

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

FLÁVIA MOREIRA DA FONSECA

**CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE 25- HIDROXIVITAMINA D EM CÃES SAUDÁVEIS E
COMO FATOR PREDITIVO E PROGNÓSTICO EM CADELAS COM NEOPLASIA
MAMÁRIA**

CURITIBA

2017

FLÁVIA MOREIRA DA FONSECA

**CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE 25- HIDROXIVITAMINA D EM CÃES
SAUDÁVEIS E COMO FATOR PREDITIVO E PROGNÓSTICO EM
CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Patologia Clínica Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Prof. Dra. Rosangela Locatelli Dittrich
Co-orientadora: Prof. Dra. Ananda Portella Felix

CURITIBA

2017

F676 Fonseca, Flávia Moreira da
Concentração sérica de 25- Hidroxivitamina D em cães saudáveis e como fator preditivo e prognóstico em cadelas com neoplasia mamária. / Flávia Moreira da Fonseca. – Curitiba : 2017. 87 f. il.

Orientadora: Rosangela Locatelli Dittrich.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Patologia Clínica Veterinária.

1. Vitamina D. 2. Cão – Alimentos e rações. 3. Cão - Doenças. 4. Mamas – Cancer. 5. Tumores em animais I. Dittrich, Rosangela Locatelli. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Patologia Clínica Veterinária. III. Título.

CDU 619.6-006

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada "CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE 25-HIDROXIVITAMINA D EM CÃES SAUDÁVEIS E COMO FATOR PREDITIVO E PROGNÓSTICO EM CADELAS COM NEÓPLASIA MAMÁRIA" apresentada pela Mestranda FLÁVIA MOREIRA DA FONSECA declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09-CEPE/UFPR, que considerou a candidata APTA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 27 de março de 2017

Professora Dra. Rosângela Locatelli Dittrich
Presidente/Orientadora

Professora Dra. Ângela Patrícia Medeiros Veiga
Membro

Professora Dra. Juliana Sperotto Brum
Membro

Dedico esse trabalho a todos os professores que de alguma forma, ao longo desses anos, inculcaram em mim a sede pelo conhecimento e a vontade de fazer ciência...

A todos os amigos de patas, pelos e focinhos que participaram desse estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse projeto e me acompanharam nessa caminhada.

Aos meus pais, Marli Cecília e Urandi, pelo apoio e incentivo, gratidão especial a minha mãe que sempre deu todo o suporte para que eu pudesse me dedicar a esse objetivo.

Ao meu irmão Tiago, por me apoiar, aconselhar e ter sido um grande incentivador desde o primeiro momento que decidi trilhar esse caminho acadêmico.

Aos amigos que sempre tiveram uma palavra de estímulo, acompanharam essa caminhada e vibraram, mesmo que de longe, com cada conquista. Em especial à Juliane, Delaine, Aline, Christiane e Everton.

À minha prima e também Médica Veterinária, Carine Schievenin, pelo auxílio na seleção de cães para o estudo, nas coletas de sangue e pela parceria realizada com o Consultório Veterinário e Pet Shop Hora.

À minha orientadora Prof. Dra. Rosangela Locatelli Dittrich pela dedicação e carinho com que conduziu essa orientação. Por ter embarcado na ideia de trabalhar com esse assunto totalmente novo e ter sempre me apoiado. Pelo grande incentivo e estímulo para que eu continue no meio acadêmico, por confiar e nunca permitir que eu deixasse de acreditar na minha capacidade.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária. Aos residentes: Sandra, Gabriela, Morgana e Reinaldo. Pela convivência, por serem sempre prestativos e dispostos a compartilhar seu conhecimento. Em particular a Sandra pelo auxílio na leitura das lâminas na primeira parte do projeto. Aos estagiários pelo auxílio durante as análises e processamentos

Às mestrandas e doutorandas: Bianca, Marília, Aline, pela convivência e os momentos de descontração. Em especial, a mestranda e amiga Ana Paula, pela parceria e amizade; por ouvir meus desabafos quando tudo parecia dar errado, pelo auxílio nas coletas de sangue, pelas risadas, caronas e gordices.

