroscópicas. Das mamas macroscopicamente normais, coletou-se uma secção tecidual com cerca de 5mm de espessura imediatamente caudal à papila mamária para avaliação histopatológica e uma imediatamente cranial à papila para avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo. Das mamas contendo neoformações, coletou-se uma, três ou cinco amostras, a depender do tamanho da neoformação, conforme Cassali *et al.* (2014), para avaliação histopatológica, com duplicata para avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo.

As amostras provenientes de biopsia mamária das cadelas do grupo controle foram seccionadas ao meio, sendo um fragmento destinado à avaliação histopatológica e o outro à avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo.

Os tecidos mamários para avaliação do estresse oxidativo foram acondicionados em microtubos, identificados e armazenados a -20°C sob proteção da luz até o momento das determinações por um período máximo de 180 dias.

4.6 PROCESSAMENTO E AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Os fragmentos foram clivados, acondicionados em cassetes histológicos e imersos em solução de formol tamponado a 10% por 48 horas, sendo então transferidas para solução de álcool etílico 70% até o momento do processamento. Em seguida, as amostras foram submetidas à desidratação, diafanização (clareamento) e parafinização em processador automático de tecidos utilizando banhos progressivos de álcool, xilol e parafina em estado líquido, respectivamente. Os fragmentos teciduais foram então incluídos em parafina e os blocos mantidos sob refrigeração para posterior clivagem em micrótomo com espessura de 5µm. Os cortes histológicos foram deitados em lâminas histológicas que permaneceram em estufa a 56° C por 4 horas para o derretimento da parafina sendo então mantidas em temperatura

ambiente. Por fim, foi realizada a coloração com hematoxilina e eosina (HE) e a montagem com lamínula e resina sintética, após a secagem da qual estavam prontas para avaliação microscópica.

O diagnóstico das alterações microscópicas foi feito com base na classificação proposta por Cassali *et al.* (2014).

4.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E PARÂMETROS PARA A AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

Com base no resultado na avaliação histopatológica, foi confirmada a ausência de neoplasia mamária nas cadelas do GC e realizada a distinção entre cadelas portadoras de câncer (tendo ou não tumores benignos concomitantemente) e portadoras exclusivamente de tumor(es) benigno(s), naquelas do GNM.

Para verificar se a presença de neoplasia mamária é capaz de causar estresse oxidativo sistêmico, os parâmetros de estresse oxidativos foram determinados no soro das cadelas do GC (8 animais), de cadelas com neoplasia mamária maligna (22 animais) e com neoplasia mamária benigna (4 animais).

Para verificar se a presença de neoplasia mamária é capaz de causar estresse oxidativo tecidual, os parâmetros de estresse oxidativos foram determinados no tecido mamário das cadelas do GC (8 animais), e no tecido da mamário neoplásico maligno (22 tumores), benigno (7 tumores), e não neoplásico (26 mamas) das cadelas do GNM.

Os animais que tiveram diagnóstico de câncer de mama, tiveram os tecidos tumorais e normais divididos nos subgrupos: mama afetada por neoplasia maligna (M) e mama normal de cadelas com neoplasia maligna [M(N)] (Quadro 5). As cadelas com diagnóstico de somente tumor benigno, tiveram os tecidos tumorais e normais nos subgrupos: mamas acometidas com tumor benigno (B) e mama normal de cadelas somente com neoplasia benigna [B(N)] (Quadro 5). Não foram utilizados os tecidos tumorais benignos provenientes de pacientes com câncer.

QUADRO 5 – Divisão dos subgrupos dos tecidos mamários neoplásicos e normais.

	Cadelas com neoplasia mamária maligna	Cadelas somente com neoplasia mamária benigna	Cadelas grupo controle saudáveis
Tecido mamário sem neoplasia	14 [M(N)]	12 [B(N)]	8 (C)
Tecido mamário neoplásico	22 (M)	7 (B)	-

O estresse oxidativo foi avaliado a partir do soro e de homogeneizado tecidual, em bioquímico semiautomatizado (BIO 2000, BioPlus, Barueri, SP, Brasil) pela mensuração da CAT por quatro diferentes metodologias, da COT, da peroxidação lipídica pelas TBARS e da determinação dos antioxidantes ácido úrico segundo metodologia previamente descrita (ALMEIDA *et al.*, 2013; ALMEIDA *et al.*, 2017).

Os fragmentos de tecidos mamários foram homogeneizados com 500 µL de solução salina tamponada estéril (QIAGEN TissueRuptor II, Germany) por 2 minutos. Posteriormente foram centrifugados a 10.000 G por 15 minutos para obtenção do sobrenadante do homogeneizado de mama para as determinações dos parâmetros de estresse oxidativo teciduais, os quais foram normalizados em função do teor de proteínas totais determinadas pelo método colorimétrico do biureto.

A CAT foi determinada pela inibição da redução do cátion ABTS sozinho (CAT-ABTS) descrito por Erel (2004) ou associado à peroxidase (CAT-ABTS+HRP) descrito por Rubio *et al.* (2016b), pela redução férrica (CAT-FRAP) descrita por Benzie e Strain (1996) e pela redução cúprica (CAT-CUPRAC) descrita em cães por Rubio *et al.* (2016a).

A COT foi determinada em bioquímico semiautomatizado pelo método colorimétrico do xilenol laranja descrito por Erel (2005).

A peroxidação determinada pelas TBARS utilizou metodologia descrita por Hunter *et al.* (1985) a 545 nm, sendo os resultados obtidos após comparação das amostras a uma curva-padrão com concentrações variando de 0 a 100 µmol de malondialdeído/L. Todos os reagentes eram provenientes da Sigma-Aldrich Chemical Co.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram testadas quanto a normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) homoscedasticidade (teste de Bartlett). As diferenças entre os grupos de amostras teciduais foram verificadas pelos testes de ANOVA e pós-teste de Tukey ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. As diferenças entre os grupos de soro foram verificadas pelo teste t de Student não pareado ou Mann-Whitney. Os resultados foram apresentados em média e desvio padrão, ou mediana e valores mínimos e máximos. Todas as análises estatísticas foram efetuadas em programa computacional (GraphPad Prism, v.6.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA, www.graphpad.com), sendo considerados significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICA DOS ANIMAIS E DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

Para este estudo foram incluídas um total de 26 cadelas portadoras de neoplasia mamária. A idade média desses pacientes foi de $9,9 \pm 1,7$ anos (7 a 15 anos), enquanto no grupo controle a idade média foi de $9,12 \pm 1,45$ anos (7 a 12 anos). Do total de animais com neoplasia, 84,6% (22/26) tiveram diagnóstico de neoplasia maligna e 15,4% (4/26) de neoplasia benigna.

Na classificação histológica, as neoplasias malignas mais frequentes foram carcinoma em tumor misto 50% (16/32), carcinoma (*in situ*, solido, cribriforme, rico em glicogênio, papilar) 22,8% (7/32), adenomioepitelioma maligno 12,5% (4/32), carcinosarcoma 9,3% (3/32), e osteossarcoma 6,2% (2/32). Entre os benignos, os mais frequentes foram tumor misto benigno 73,3% (11/15), adenomioepitelioma 13,35% (2/15) e papiloma ductal 13,35% (2/15).