Ao técnico Msc. Olair Carlos Beltrame, pelo auxílio no processamento das amostras e na aquisição dos kits, tornando possível a realização desse projeto. Por ser sempre tão solícito, prestativo, sempre disposto a tirar dúvidas e dar sugestões para o trabalho. Pela amizade e os momentos de descontração.

À doutoranda e agora já Profa. Dra Luciane Laskoski, pelo auxílio nas estatísticas e por estar sempre disposta a tirar dúvidas.

À aluna de iniciação científica Rafaela Furioso Ferreira pelo auxílio com as traduções.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pela convivência nas disciplinas e sugestões durante a apresentação dos seminários. Em especial às colegas Carolina Trochmann, Rauane Moura e Thayane Vieira pelo auxílio nas coletas de sangue dos Beagles.

Aos colegas do Laboratório de Estudos em Nutrição Canina (LENUCAN) e à Profa. Dra Ananda Portela Felix por terem cedido os Beagles para participarem do projeto, pelo auxílio e sugestões.

À Profa. Dra Rita de Cássia Maria Garcia e aos residentes e alunos que participam do projeto da Unidade Móvel de Esterilização e Educação em Saúde (UMEES). Por terem sido muito receptivos ao desenvolvimento da minha pesquisa dentro do projeto, sempre prestativos e atenciosos.

À Prefeitura de Pinhais pela autorização para a participação dos cães do projeto da UMEES no estudo.

Ao Prof. Msc. Renato Silva de Sousa e aos residentes do Laboratório de Patologia Veterinária por serem sempre pacientes e prestativos ao passar os laudos histopatológicos.

Ao Setor de Oncologia do Hospital Veterinário da UFPR pela inclusão dos questionários nutricionais na rotina.

À instituição Universidade Federal do Paraná (UFPR), aos Professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV-UFPR) e do Hospital Veterinário da UFPR (HV-UFPR), em especial aos funcionários da recepção do HV-UFPR pelo auxílio na consulta das inúmeras fichas clínicas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa de mestrado concedida.

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano”.

Isaac Newton

RESUMO

Nas últimas décadas foram crescentes os estudos em humanos a respeito da concentração sérica da vitamina D na saúde sistêmica. No entanto, na medicina veterinária ainda há pouco conhecimento sobre isso e não há um consenso em relação aos seus valores de referência. Estudos em cães associam a deficiência de vitamina D a maior predisposição para o desenvolvimento de neoplasias, em humanos os resultados são mais consistentes e já relacionam essa deficiência ao pior prognóstico e menor sobrevida. Porém, não existe nenhum estudo em cães que relacione as concentrações séricas de 25(OH)D como fator de risco para neoplasia mamária. A presente dissertação está dividida em uma breve descrição e atualização sobre a vitamina D e em dois capítulos. O capítulo I determina valores de referência para 25(OH)D em cães saudáveis e avalia as concentrações séricas de 25(OH)D em relação ao sexo, a faixa etária (adultos e filhotes) e ao tipo de dieta. Foram selecionados 59 cães saudáveis, população total (G), dividido em dois grupos: Grupo 1 (G1): Beagles, faixas etárias distintas (adultos e filhotes), dieta padronizada e Grupo 2 (G2): raças variadas, mesma faixa etária (adultos) e dietas variadas. O intervalo de referência obtido na população total (G) tem limite inferior de 12,2 ng/ml e superior de 74,4 ng/ml. Não foi observada diferença nos níveis séricos de 25(OH)D entre machos e fêmeas. No G1 os filhotes apresentaram uma concentração de 25(OH)D mediana (30,6 ng/ml) inferior aos adultos (34,9 ng/ml). No G2 não foi observada diferença significativa entre os cães que recebiam diferentes tipos de dieta. A ausência de correlação significativa entre a ingestão de vitamina D por quilograma de peso corporal e a concentração de 25(OH)D (G1) sugere que outros fatores podem influenciar nessa relação. O capítulo II aborda a relação entre os níveis séricos de 25(OH)D e o risco de desenvolvimento de neoplasia mamária em cadelas, o prognóstico e a sobrevida. Os cães foram separados em grupo controle (GC) e grupo com neoplasia mamária (GN). Para o GC foram selecionadas 78 cadelas adultas, saudáveis. No GN foram incluídas 65 cadelas, adultas, diagnosticadas com tumor mamário. As cadelas do GN apresentaram níveis significativamente inferiores de 25(OH)D (24,9 ng/ml) em relação ao GC (43,7 ng/ml). As cadelas com valores séricos de 25(OH)D menores que 26,2 ng/ml apresentaram um risco 6,2 vezes maior de desenvolver neoplasia mamária. Fatores prognósticos como malignidade, grau histológico do tumor, presença de metástase não apresentaram relação significativa com as concentrações séricas de 25(OH)D. Porém em cadelas com níveis séricos inferiores a 26,2 ng/ml o risco de mortalidade aumentou em mais de 5 vezes e a curva de sobrevivência foi significativamente menor. Ainda não é possível definir quais os níveis séricos de 25(OH)D são considerados adequados para cães, mas a deficiência de vitamina D pode ser um fator de risco para neoplasia mamária em cadelas e estar relacionada a uma menor sobrevida.