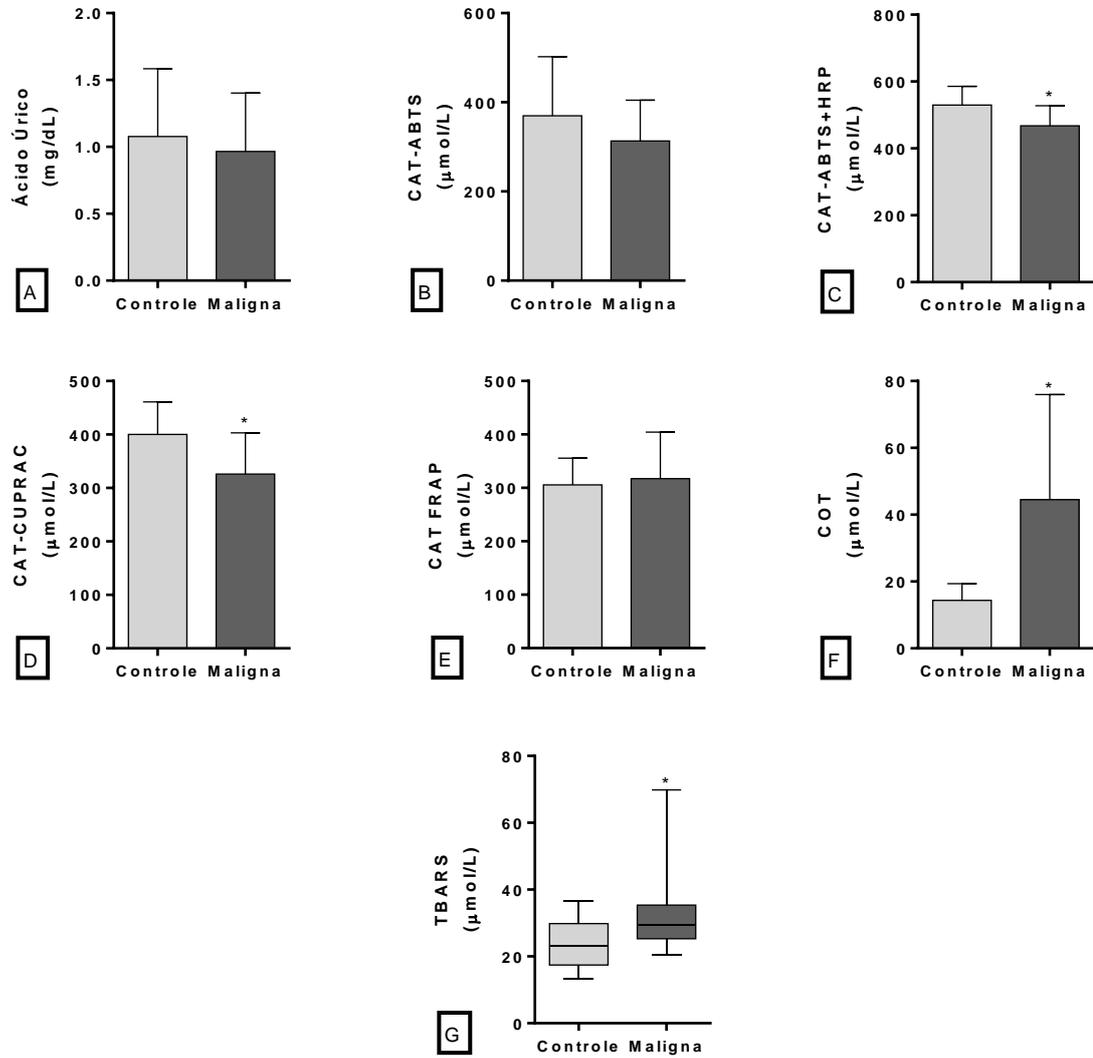
5.2 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

5.2.1 Sistêmico

A análise estatística do estresse oxidativo sistêmico foi realizada somente entre os grupos de animais com neoplasia maligna e o grupo controle devido ao baixo número de animais no grupo com neoplasia benigna.

Na avaliação sérica do estresse oxidativo, cães com neoplasia maligna apresentaram uma redução de antioxidantes pelos métodos ABTS+HRP (Figura 1C) e CUPRAC (Figura 1D), e aumento de oxidantes e da peroxidação lipídica pelas TBARS, em relação aos cães controle (Figura 1G e 1F). A avaliação da CAT pelos métodos FRAP e utilizando somente o ABTS não apresentaram diferença (Figura 1B e 1E), assim como a concentração do antioxidante ácido úrico (Figura 1A).

FIGURA 1 - Marcadores de estresse oxidativo sérico Ácido Úrico (A), CAT-ABTS (B), CAT-ABTS-HRP (C), CAT-CUPRAC (D), CAT-FRAP (E), COT (F) e peroxidação lipídica pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) sérica (G). A diferença estatisticamente significativa é indicada por * ($p < 0,05$).



5.2.2 Tecidual

As amostras provenientes de neoplasias malignas (M) apresentaram um aumento de antioxidantes (CAT) pelos métodos de ABTS com ou sem adição de HRP (Figura 2B e 2C) em relação aos tecidos não neoplásicos das cadelas com tumores malignos - N(M). Já pelo método de avaliação pela FRAP (Figura 2E), o grupo (M) apresentou aumento de antioxidantes em relação a todos os outros grupos. Em contrapartida, houve uma redução de oxidantes (COT) no grupo (M) em relação ao grupo controle (C) e das mamas não neoplásicas das cadelas com tumores benignos N(B) (Figura 2F).

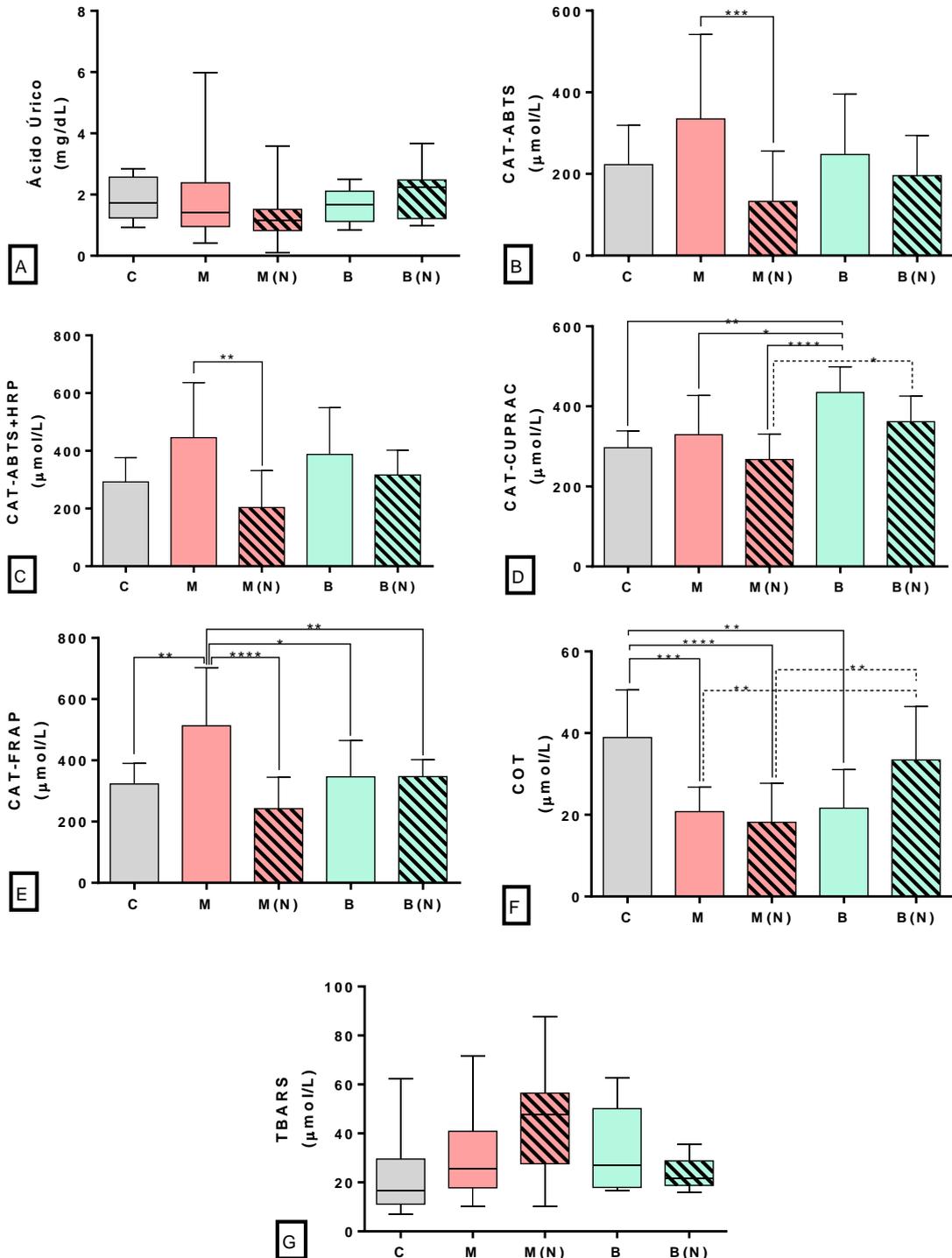
O grupo com amostras proveniente de tumores benignos (B) apresentou aumento da CAT-CUPRAC em relação a todos os outros grupos, exceto as mamas N(B) (Figura 2D). Houve redução de oxidantes totais nesses tecidos em relação ao grupo controle (Figura 2F).

Os tecidos mamários B(N) tiveram aumento de oxidantes totais (Figura 2F) e antioxidantes pela metodologia CUPRAC (Figura 2D) em relação aos tecidos M(N). O grupo M(N), teve diminuição de oxidantes totais e de antioxidantes pelo método CUPRAC, em relação aos grupos C e B respectivamente (Figura 2F e 2D).

Todos os outros grupos de tecidos, com exceção do grupo B(N), apresentaram diminuição dos oxidantes totais em relação ao grupo controle (Figura 2F).

Não houve diferença entre os grupos na avaliação da concentração do antioxidante ácido úrico tecidual e na peroxidação lipídica.

FIGURA 2 - Marcadores de estresse oxidativo tecidual Ácido Úrico (**A**), CAT-ABTS (**B**), CAT-ABTS+HRP (**C**), CAT-CUPRAC (**D**), CAT-FRAP (**E**), COT (**F**) e peroxidação lipídica pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) sérica (**G**). A diferença estatisticamente significativa é indicada por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) ou **** ($p < 0,0001$).



Legenda: tecido controle - (**C**); tecido mamário neoplásico maligno - (**M**); tecido mamário normal de animais com neoplasia maligna - [**M(N)**]; tecido mamário neoplásico benigno - (**B**); tecido mamário normal de animais com neoplasia benigna - [**B(N)**].

6 DISCUSSÃO

A neoplasia mamária é a principal causa de tumores que acometem as cadelas, representando de 50 a 70% de todos os tumores nesse subgrupo, estimando-se que os tumores malignos representam por volta de 80% de frequência no Brasil (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2003; SORENMO, 2003). Nesse estudo, a média de frequência de tumores mamários malignos foi de 84,6%, corroborando com o que os dados nacionais. As espécies reativas de oxigênio (ERO) são substâncias químicas reativas e instáveis, resultantes da oxirredução do oxigênio no metabolismo celular. Níveis elevados de ERO ou a falha na sua remoção resultam em estresse oxidativo, que causa graves distúrbios metabólicos e danos a macromoléculas biológicas, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, e pode estar associado ao mecanismo de carcinogênese (LEONEL *et al.*, 2014; TANJA *et al.*, 2008). Ainda existem poucos trabalhos a respeito do estresse oxidativo relacionado à neoplasia mamária em animais, uma das dificuldades em se trabalhar neste tema é o fato de que não há uma padronização dos métodos para mensurar os parâmetros de estresse oxidativo (ASKAR *et al.*, 2009; KARAYANNOPOULOU *et al.*, 2013; KHANNA *et al.*, 2012; SZCZUBIAŁ *et al.*, 2008; THIPPANI; KUMAR, 2020).

No presente estudo, foi observado que a neoplasia de mama induziu ao estresse oxidativo sérico e tecidual de formas distintas. No âmbito sistêmico caracterizou-se por uma redução da CAT, e aumento da COT juntamente com a peroxidação lipídica. Por outro lado, no tecido mamário neoplásico houve o oposto, com aumento da CAT, e redução da COT e conseqüente menor peroxidação lipídica.

A determinação de peroxidação lipídica através das TBARS, em que o malondialdeído é o principal composto resultante da oxidação lipídica, é amplamente utilizado como marcador de estresse oxidativo (TUG *et al.*, 2005). No presente estudo houve um aumento sérico significativo dos oxidantes e da peroxidação lipídica dos animais com câncer mamário em relação ao grupo controle.

A maioria das pesquisas observou diferença da peroxidação lipídica sérica entre pacientes com câncer de mama malignos e saudáveis (ASKAR *et al.*, 2009; KHANNA *et al.*, 2012; MACOTPET *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2017). No trabalho mais recente, Russo *et al.* (2021) utilizaram 144 cadelas com neoplasia mamária, e observaram aumento sérico significativo da peroxidação lipídica (2,0 e 2,7 vezes) no grupo neoplasia maligna e benigna respectivamente, em relação ao grupo controle.

Outras pesquisas mostraram que não houve diferença na peroxidação lipídica, porém redução nos níveis de antioxidantes α -tocoferol e β -caroteno, e aumento do antioxidante glutaciona (KARAYANNOPOULOU *et al.*, 2013; SZCZUBIAŁ *et al.*, 2008). A glutaciona possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo (ANDREANI *et al.*, 2017).

Existem resultados controversos a respeito da significância da diferença nos valores de peroxidação lipídica entre cães clinicamente saudáveis e cães com câncer mamário, e isso pode estar ligado a fatores de malignidade, progressão e cronicidade tumoral, diferenças entre os métodos utilizados, e o tipo de resposta antioxidante endógena e exógena dos animais (MCMICHAEL, 2007; TANJA *et al.*, 2008; VALKO *et al.*, 2006).

Em mulheres com câncer de mama, que apresentaram peroxidação lipídica e estresse oxidativo sistêmico significativos, houve aumento da atividade enzimática antioxidante, por meio do aumento concomitante das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CATA), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR) e glutaciona transferase (GST) (PANDE *et al.*, 2012; RAJNEESH *et al.*, 2008).

No presente trabalho, os animais com neoplasia maligna tiveram uma redução sérica significativa da CAT, pelos métodos ABTS+HRP e CUPRAC, junto ao aumento dos oxidantes totais, em relação ao grupo controle. Em um estudo com cadelas com neoplasia mamária Szczubial *et al.* (2008) observaram uma redução significativa da CAT no grupo com tumor maligno e benigno em relação ao grupo controle. No estudo em cães com linfoma multicêntrico também foi observado uma redução da CAT (WINTER *et al.*, 2009). Em mulheres com câncer de mama, apesar do aumento das enzimas antioxidantes, também houve uma redução da CAT, possivelmente pelo fato do sistema antioxidante estar atingindo seu limite de depuração das ERO (RAJNEESH *et al.*, 2008).

O sistema de defesa contra ERO conta com antioxidantes enzimáticos (SOD, CATA, GPx, GR e GST) e não enzimáticos (vitaminas A, C e E, glutaciona, flavonoides). A CAT é um importante biomarcador de estresse oxidativo, uma vez que ela define o efeito sinérgico entre esses vários componentes antioxidantes da amostra (MCMICHAEL, 2007). A resposta e eficiência dos mecanismos antioxidantes depende da intensidade, cronicidade e origem da produção de ERO, e podem sofrer variações em decorrência disso (MILLER; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA; MADSEN, 1993).

As diferenças nos valores entre os métodos utilizados para avaliação da CAT resultam do fato de que cada técnica avalia antioxidantes distintos (RUBIO *et al.*, 2016b). Os ensaios ABTS, FRAP e CUPRAC avaliam principalmente a albumina e o ácido úrico, além do ácido ascórbico, α -tocopherol e a bilirrubina (PINCHUK *et al.*, 2012; PRIOR; CAO, 1999). Porém enquanto na técnica com ABTS a albumina responde de 43 a 53% do valor total, e o ácido úrico representa 33%, no FRAP o valor do ácido úrico representa acima de 60%, além desse método não conseguir mensurar antioxidantes contendo um grupo tiol (BENZIE; STRAIN, 1996; CAMPOS *et al.*, 2009; EREL, 2004; PINCHUK *et al.*, 2012; PRIOR; CAO, 1999). Já ensaio CUPRAC mede além dos citados acima, os antioxidantes do grupo tiol e o β -caroteno (APAK *et al.*, 2005; CAMPOS *et al.*, 2009).

Neste estudo a determinação de estresse oxidativo tecidual foi avaliada pelos mesmos métodos utilizados para o soro. Houve estresse oxidativo nos tecidos neoplásicos, com aumento de antioxidantes e redução de oxidantes, sem diferença na peroxidação lipídica entre os grupos de tecidos com neoplasia e o grupo controle.