Palavras-chave: vitamina D, cão, dieta, valor de referência, tumor de mama, mortalidade, sobrevida.

ABSTRACT

In recent decades there has been a growing number of studies in humans regarding serum vitamin D concentration in systemic health. However, in veterinary medicine there is still not much data about this and there is no consensus regarding its reference values. Studies in dogs associate vitamin D deficiency with a greater predisposition to the development of neoplasias. In humans results are more consistent and have already related this deficiency to worse prognosis and lower survival. However, there is no study in dogs that correlates serum concentrations of 25(OH)D as a risk factor for breast cancer. This dissertation is divided in a brief description and update about vitamin D and in two chapters. The chapter I determines reference values for 25(OH)D in healthy dogs, and evaluates serum 25(OH)D levels in relation to gender, age (adult and pups), and type of diet. A total of 59 healthy dogs were selected, divided into two groups: Group 1 (G1): Beagles, different age groups (adults and puppies), standardized diet and Group 2 (G2): varied breeds, same age group (adults) and various diets. The reference range obtained in the total population (G) has a lower limit of 12.2 ng/mL and higher of 74.4 ng/mL. No difference was observed in the serum levels of 25(OH)D between males and females. In G1 puppies had a mean 25(OH)D concentration (30.6 ng/mL) lower than adults (34.9 ng/mL). In G2, no significant difference was observed between dogs receiving different types of diet. The absence of a significant correlation between vitamin D intake per kilogram of body weight and the concentration of 25(OH)D (G1) suggests that other factors may influence this relation. Chapter II discusses the relationship between serum 25(OH)D levels and the risk of developing breast cancer in bitches, prognosis and survival. The dogs were separated in control group (CG) and group with mammary neoplasia (GN). For GC, 78 adult, healthy bitches were selected. In GN 65 adult bitches diagnosed with breast tumor were included. In GN bitches showed significantly lower levels of 25(OH)D (24.9 ng/mL) than GC (43.7 ng/mL). Bitches with serum values of 25(OH)D lower than 26.2 ng/ mL had a 6.2-fold higher risk of developing breast cancer. Prognostic factors such as malignancy, histological grade of the tumor, presence of metastasis did not show significant relation with the serum concentrations of 25(OH)D. However, in bitches with serum levels below 26.2 ng/mL the risk of mortality increased more than five fold and the survival curve was significantly lower. It is not yet possible to determine which serum levels of 25(OH)D are considered suitable in dogs, but vitamin D deficiency may be a risk factor for breast cancer in bitches and may be associated with decreased survival.

Keywords: Vitamin D, dog, diet, reference value, breast tumor, mortality, survival

LISTA DE FIGURAS

Descrição e atualização sobre a vitamina D

FIGURA 1 – Síntese e metabolismo da vitamina D.....24

FIGURA 2 – Sistemas fisiológicos e respostas biológicas associadas à atuação da vitamina D sérica e doenças relacionadas à sua deficiência.....26

CAPÍTULO I

FIGURA 1 – Concentração sérica de 25(OH)D (ng/ml) em cães Beagle adultos e filhotes (G1).....42

FIGURA 2 – Concentração sérica de 25(OH)D (ng/ml) em cães Beagle adultos e filhotes de acordo com a quantidade de vitamina D ingerida por quilograma de peso corporal (UI/kg) (G1).....43