Nos tecidos mamários normais dos animais com neoplasia também apresentaram estresse oxidativo, com redução de antioxidantes nos animais com neoplasia maligna em relação aos benignos, e concentração de oxidantes de forma oposta, com aumento no grupo dos benignos em relação aos malignos.

As mamas normais dos pacientes com neoplasia benigna apesar de mostrarem redução dos oxidantes em relação ao grupo controle, não tiveram diferença estatística, o que mostra esse grupo com valores mais próximos às mamas normais dos animais sem neoplasia.

Estudos com avaliação tecidual de estresse oxidativo são escassos, e nenhum dos trabalhos avaliou a CAT e COT a partir dos métodos utilizados nessa pesquisa. Em estudo recente Thipanni e Kumar (2020), em um estudo com cães, utilizaram 68 amostras de tumores malignos (54,4%) e benignos (45,6%), e todos apresentaram aumento nas TBARS, junto às enzimas SOD e GST, e da glutatona, em relação ao tecido normal.

O aumento da expressão e atividade de enzimas antioxidantes SOD e CATA também foi encontrado em tecido tumoral mamário maligno por Andreani *et al.* (2017). Outros trabalhos também observaram diferença significativa na peroxidação lipídica no tecido mamário com câncer, junto a um aumento da glutatona e redução da

vitamina E (JAYASRI; PADMAJA; SAIBABA, 2016; KARAYANNOPOULOU *et al.*, 2013).

Em outro estudo mais recente, Karakurt *et al.* (2021) através da técnica de imuno-histoquímica, conseguiram realizar a marcação em tecidos com câncer mamário para o MDA e 8-Oxo-2'-desoxiguanosina, um marcador de dano oxidativo ao DNA, comprovando estresse oxidativo e lesão celular. No tecido mamário de mulheres com câncer, também houve aumento da peroxidação lipídica, mesmo com aumento da CAT, glutatona e das enzimas SOD, CATA e GPx (KUMARAGURUPARAN *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2014).

O papel do estresse oxidativo no microambiente tumoral vem sendo objetivo dos estudos em humanos. Após a hiperproliferação das células tumorais, uma alta produção de ERO é desencadeada, porém há uma adaptação e crescimento tecidual mesmo com esse ambiente altamente oxidativo (HALLIWELL, 2007; KLAUNIG *et al.*, 1998; REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016).

À medida que a peroxidação lipídica tem início, e deveria causar efeitos inflamatórios, senescência e apoptose, as células tumorais conseguem ativar o sistema antioxidante, aumentando o equilíbrio *redox* por meio da transcrição de fatores antioxidantes para otimizar a proliferação e assim, desviando-se da morte por senescência, apoptose ou ferroptose (DODSON; CASTRO-PORTUGUEZ; ZHANG, 2019; KARIHTALA; SOINI, 2007; REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016).

Durante a progressão tumoral e o desenvolvimento de metástases, as células tumorais se adaptam ao estresse oxidativo aumentando o NADPH de várias maneiras, incluindo a ativação de proteína quinase ativada por adenosina monofosfato, das vias pentose fosfato e metabolismo redutor de glutamina e folato. (HALLIWELL, 2007; REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016).

No presente estudo as TBARS não tiveram diferença significativa nos grupos teciduais. O aumento das substâncias antioxidantes, determinada pela CAT, e redução das substâncias oxidantes, determinada pela COT, sugerem que os mecanismos de defesa celular tiveram sucesso em neutralizar as ERO, e conseqüentemente protegeram da peroxidação lipídica tecidual. Além do aumento na produção de substâncias e enzimas antioxidantes pelo tecido tumoral, existe provavelmente um aumento do consumo local de antioxidantes plasmáticos, pelo microambiente tumoral, contribuindo para a sua redução sistêmica, levando a um aumento da oxidação e peroxidação lipídica sérica.

7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Desde o início da pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2, foram impostas medidas restritivas e de distanciamento pelos governos estaduais com objetivo reduzir as interações em comunidade, além de outros métodos de distanciamento físico, como o fechamento de locais de trabalho e de ensino, bem como a proibição de reuniões públicas, além de quarentenas e cordões sanitários. Nesse período, o HV-UEL teve seus atendimentos reduzidos para casos de urgência e emergência, e as cirurgias eletivas adiadas.

O objetivo do projeto foi avaliar o estresse oxidativo sistêmico e tecidual em cadelas acometidas por neoplasia mamária, porém, com o adiamento de cirurgias eletivas os procedimentos de mastectomia não puderam ser realizados, comprometendo a coleta de amostras para análise. A quantidade de amostras deve ser significativa para avaliação estatística, e os testes laboratoriais precisam ocorrer em bloco devido as técnicas de avaliação do estresse oxidativo.

É importante salientar que as amostras devem ser armazenadas em temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de processamento e análise, impossibilitando a coleta e o armazenamento em locais que não possuem tais recursos. O período máximo para a avaliação de amostras em temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ é de 180 dias, o que reduz o tempo de intervalo para o experimento nessas condições.

Em consequência desse panorama, dada a impossibilidade de coleta de amostras no HV-UEL, foi necessária a mudança para outras instituições que não possuem armazenamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, reduzindo o tempo hábil para a conclusão do projeto de pesquisa. Em função da redução do prazo do projeto, só foi possível coletar amostras de pacientes com tumores mamários nesse período, e houve uma baixa frequência de tumores benignos, limitando os resultados e o delineamento inicialmente traçado.

8 CONCLUSÃO

A presença de câncer mamário em cadelas contribui para um estado de estresse oxidativo sérico e tecidual, com variações distintas nas respostas orgânicas e nos marcadores de estresse oxidativo.

Ocorreu estresse oxidativo sistêmico com redução de antioxidantes e aumento de oxidantes e peroxidação lipídica, enquanto no tecido mamário neoplásico houve compensação do estresse oxidativo com aumento de antioxidantes, redução dos oxidantes e sem diferença da peroxidação lipídica.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, B. F. M.; NARCISO, L. G.; MELO, L. M.; PREVE, P. P.; BOSCO, A. M.; LIMA, V. M.F.; CIARLINI, P. C. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. **Veterinary Journal**, v. 198, n. 3, p. 599–605, 2013.
- ALMEIDA, B. F. M. *et al.* The effects of increased heme oxygenase-1 on the lymphoproliferative response in dogs with visceral leishmaniasis. **Immunobiology**, v. 222, n. 5, p. 693–703, 2017.
- ANDRADE, E. R.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79–85, 2010.
- ANDREANI, G.; AVALLONE, G.; FERLIZZA, E.; ISANI, G. Antioxidant enzymes in canine mammary tumors. **Acta Veterinaria**, v. 67, n. 1, p. 121–130, 2017.
- ANDREYEV, A. Y.; KUSHNAREVA, Y. E.; STARKOV, A. A. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. **Biochemistry (Moscow)**, v. 70, n. 2, p. 200-214, 2005.
- APAK, R.; GÜÇLÜ, K.; ÖZYÜREK, M.; ESİN KARADEMİR, S.; ALTUN, M. Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: the CUPRAC method. **Free radical research**, v. 39, n. 9, p. 949–961, 2005.
- ASKAR, T. K.; SALMANOGLU, B.; SALMANOGLU, R.; ERKAL, N.; BESKAYA, A. Changes in the oxidative status and serum trace element levels in dogs with mammary tumours. **Acta Veterinaria**, v. 59, n. 4, p. 405–411, 2009.
- AZMANOVA, M.; PITTO-BARRY, A. Oxidative Stress in Cancer Therapy: Friend or Enemy? **ChemBioChem**, e202100641, 2022. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cbic.202100641>>.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BARRETO, B. L. M. A. **Caracterização de Antioxidantes com Potencial Interesse Industrial**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto Politécnico do Porto, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Porto, 2008.
- BEAUVAIS, W.; CARDWELL, J. M.; BRODBELT, D. C. The effect of neutering on the risk of mammary tumours in dogs - a systematic review. **Journal of Small Animal Practice**. v. 53, n. 6, p. 314-322, 2012.
- BELANGER, J. M.; BELLUMORI, T. P.; BANNASCH, D. L.; FAMULA, T. R.; OBERBAUER, A. M. Correlation of neuter status and expression of heritable disorders. **Canine Genetics and Epidemiology**, v. 4, n. 1, p. 1–12, 2017.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BREITZIG, M.; BHIMINENI, C.; LOCKEY, R.; KOLLIPUTI, N. 4-Hydroxy-2-nonenal: A critical target in oxidative stress? **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 311, n. 4, p. 537–543, 2016.