CAPÍTULO II

FIGURA 1 – Box plot evidenciando as medianas (linhas horizontais com círculo central) e amplitude máxima e mínima das concentrações séricas de 25(OH)D no grupo controle e no grupo neoplásico.....59

FIGURA 2 – Box plot evidenciando as medianas (linhas horizontais com círculo central), os interquartis (linhas paralelas internas) e amplitude máxima e mínima das concentrações séricas de 25(OH)D nos subgrupos adenoma, adenocarcinoma, misto e no grupo controle.....60

FIGURA 3 – Box plot evidenciando as medianas (linha horizontal) e amplitude mínima e máxima das concentrações séricas de 25(OH)D nas cadelas vivas e nas que vieram a óbito.....62

FIGURA 4 – Curva de probabilidade e tempo de sobrevivência de acordo com os níveis de 25(OH)D no grupo neoplasia mamária.....63

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 1 – Dieta recebida pelos cães Beagle do G1 – Análise da composição química da dieta.....	38
TABELA 2 – Concentrações séricas medidas de 25(OH)D, cálcio total e fósforo em cães híidos com diferentes tipos de dieta.....	41
TABELA 3 – Concentrações séricas médias de 25(OH)D, cálcio total e fósforo em cães híidos com diferentes tipos de dieta (G2).....	42

CAPÍTULO II

TABELA 1 – Concentração sérica de 25(OH)D no grupo controle, no grupo neoplasia mamária e de acordo com os subgrupos de neoplasia: adenoma, adenocarcinoma e misto.....	59
TABELA 2 – Concentração sérica de 25(OH)D de acordo com a classificação histológica e a presença ou não de metástase em cadelas com neoplasia mamária maligna dos grupos adenocarcinoma e misto.....	60
TABELA 3 – Odds ratio, razão de chance de desenvolvimento de neoplasia mamária em relação ao grupo controle.....	61
TABELA 4 – Concentração sérica de 25(OH)D em cadelas com neoplasia mamária que vieram a óbito e cadelas que permaneceram vivas.....	61
TABELA 5 – Razão de risco de óbito nas cadelas com neoplasia mamária calculada pela análise de sobrevivência de Kaplan-Meier.....	62

LISTA DE SIGLAS

AAFCO	–	American Association of Feed Control
ALT	–	Alamina aminotransferase
EDTA	–	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ER	–	Receptor de estrogênio
CEUA	–	Comissão de Ética no uso de Animais
FA	–	Fosfatase Alcalina
FEDIAF	–	The European Pet Food Industry Federation
HRP	–	Peroxidase de rábano
iPTH	–	Paratôrmonio intacto
LENUCAN	–	Laboratório de Estudos em Nutrição Canina
PTH	–	Paratôrmonio
UFPR	–	Universidade Federal do Paraná
UMEES	–	Unidade Móvel de Esterilização e Educação em Saúde
UV	–	Ultravioleta
VDBP	–	Proteínas de ligação da vitamina D
VDR	–	Receptores nucleares da vitamina D
25(OH)D	–	25-hidroxivitamina D
1 α ,25(OH) ₂ D	–	1 α ,25-diidroxi-vitamina D

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	17
1.1. OBJETIVOS.....	18
1.1.1 OBJETIVO GERAL.....	18
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
REFERÊNCIAS.....	19
2. DESCRIÇÃO E ATUALIZAÇÃO SOBRE A VITAMINA D.....	22
REFERÊNCIAS.....	29
3. CAPÍTULO I. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE 25- HIDROXIVITAMINA D EM CÃES SAUDÁVEIS E A SUA CORRELAÇÃO COM A DIETA.....	34
3.1 INTRODUÇÃO	36
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.2.1 Grupo de estudo	37
3.2.2 Dieta	38
3.2.3 Coleta de amostras, exames clínicos e laboratoriais	39
3.2.4 Mensuração da 25(OH)D.....	39
3.2.5 Análise estatística	40
3.3. RESULTADOS	40
3.5 CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
4. CAPÍTULO II. CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE 25- HIDROXIVITAMINA D COMO FATOR PREDITIVO E PROGNÓSTICO EM CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA	51
4.1 INTRODUÇÃO	53
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	55
4.2.1 Grupo controle (GC)	55
4.2.2 Grupo neoplasia mamária (GN).....	55
4.2.3 Coleta das amostras e exames laboratoriais	56
4.2.4 Mensuração da 25(OH)D.....	57
4.2.5 Dieta	57
4.2.6 Análise estatística	58