BRODEY, R. S.; FIDLER, I. J.; HOWSON, A. E. The relationship of estrous irregularity, pseudopregnancy, and pregnancy to the development of canine mammary neoplasms. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 149, n. 8, p. 1047–1049, 1966.

CALLE, E. E.; KAAKS, R. Overweight, obesity and cancer: Epidemiological evidence and proposed mechanisms. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 8, p. 579-591, 2004.

CAMPOS, C.; GUZMÁN, R.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, E.; CASADO, Á. Evaluation of the copper(II) reduction assay using bathocuproinedisulfonic acid disodium salt for the total antioxidant capacity assessment: the CUPRAC-BCS assay. **Analytical biochemistry**, v. 392, n. 1, p. 37–44, 2009.

CARMICHAEL, A. R.; BATES, T. Obesity and breast cancer: A review of the literature. **Breast**, v. 13, n. 2, p. 85-92, 2004.

CASSALI, G. D.; GOBBI, H.; MALM, C.; SCHMITT, F. C. Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: Comparative features with human tumours. **Cytopathology**, v. 18, n. 3, p. 191–196, 2007.

CASSALI, G. D. *et al.* Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors 2013. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 7, n. 2, p. 38–69, 2014.

CASSALI, G.D.; JARK, P.C.; GAMBA, C.; DAMASCENO, K.A.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A. B.; FERREIRA, E.; HORTA, R. S.; FIRMO, B. F.; SUEIRO, F.A.R.; RODRIGUES, L.C.S.; NAKAGAKI, K.Y.R. Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine and feline mammary tumors-2019. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 13, n. 3, p. 555–574, 2020.

CHANG, C. C.; TSAI, M. H.; LIAO, J. W.; CHAN, J. P. W.; WONG, M. L.; CHANG, S. C. Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 235, n. 4, p. 391–396, 2009.

CHHUNCHHA, B.; KUBO, E.; SINGH, D.P. Sulforaphane-Induced Klf9/Prdx6 Axis Acts as a Molecular Switch to Control Redox Signaling and Determines Fate of Cells. **Cells**, v. 8, n. 10, p. 1159, 2019.

COOLEY, D. M.; BERANEK, B. C.; SCHLITTLER, D. L.; GLICKMAN, N. W.; GLICKMAN, L. T.; WATERS, D. J. Endogenous gonadal hormone exposure and bone sarcoma risk. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 11, n. 11, p. 1434–1440, 2002.

COTINGUIBA, G. G.; SILVA, J.; AZEVEDO, R. R.; ROCHA, T. J. M.; SANTOS, A. F. Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. **Journal of Health Sciences**, v. 15, n. 3, p. 231–238, 2013.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; ROCHA, N. S.; FERNANDES, S. C. Neoplasias mamárias. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B. **Oncologia em cães e gatos**. 2ª ed. São Paulo: Roca, 2016. p. 499–516.

DEVASAGAYAM, T. P.A.; BOLOOR, K. K.; RAMASARMA, T. Methods for estimating lipid peroxidation: An analysis of merits and demerits. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 40, n. 5, p. 300-308, 2003.

DIAS, M. L. M.; ANDRADE, J. M. L.; DE CASTRO, M. B.; GALERA, P. D. Survival analysis of female dogs with mammary tumors after mastectomy: Epidemiological, clinical and morphological aspects. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 3, p. 181–186, 2016.

DHILLON, A. S.; HAGAN, S.; RATH, O.; KOLCH, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3279-3290, 2007.

DODSON, M.; CASTRO-PORTUGUEZ, R.; ZHANG, D. D. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. **Redox biology**, v. 23, 2019.

EGENVALL, A.; BONNETT, B. N.; ÖHAGEN, P.; OLSON, P.; HEDHAMMAR, Å.; VON EULER, H. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 69, n. 1–2, p. 109–127, 2005.

EIJKELENBOOM, A.; BURGERING, B.M.T. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 2, p. 83–97, 2013.

EREL, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1103–1111, 2005.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 277–285, 2004.

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

FARAONIO, R.; VERGARA, P.; DI MARZO, D.; PIERANTONI, M.G.; NAPOLITANO, M.; RUSSO, T.; CIMINO, F. p53 Suppresses the Nrf2-dependent Transcription of

Antioxidant Response Genes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 52, p. 39776–39784, 2006.

FELICIANO, M. A. R.; SILVA, A. S.; PEIXOTO, R. V. R.; GALERA, P. D.; VICENTE, W. R. R. Estudo clínico, histopatológico e imunoistoquímico de neoplasias mamárias em cadelas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 5, p. 1094–1100, 2012.

FERREIRA, A. L.; MATSUBARA, L. S. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. **Revista da Associação Médica Brasileira (1992)**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021.

GAL, K. L.; IBRAHIM, M. X.; WIEL, C.; SAYIN, V. I.; AKULA, M. K.; KARLSSON, C.; DALIN, M. G.; AKYÜREK, L. M.; LINDAHL, P.; NILSSON, J.; BERGO, M. O. Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. **Science translational medicine**, v. 7, n. 308, 2015.

GEIL, R. G.; LAMAR, J. K. FDA studies of estrogen, progestogens, and estrogen/progestogen combinations in the dog and monkey. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 3, n. 1–2, p. 179–193, 1977.

GILL, J. G.; PISKOUNOVA, E.; MORRISON, S. J. Cancer, Oxidative Stress, and Metastasis. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, v. 81, n. 1, p. 163–175, 2016.

GILES, R. C.; KWAPIEN, R. P.; GEIL, R. G.; CASEY, H. W. Mammary Nodules in Beagle Dogs Administered Investigational Oral Contraceptive Steroids. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 60, n. 6, p. 1351–1364, 1978.

GOLDSCHMIDT, M. H.; PEÑA, L.; ZAPPULLI, V. Tumors of the Mammary Gland. **Tumors in Domestic Animals**, p. 723–765, 2016.

HABTETSION, T.; DING, Z. C.; PI, W.; LI, T.; LU, C.; CHEN, T.; XI, C.; SPARTZ, H.; LIU, K.; HAO, Z.; MIVECHI, N.; HUO, Y.; BLAZAR, B. R.; MUNN, D. H.; ZHOU, G. Alteration of Tumor Metabolism by CD4+ T Cells Leads to TNF- α -Dependent Intensification of Oxidative Stress and Tumor Cell Death. **Cell Metabolism**, v. 28, n. 2, p. 228–242, 2018.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and cancer: Have we moved forward? **Biochemical Journal**. v. 401, n. 1, p. 1–11, 2007.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 124, n. 2, p. 231-255, 2004.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HAYES, J. D.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; TEW, K. D. Oxidative Stress in Cancer. **Cancer Cell**, v. 38, n. 2, p. 167–197, 2020.

HART, L. A.; HART, B. L. An Ancient Practice but a New Paradigm: Personal Choice for the Age to Spay or Neuter a Dog. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, n. 3, 2021.

HIEMSTRA, S.; NIEMEIJER, M.; KOEDOOT, E.; WINK, S.; KLIP, J. E.; VLASVELD, M.; DE ZEEUW, E.; VAN OS, B.; WHITE, A.; WATER, B. V. Comprehensive Landscape of Nrf2 and p53 Pathway Activation Dynamics by Oxidative Stress and DNA Damage. **Chemical Research in Toxicology**, v. 30, n. 4, p. 923–933, 2017.

HOULIHAN, K. E. A literature review on the welfare implications of gonadectomy of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 250, n. 10, p. 1155-1166, 2017.

HOWE, L. Current perspectives on the optimal age to spay/castrate dogs and cats. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, v. 6, p. 171-180, 2015.