4.3 RESULTADOS	58
4.4 DISCUSSÃO	64
4.5 CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS.....	69
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
REFERÊNCIAS.....	76
APÊNDICE.....	84
Apêndice 1 – Questionário nutricional realizado com os proprietários a respeito da dieta dos cães.....	84
Apêndice 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido fornecido aos proprietários	86
ANEXO	87
Anexo 1 – Certificado de aprovação na comissão de ética no uso de animais - CEUA.....	87
Anexo 2 – Certificado adicional de aprovação na comissão de ética no uso de animais - CEUA	88

1. INTRODUÇÃO GERAL

As abordagens sobre a importância do papel da vitamina D na saúde sistêmica têm sido uma tendência recorrente nos últimos anos (PÉREZ-HERNÁNDEZ et al., 2016; AL SAWAH et al., 2016; LIMKETKAI, et al., 2016; CEBEY-LÓPEZ), e despertando o interesse da comunidade científica, com um aumento exponencial de estudo em humanos (BOREL, CAILLAUD & CANO, 2015; MERCHAN et al., 2017). Porém no que se tange a medicina veterinária esse conhecimento ainda é escasso.

A vitamina D é uma vitamina de característica lipossolúvel que apresenta várias formas metabólicas e que se torna ativa após metabolização no organismo. A sua forma ativa é a $1\alpha,25\text{-dihidroxi-vitamina D}$ ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$), mas a principal forma em circulação e o biomarcador de escolha para mensuração sérica é a 25-hidroxivitamina D ($25(\text{OH})\text{D}$) (MELLANBY, 2016)

Existem poucos valores de referência para a concentração sérica de $25(\text{OH})\text{D}$ em cães e ainda se não estabeleceu um consenso (SELTING et al., 2014). No Brasil, até o presente momento, não foram desenvolvidos estudos a respeito das concentrações séricas de vitamina D em cães.

Há diferenças no metabolismo da vitamina D entre humanos e cães, já que em cães e gatos a síntese da vitamina D na pele é ineficiente e a principal fonte para esses animais é a dieta (WEIDNER & VERBRUGGHE, 2016). Alguns fatores podem afetar a relação entre a ingestão de vitamina D e os níveis séricos de $25(\text{OH})\text{D}$, como: idade, sexo, escore corporal, variação genética e limitam o conhecimento a respeito dessa ligação. Todavia, apenas em humanos existem estudos que embasam a associação entre esses fatores e a vitamina D (WEIDNER & VERBRUGGHE, 2016)

A vitamina D é amplamente conhecida por sua função na homeostase do cálcio e fósforo e no metabolismo ósseo, mas estudos recentes revelaram um papel em potencial dessa vitamina em outros processos fisiológicos sistêmicos (CARLBERG, 2014; AL NOZHA, 2016; MELLANBY, 2016).

Acredita-se que a forma ativa da vitamina D seja responsável pela regulação, direta e indireta, de mais de 2.000 genes no genoma humano (RAMAGOPALAN et al., 2010) e que quase todos os tecidos do organismo apresentem receptores de vitamina D (VDR). (BOUILLON et al., 2008).

Dentro desse contexto, várias publicações em humanos têm abordado a relação da deficiência de vitamina D com um maior risco no desenvolvimento de neoplasias e como um fator associado à progressão da doença e a mortalidade (YIN et al., 2013; BAUER et al., 2013; FELDMAN et al., 2014; MAALMI et al., 2014; MCDONELL et al., 2016). Em cães os estudos ainda são iniciais e contam com certas limitações (SELTING et al., 2014).

O tumor de mama é a neoplasia mais frequente em cadelas (SHAFIEE et al., 2013), a presença de receptores de vitamina D (VDR) nas células da mama já é alvo de estudos em humanos, mas ainda não foi relatada no tecido mamário canino (LOPES et al., 2010).

Estudos em mulheres apontam a deficiência de vitamina D como um fator relacionado ao desenvolvimento de câncer de mama, ao pior prognóstico e a menor sobrevida (KIM & JE, 2014; LIM, JEON & SUH, 2015; JACOBS et al., 2016). No entanto, não existe nenhum estudo sobre a associação entre as concentrações séricas de 25(OH)D e o risco de neoplasia mamária em cadelas e nem quanto ao efeito do *status* da vitamina D no prognóstico e na sobrevida em cães com neoplasia ou outras afecções sistêmicas.

Essa dissertação é composta por uma breve descrição e atualização sobre a vitamina D e por dois artigos científicos na forma de capítulos. O capítulo I estabelece valores de referência para 25(OH)D em cães saudáveis e avalia os níveis séricos de 25(OH)D em relação ao sexo, a faixa etária (adultos e filhotes) e ao tipo de dieta. O capítulo II aborda o valor preditivo e prognóstico das concentrações séricas de 25(OH)D em cadelas com neoplasia mamária.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Determinar valores de referência para a concentração de 25(OH)D em cães saudáveis; verificar a relação entre os níveis séricos de 25(OH)D em cadelas e o risco de desenvolvimento de neoplasia mamária, o prognóstico e a sobrevida.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se há diferença na concentração sérica de 25(OH)D entre cães machos e fêmeas e entre adultos e filhotes.
- Correlacionar as concentrações séricas de 25(OH)D com a dieta.

- Correlacionar as concentrações séricas de 25(OH)D com os níveis de cálcio total e fósforo.
- Avaliar o valor preditivo e prognóstico das concentrações séricas de 25(OH)D em cadelas com neoplasia mamária.

REFERÊNCIAS

AL NOZHA, Omar M. Vitamin D and extra-skeletal health: causality or consequence. **International journal of health sciences**, v. 10, n. 3, p. 443, 2016.

AL SAWAH, S. et al. 25-Hydroxyvitamin D and glycemic control: A cross-sectional study of children and adolescents with type 1 diabetes. **Diabetes research and clinical practice**, v. 115, p. 54-59, 2016.

BAUER, S.R. et al. Plasma vitamin D levels, menopause, and risk of breast cancer: dose-response meta-analysis of prospective studies. **Medicine**, v. 92, n. 3, p. 123, 2013.

BOUILLON, R. et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. **Endocrine reviews**, v. 29, n. 6, p. 726-776, 2008.

BOREL, P.; CAILLAUD, D.; CANO, N. J. Vitamin D bioavailability: state of the art. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 55, n. 9, p. 1193-1205, 2015.

CARLBERG, C. The physiology of vitamin D—far more than calcium and bone. **Frontiers in physiology**, v. 5, 2014.

CEBEY-LÓPEZ, M. et al. Role of Vitamin D in Hospitalized Children With Lower Tract Acute Respiratory Infections. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 62, n. 3, p. 479-485, 2016.

EKMEKCIOGLU, C.; HALUZA, D.; KUNDI, M. 25-Hydroxyvitamin D Status and Risk for Colorectal Cancer and Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis of Epidemiological Studies. **International journal of environmental research and public health**, v. 14, n. 2, p. 127, 2017.

ELIASSEN, A. Heather et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D and risk of breast cancer in women followed over 20 years. **Cancer Research**, p. canres.0353.2016, 2016.

FELDMAN, D. et al. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. **Nature reviews cancer**, v. 14, n. 5, p. 342-357, 2014

JACOBS, E.T. et al. Vitamin D and colorectal, breast, and prostate cancers: a review of the epidemiological evidence. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 3, p. 232, 2016.

KIM, Y; JE, Y. Vitamin D intake, blood 25 (OH) D levels, and breast cancer risk or mortality: a meta-analysis. **British journal of cancer**, v. 110, n. 11, p. 2772-2784, 2014.

LIM, S.T.; JEON, Y.W.; SUH, Y.J. Association between alterations in the serum 25-hydroxyvitamin d status during follow-up and breast cancer patient prognosis. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 16, n. 6, p. 2507-13, 2015.

LIMKETKAI, B.N.; BECHTOLD, M.L.; NGUYEN, D.L. Vitamin D and the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. **Current Gastroenterology Reports**, v. 18, n. 10, p. 52, 2016.

LOPES, N. et al. Alterations in Vitamin D signalling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions Vitamin D pathways unbalanced in breast lesions. **BMC cancer**, v. 10, n. 1, p. 483, 2010.

MAALMI, H. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and survival in colorectal and breast cancer patients: systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. **European journal of cancer**, v. 50, n. 8, p. 1510-1521, 2014.