HORTA, R. S.; LAVALLE, G. E.; CUNHA, R. M. de C.; MOURA, L. L. de; ARAÚJO, Roberto B. de; CASSALI, G. D. Influence of Surgical Technique on Overall Survival, Disease Free Interval and New Lesion Development Interval in Dogs with Mammary Tumors. **Advances in Breast Cancer Research**, v. 03, n. 02, p. 38–46, 2014.

JAIN, N. C. Hematologic Techniques. *In*: JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 4^a ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. p. 20–86.

JAKUBCZYK, K.; DEC, K.; KAŁDUŃSKA, J.; KAWCZUGA, D.; KOCHMAN, J.; JANDA, K. Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. **Polski merkuriusz lekarski : organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego**, v. 48, n. 284, p. 124-127, 2020.

JAYASRI, K.; PADMAJA, K.; SAIBABA, M. Altered oxidative stress and carbohydrate metabolism in canine mammary tumors. **Veterinary World**, v. 9, n. 12, p. 1489–1492, 2016.

KARAKURT, E.; KURU, M.; DAĞ, Serpil; BEYTUT, E.; ORAL, H.; NUHOĞLU, H.; YILDIZ, A. Presence and importance of oxidative stress parameters in malignant mammary gland tumors in dogs. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 27, n. 4, p. 517–523, 2021.

KARAYANNOPOULOU, M.; FYTIANOU, A.; ASSALOU MIDIS, N.; PSALLA, D.; CONSTANTINIDIS, T. C.; KALDRYMIDOU, E.; KOUTINAS, A. F. Markers of lipid peroxidation and α -tocopherol levels in the blood and neoplastic tissue of dogs with malignant mammary gland tumors. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 42, n. 3, p. 323–328, 2013.

KARIHTALA, P.; SOINI, Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. **APMIS**, v. 115, n. 2, p. 81-103, 2007.

KHANNA, S.; PANDE, D.; NEGI, R.; KARKI, K.; KHANNA, RS.; KHANNA, HD. Oxidative stress induced damage in benign and malignant breast diseases: histopathological and biochemical aspects. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, v. 8, n. 1, p. 209–214, 2012.

KIM, S. J.; KIM, H. S.; SEO, Y. R. Understanding of ROS-Inducing Strategy in Anticancer Therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1-12, 2019.

KLAUNIG, J. E.; XU, Y.; ISENBERG, J. S.; BACHOWSKI, S.; KOLAJA, K. L.; JIANG, J.; STEVENSON, D. E.; WALBORG, E. F. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, n. SUPL. 1, p. 289–295, 1998.

KUMARAGURUPARAN, R.; SUBAPRIYA, R.; VISWANATHAN, P.; NAGINI, S. Tissue lipid peroxidation and antioxidant status in patients with adenocarcinoma of the breast. **Clinica Chimica Acta**, v. 325, n. 1–2, p. 165–170, 2002.

LAMBETH, J. D.; KAWAHARA, T.; DIEBOLD, B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 3, p. 319-331, 2007.

LAVALLE, G. E.; BERTAGNOLLI, A. C.; TAVARES, W. L.F.; CASSALI, G. D. Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: Correlation with angiogenesis and overall survival. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 6, p. 1275–1280, 2009.

MACEWEN, E. G.; HARVEY, H. J.; PATNAIK, A. K.; MOONEY, S.; HAYES, A.; KURZMAN, I.; HARDY, W. D. Evaluation of effects of levamisole and surgery on canine mammary cancer. **Journal of Biological Response Modifiers**, v. 4, n. 4, p. 418–426, 1985.

MACOTPET, A.; SUKSAWAT, F.; SUKON, P.; PIMPAKDEE, K.; PATTARAPANWICHEN, E.; TANGRASSAMEEPRASERT, R.; BOONSIRI, P. Oxidative stress in cancer-bearing dogs assessed by measuring serum malondialdehyde. **BMC Veterinary Research**, v. 9, n. 1, p. 1–6, 2013.

MAGDER, S. Reactive oxygen species: Toxic molecules or spark of life? **Critical Care**, v. 10, n. 1, p. 1-18, 2006.

MARCONATO, L.; ROMANELLI, G.; STEFANELLO, D.; GIACOBONI, C.; BONFANTI, U.; BETTINI, G.; FINOTELLO, R.; VERGANTI, S.; VALENTI, P.; CIARAMELLA, L.; ZINI, E. Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory carcinoma: 43 cases (2003-2008). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 235, n. 8, p. 967–972, 2009.

MARTÍN DE LAS MULAS, J.; ORDÁS, J.; MILLÁN, Y.; FERNÁNDEZ-SORIA, V.; RAMÓN Y CAJAL, S. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: An immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 80, n. 3, p. 363–367, 2003.

MARVEL, S. J. Concepts in Sterilization. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, jan. 2022. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2021.11.003>.

MCMICHAEL, M. A. Oxidative stress, antioxidants, and assessment of oxidative stress in dogs and cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 231, n. 5, p. 714-720, 2007.

MILLER, J K; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; MADSEN, F C. Oxidative Stress, Antioxidants, and Animal Function. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 9, p. 2812–2823, 1993.

MISDORP, W. Canine mammary tumours: protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. **The Veterinary quarterly**, v. 10, n. 1, p. 26–33, 1988.

MISDORP, W.; HART, A. A.M. Canine mammary cancer: II. Therapy and causes of death. **Journal of Small Animal Practice**, v. 20, n. 7, p. 395–404, 1979.

MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMEN, E; LIPSCOMB, T. P. Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat, 2nd ser., vol. 7. **Armed Forces Institute of Pathology in cooperation with the American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology**, Washington, DC, p. 59, 1999.

MIYAMOTO, S. **Hidroperóxidos de lipídios como fonte biológica de oxigênio singlete**: estudos com marcação isotópica, espectrometria de massas e luminescência. 2005. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005. doi:10.11606/T.46.2005.tde-12042007-150108.

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

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 3, p. 173-182, 2006.

NUNES, F. C.; CAMPOS, C. B.; TEIXEIRA, S. V.; BERTAGNOLLI, A. C.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D. Epidemiological, clinical and pathological evaluation of overall survival in canines with mammary neoplasms. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 70, n. 6, p. 1714–1722, 2018.

OLIVEIRA, L.; OLIVEIRA, R. T.; LORETTI, A. P.; RODRIGUES, R.; DRIEMEIER, D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 2, p. 105, 2003.

OLIVEIRA FILHO, J. C.; KOMMERS, G. D.; MASUDA, E. K.; MARQUES, B. M. F. P.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Retrospective study of 1,647 mammary gland tumors in dogs. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 177–185, 2010.

OWEN, L. TNM Classification of tumours in domestic animals. **World Health Organisation**, p. 1–52, 1980.

OZBEN, T. Oxidative stress and apoptosis: Impact on cancer therapy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 9, p. 2181–2196, 2007.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 315–424, 2007.

PANDE, D.; NEGI, R.; KARKI, K.; KHANNA, S.; KHANNA, R. S.; KHANNA, H. D. Oxidative damage markers as possible discriminatory biomarkers in breast carcinoma. **Translational Research**, v. 160, n. 6, p. 411–418, 2012.

PARK, J. L.; LUCCHESI, B. R. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. **Ann Thorac Surg**, v. 68, n. 5, 1905–1912, 1999.

PEIRIS-PAGÈS, M.; MARTINEZ-OUTSCHOORN, U. E.; SOTGIA, F.; LISANTI, M. P. Metastasis and Oxidative Stress: Are Antioxidants a Metabolic Driver of Progression? **Cell metabolism**, v. 22, n. 6, p. 956–958, 2015.

PÉREZ ALENZA, D.; RUTTEMAN, G. R.; PEÑA, L.; BEYNEN, A. C.; CUESTA, P. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 12, n. 3, p. 132–139, 1998.

PÉREZ ALENZA, M. D.; TABANERA, E.; PEÑA, L. Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 8, p. 1110–1114, 15 out. 2001.

PERILLO, B.; DI DONATO, M.; PEZONE, A.; DI ZAZZO, E.; GIOVANNELLI, P.; GALASSO, G.; CASTORIA, G.; MIGLIACCIO, A. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 52, n. 2, p. 192–203, 2020.