MCDONNELL, S.L. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations ≥ 40 ng/mL are associated with $> 65\%$ lower cancer risk: pooled analysis of randomized trial and prospective cohort study. **PloS one**, v. 11, n. 4, p. e0152441, 2016.

MELLANBY, R.J. Beyond the skeleton: the role of vitamin D in companion animal health. **Journal of Small Animal Practice**, v. 57, n. 4, p. 175-180, 2016.

MERCHAN, B.B. et al. The role of vitamin D and VDR in carcinogenesis: Through epidemiology and basic sciences. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, 2017.

PÉREZ-HERNÁNDEZ, N. et al. Vitamin D and its effects on cardiovascular diseases: a comprehensive review. **The Korean journal of internal medicine**, 2016.

RAMAGOPALAN, S.V. et al. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution. **Genome research**, v. 20, n. 10, p. 1352-1360, 2010

SELTING, K. A; SHARP, C.R; RINGOLD, R.; THAMM, D.H.; BACKUS. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in dogs—correlation with health and cancer risk. **Veterinary and comparative oncology**, 2014.

SHAFIEE, R. et al.: Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: an Clinico-Cytopathological study with environmental factors influencing public health and medicine. **Cancer cell international**, v. 13, n. 1, p. 469, 2013.

WEIDNER, N.; VERBRUGGHE, A. Current knowledge of vitamin D in dogs. **Critical reviews in food science and nutrition**, n. just-accepted, 2016.

YIN, L. et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D serum concentration and total cancer incidence and mortality: a systematic review and meta-analysis. **Preventive medicine**, v. 57, n. 6, p. 753-764, 2013.

2. DESCRIÇÃO E ATUALIZAÇÃO SOBRE A VITAMINA D

Crescentes estudos sobre a relação entre o *status* da vitamina D, a saúde fisiológica e alterações sistêmicas em humanos têm despertado o interesse na medicina veterinária nos últimos anos, porém ainda são poucas as abordagens sobre o assunto (WEIDNER & VERBRUGGHE, 2016).

A vitamina D possui uma estrutura molecular semelhante aos compostos do grupo dos hormônios seco-esteroides, e caracteriza-se por ser um pró-hormônio lipossolúvel que é armazenado principalmente nos adipócitos (NORMAN, 2008; BOREL, CAILLAUD & CANO, 2015). Mais de 40 metabólitos da vitamina D já foram descritos, no entanto, ela se apresenta sob duas formas principais na natureza: o ergocalciferol (vitamina D₂) e o colecalciferol (vitamina D₃) (BOUILLON et al., 2008). Apesar de esta questão ainda gerar um grande debate, alguns estudos sugerem que o colecalciferol é mais eficiente na manutenção dos níveis de vitamina D circulante no organismo que o ergocalciferol (TRANG et al., 1998; HOUGHTON & VIETH, 2006). Estudos em humanos sugerem que a vitamina D₂ possui um terço da capacidade da vitamina D₃ (BOREL, CAILLAUD & CANO, 2015). Isso já pode ser verificado em gatos (NRC, 2006), mas ainda não foi bem investigado em cães.

Esse pró-hormônio pode ser proveniente da dieta ou da síntese na pele, a partir do 7- α dehidrocolesterol, induzida pela exposição à radiação solar. Em cães e gatos essa síntese é ineficiente devido à baixa disponibilidade desse precursor na pele que é rapidamente convertido em colesterol (WEIDNER & VERBRUGGHE, 2016).

Alguns estudos na década de 90 analisaram a concentração de vitamina D no sangue e pele de cães e gatos, antes e após a exposição à luz ultravioleta. Não encontraram diferença significativa, sugerindo então que em cães e gatos a síntese da vitamina D na pele não é tão eficiente quanto em herbívoros e humanos. Acredita-se que isso se deve à baixa disponibilidade do seu precursor o 7-dehidrocolesterol e, em função disso, esses animais são dependentes da vitamina D proveniente da dieta (HOW et al., 1994, MORRIS, 1999). Atualmente outras pesquisas têm confirmado essa proposição e verificado a dieta como uma