PINCHUK, I.; SHOVAL, H.; DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D. Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays. **Chemistry and physics of lipids**, v. 165, n. 6, p. 638–647, 2012.

PISKOUNOVA, E.; AGATHOCLEOUS, M.; MURPHY, M. M.; HU, Z.; HUDDLESTUN, S. E.; ZHAO, Z.; LEITCH, A. M.; JOHNSON, T. M.; DEBERARDINIS, R. J.; MORRISON, S. J. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. **Nature**, v. 527, n. 7577, p. 186–191, 2015.

POLI, G.; SCHAUR, R. J.; SIEMS, W. G.; LEONARDUZZI, G. 4-Hydroxynonenal: A membrane lipid oxidation product of medicinal interest. **Medicinal Research Reviews**, v. 28, n. 4, p. 569-631, 2008.

PRIOR, R. L.; CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 11–12, p. 1173–1181, 1999.

PRYOR, W. A.; STANLEY, J. P.; BLAIR, E. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. **Lipids**, v. 11, n. 5, p. 370–379, 1976.

RAJNEESH, C. P.; MANIMARAN, A.; SASIKALA, K. R.; ADAIKAPPAN, P. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with breast cancer. **Singapore Medical Journal**, v. 49, n. 8, p. 640–643, 2008.

RAPOSO, T. P.; ARIAS-PULIDO, H.; CHAHER, N.; FIERING, S. N.; ARGYLE, D. J.; PRADA, J.; PIRES, I.; QUEIROGA, F. L. Comparative aspects of canine and human inflammatory breast cancer. **Seminars in Oncology**, v. 44, n. 4, p. 288–300, 2017.

RAY, G.; BATRA, S.; SHUKLA, N. K.; DEO, S.; RAINA, Vinod; ASHOK, S.; HUSAIN, S. A. Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 59, n. 2, p. 163–170, 2000.

REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1863, n. 12, p. 2977–2992, 2016.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.

RIBAS, C. R.; DORNBUSCH, P. T.; DE FARIA, M. R.; WOUK, A. F. P. de F.; CIRIO, S. M. Alterações Clínicas, Epidemiológicas, Citológicas, Histológicas e Estadiamento de Cães com Neoplasias Mamárias. **Archives of Veterinary Science**, v. 17, n. 1, p. 60–38, 2012.

RIBAS, C. R.; DORNBUSCH, P. T.; DE FARIA, M. R.; FIGUEIREDO, A. F. P. de; CIRIO, S. M. Alterações clínicas relevantes em cadelas com neoplasias mamárias estadiadas. **Archives of Veterinary Science**, v. 17, n. 1, p. 60–38, 2012.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H. de; PELÚZIO, M. do C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P. da; QUEIROZ, M. E. L. R. de. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, 2005.

RUBIO, C. P.; TVARIJONAVICIUTE, A.; MARTINEZ-SUBIELA, S.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; CERÓN, J. J. Validation of an automated assay for the measurement of cupric reducing antioxidant capacity in serum of dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 1, 2016a.

RUBIO, C. P.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; MARTINEZ-SUBIELA, S.; TVARIJONAVICIUTE, A.; ARNAO, M. B.; CERON, J. J. Validation of three automated assays for total antioxidant capacity determination in canine serum samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 28, n. 6, p. 693–698, 2016b.

RUSSO, C.; SIMONELLI, S. M.; LUZ, M. B.; CARRERA, A. C.; MORENO, I. F.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Oxidative stress in female dogs with mammary neoplasms. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 41, p. 2021, 2021.

SAKURAI, K.; SAWAMURA, T. Stress and vascular responses: Endothelial dysfunction via lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1: Close relationships with oxidative stress. **J Pharmacol Sci**, v. 91, n. 3, p. 182–186, 2003.

SÁNCHEZ-ÁLVAREZ, M.; STRIPPOLI, R.; DONADELLI, M.; BAZHIN, A. V.; CORDANI, M. Sestrins as a Therapeutic Bridge between ROS and Autophagy in Cancer. **Cancers**, v. 11, n. 10, p. 1415, 2019.

SÁNCHEZ-PÉREZ, Y.; CARRASCO-LEGLEU, C.; GARCÍA-CUELLAR, C.; PÉREZ-CARREÓN, J.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, S.; SALCIDO-NEYOY, M.; ALEMÁN-LAZARINI, L.; VILLA-TREVIÑO, S. Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 217, n. 1, p. 25–32, 2005.

SANTOS, A. A.; LOPES, C. C.; RIBEIRO, J. R.; MARTINS, L. R.; SANTOS, J. C.; AMORIM, I. F.; GÄRTNER, F.; MATOS, A. J. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: A multivariable survival study. **BMC Veterinary Research**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2013.

SANTOS, C. X. C.; TANAKA, L. Y.; WOSNIAK, J.; LAURINDO, F. R. M. Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 10, p. 2409–2427, 2009.

SASSI, F.; BENAZZI, C.; CASTELLANI, G.; SARLI, G. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. **BMC Veterinary Research**, v. 6, 2010.

SCHNEIDER, R. Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. **Cancer**, v. 26, n. 2, p. 419–426, 1970.

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

SELMAN, P. J.; VAN GARDEREN, E.; MOL, J. A.; VAN DEN INGH, T. S.G.A.M. Comparison of the histological changes in the dog after treatment with the progestins medroxyprogesterone acetate and proligestone. **Veterinary Quarterly**, v. 17, n. 4, p. 128–133, 1995.

SHACTER, E.; BEECHAM, E. J.; COVEY, J. M.; KOHN, K. W.; POTTER, M. Activated neutrophils induce prolonged DNA damage in neighboring cells. **Carcinogenesis**, v. 9, n. 12, p. 2297–2304, 1988.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox biology**, v. 4, p. 180–183, 2015.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. **Annu. Rev. Biochem**, v. 86, p. 715–748, 2017.

SILVA, C. T. D.; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 38–42, 2014.

SIMON, D.; SCHOENROCK, D.; NOLTE, I.; BAUMGÄRTNER, W.; BARRON, R.; MISCHKE, R. Cytologic examination of fine-needle aspirates from mammary gland tumors in the dog: Diagnostic accuracy with comparison to histopathology and association with postoperative outcome. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 4, p. 521–528, 2009.

SLEECKX, N.; DE ROOSTER, H.; VELDHUIS KROEZE, E. J.B.; VAN GINNEKEN, C.; VAN BRANTEGEM, L. Canine mammary tumours, an Overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 6, p. 1112–1131, 2011.

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

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

SMITH, A. N. **The role of neutering in cancer development. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice***.v. 44, n. 5, p. 965-975, 2014

SORENMO, K. U.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M. H. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. ***Veterinary Pathology***, v. 48, n. 1, p. 85–97, 2011.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. ***Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice***. v. 33, n. 3, p. 573-596, 2003.

SORENMO, K. U.; WORLEY, D. R.; GOLDSCHMIDT, M. H. Tumors of the Mammary Gland. ***Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology: Fifth Edition***. p. 538–556, 2013.

SOUZA, B.; CARDOSO, C. V.; POPPE, S. C.; BONDAN, E. F. Lipid peroxidation in female dogs bearing mammary gland carcinomas. ***Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia***, v. 69, n. 5, p. 1335–1338, 2017.

SOUZA, C. H.; TOLEDO-PIZA, E.; AMORIN, R.; DI NARDI, A. B.; TOBIAS, K. M. Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: Clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. ***Canadian Veterinary Journal***, v. 50, n. 5, p. 506–510, 2009.

STOCKS, J.; DORMANDY, T. L. The Autoxidation of Human Red Cell Lipids Induced by Hydrogen Peroxide. ***British Journal of Haematology***, v. 20, n. 1, p. 95–111, 1971.

STØVRING, M.; MOE, L.; GLATTRE, E. A population-based case-control study of canine mammary tumours and clinical use of medroxyprogesterone acetate. ***APMIS***, v. 105, n. 8, p. 590–596, 1997.

STRATMANN, N.; FAILING, K.; RICHTER, A.; WEHREND, A. Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. ***Veterinary Surgery***, v. 37, n. 1, p. 82–86, 2008.

SZCZUBIAŁ, M.; KANKOFER, M.; ŁOPUSZYŃSKI, W.; DĄBROWSKI, R.; LIPKO, J. Oxidative stress parameters in bitches with mammary gland tumours. ***Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine***, v. 51, n. 7–8, p. 336–340, 2004.

SZCZUBIAŁ, M.; KANKOFER, M.; ALBERA, E.; ŁOPUSZYŃSKI, W.; DĄBROWSKI, R. Oxidative/antioxidative status of blood plasma in bitches with mammary gland tumours. ***Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy***, v. 52, n. 2, p. 255–259, 2008.

TANJA, P.; ALENKA, N. S.; BUTINAR, J.; NATAŠA, T.; MARIJA, P.; BETTINA, K.; KESSLER, M. Antioxidant status in canine cancer patients. ***Acta Veterinaria***, v. 58, n. 2–3, p. 275–286, 2008.

TAYLOR, G. N.; SHABESTARI, L.; WILLIAMS, J.; MAYS, C. W.; ANGUS, W.; MCFARLAND, Susan. Mammary Neoplasia in a Closed Beagle Colony. **Cancer Research**, v. 36, n. 8, p. 2740–2743, 1976.

THIPPANI, C.; KUMAR, A. Investigation of the Antioxidant Status in Canine Tumours. **International Journal of Livestock Research**, v. 10, n. 0, p. 1, 2020.

THURÓCZY, J.; REISVAAG, G. J.K.; PERGE, E.; TIBOLD, A.; SZILÁGYI, J.; BALOGH, L. Immunohistochemical Detection of Progesterone and Cellular Proliferation in Canine Mammary Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n. 2–3, p. 122–129, ago. 2007.

TORRES DE LA RIVA, G.; HART, B. L.; FARVER, T. B.; OBERBAUER, A. M.; MESSAM, L. L. V.; WILLITS, N.; HART, L. A. Neutering Dogs: Effects on Joint Disorders and Cancers in Golden Retrievers. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 55937, 2013.

TUG, T.; KARATAS, F.; TERZI, S. M.; OZDEMIR, N. Comparison of serum malondialdehyde levels determined by two different methods in patients with COPD: HPLC or TBARS methods. **Laboratory Medicine**, v. 36, n. 1, p. 41–44, 2005.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiology**, v. 552, n. 2, p. 335-344, 2003.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VAN LENTE, F. Free Radicals. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 12, p. 374–377, 1993.

VAN LOENHOUT, J.; PEETERS, M.; BOGAERTS, A.; SMITS, E.; DEBEN, C. Oxidative Stress-Inducing Anticancer Therapies: Taking a Closer Look at Their Immunomodulating Effects. **Antioxidants**, v. 9, n. 12, p. 1-19, 2020.

VERONESI, M. C.; BATTOCCHIO, M.; RIZZI, C.; SIRONI, G. Relationship between dysplastic and neoplastic mammary lesions and pseudopregnancy in the bitch. **Veterinary Research Communications**, v. 27, n. SUPPL. 1, p. 245–247, 2003.

WANG, C.; YU, J.; WANG, H.; ZHANG, J.; WU, N. Lipid peroxidation and altered antioxidant status in breast adenocarcinoma patients. **Drug Research**, v. 64, n. 12, p. 690–692, 2014.

WINTER, J. L.; BARBER, L. G.; FREEMAN, L.; GRIESSMAYR, P. C.; MILBURY, P. E.; BLUMBERG, J. B. Antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 2, p. 311–316, 2009.

XIAO, G. G.; WANG, M.; LI, N.; LOO, J. A.; NEL, A. E. Use of Proteomics to Demonstrate a Hierarchical Oxidative Stress Response to Diesel Exhaust Particle

Chemicals in a Macrophage Cell Line. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 50, p. 50781–50790, 2003.

ZAMZAMI, N.; MARCHETTI, P.; CASTEDO, M.; HIRSCH, T.; SUSIN, S. A.; MASSE, B.; KROEMER, G. Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. **FEBS letters**, v. 384, n. 1, p. 53–57, 1996.

ZHANG, B.; WANG, Y.; SU, Y. Peroxiredoxins, a novel target in cancer radiotherapy. **Cancer letters**, v. 286, n. 2, p. 154–160, 2009.

ZINK, M. C.; FARHOODY, P.; ELSER, Samra E.; RUFFINI, Lynda D.; GIBBONS, Tom A.; RIEGER, Randall H. Evaluation of the risk and age of onset of cancer and behavioral disorders in gonadectomized Vizslas. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 244, n. 3, p. 309–319, 2014.

ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 1, p. 38–41, 2001.

ZUCKER, S. N.; FINK, E. E.; BAGATI, A.; MANNAVA, S.; BIANCHI-SMIRAGLIA, A.; BOGNER, P. N.; WAWRZYNIAK, J. A.; FOLEY, C.; LEONOVA, K. I.; GRIMM, M. J.; MOPARTHY, K.; IONOV, Y.; WANG, J.; LIU, S.; SEXTON, S.; KANDEL, E. S.; BAKIN, A. V.; ZHANG, Y.; KAMINSKI, N.; SEGAL, B. H.; NIKIFOROV, M.A. Nrf2 Amplifies Oxidative Stress via Induction of Klf9. **Molecular Cell**, v. 53, n. 6, p. 916–928, 2014.

**APÊNDICE A – ANIMAIS COM NEOPLASIA MAMÁRIA MALIGNA UTILIZADOS
NO ESTUDO**

ANIMAL	IDADE	PESO	RAÇA	DIAGÓSTICO HISTOPATOLÓGICO
#1	15 anos	6,3kg	Maltês	Carcinoma em padrão misto + Osteosarcoma
#2	10 anos	2,4kg	Pinscher	Carcinoma sólido microinvasor
#3	10 anos	3,8kg	Pinscher	Carcinoma em tumor misto, padrão tubular, grau I
#4	11 anos	3kg	Pinscher	Carcinoma em tumor misto, grau II
#5	10 anos	9kg	Poodle	Carcinosarcoma
#6	12 anos	5,2kg	Poodle	Adenomioepitelioma maligno
#7	10 anos	7,5kg	Shih-tzu	Carcinoma em tumor misto
#8	10 anos	13kg	Sem raça definida	Carcinoma papilar invasor grau II
#9	10 anos	16kg	Sem raça definida	Osteosarcoma
#10	10 anos	8kg	Sem raça definida	Carcinosarcoma
#11	11 anos	15kg	Sem raça definida	Carcinoma em tumor misto, grau I
#12	11 anos	27,9kg	Sem raça definida	Carcinoma em tumor misto, grau II
#13	12 anos	25kg	Sem raça definida	Adenomioepitelioma maligno
#14	15 anos	12kg	Sem raça definida	Carcinoma em tumor misto, padrão papilar
#15	7 anos	12,8kg	Sem raça definida	Carcinoma em tumor misto, padrão papilar
#16	7 anos	14,9kg	Sem raça definida	Carcinoma em tumor misto, padrão tubular
#17	8 anos	11kg	Sem raça definida	Carcinosarcoma
#18	8 anos	7,4kg	Sem raça definida	Carcinoma rico em glicogênio, grau I
#19	9 anos	11kg	Sem raça definida	Carcinoma em tumor misto
#20	9 anos	14 kg	Sem raça definida	Adenomioepitelioma maligno
#21	9 anos	4,1kg	Sem raça definida	Carcinoma em tumor misto grau I
#22	10 anos	6kg	Yorkshire terrier	Carcinoma em tumor misto, padrão papilar

**APÊNDICE B – ANIMAIS COM NEOPLASIA MAMÁRIA BENIGNA UTILIZADOS
NO ESTUDO**

ANIMAL	IDADE	PESO	RAÇA	DIAGÓSTICO HISTOPATOLÓGICO
#1	11 anos	10kg	Dachshund	Tumor misto benigno
#2	15 anos	6,6kg	Maltês	Tumor misto benigno
#3	12 anos	2,6kg	Pinscher	Tumor misto benigno
#4	7 anos	2,25kg	Pisncher	Adenomioepitelioma