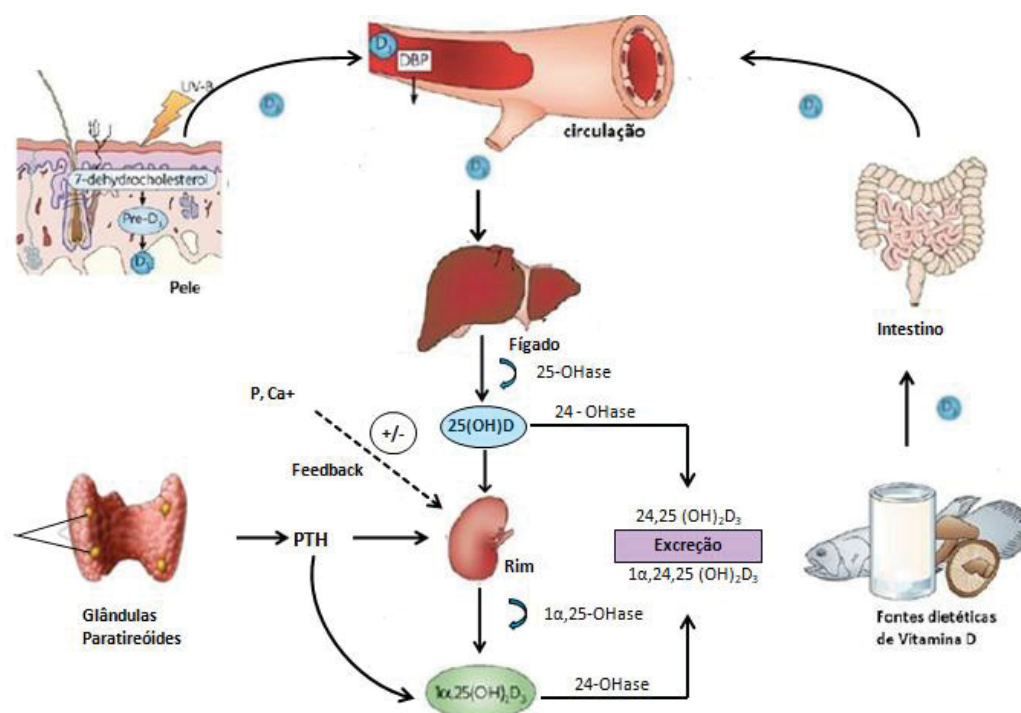
variável importante na concentração plasmática de vitamina D em cães (SHARP, SELTING & RINGOLD, 2015).

Na natureza, cães e gatos ingeriam a vitamina D armazenada na gordura de suas presas. A partir do momento em que foram domesticados, passaram a depender da suplementação dessa vitamina nos alimentos comerciais para animais de companhia (SHARP; SELTING; RINGOLD, 2015). As dietas comerciais balanceadas geralmente contêm quantidade suficiente de vitamina D para suprir a necessidade desses animais, evitando uma deficiência nutricional e o raquitismo. Todavia, as informações a respeito da quantidade de vitamina D presente nos alimentos comerciais são imprecisas, podendo variar entre 500 a 5.000 UI/kg, e não se tem conhecimento dos níveis ideais de suplementação necessários para manter uma concentração sérica de vitamina D adequada no que tange a sua influência na saúde sistêmica (HAZEWINKEL; TRYFONIDOU, 2002; WEIDNER & VERBRUGGHE, 2016).

Na fabricação das rações comerciais normalmente é suplementado o colecalciferol produzido de forma sintética, adicionado como pequenas pérolas na forma de cápsulas. Esse revestimento protege o componente bioativo e garante sua estabilidade diante dos processos de extrusão, secagem e armazenamento. A recuperação de vitamina D após o processamento da ração é bem maior do que comparado às outras vitaminas, assim como as perdas no seu armazenamento são bem menores (NRC, 2006; SCHROOYEN et al., 2001).

A vitamina D ingerida nos alimentos é absorvida no intestino delgado por meio da formação de micelas, com o auxílio dos sais biliares, devido a sua condição lipossolúvel. Em conjunto com a vitamina D sintetizada na pele, é transportada na circulação sanguínea pelas proteínas de ligação de vitamina D (VDBP) para o fígado, onde inicia a metabolização. No fígado sofre hidroxilação, sendo convertida em 25-hidroxivitamina D (25(OH)D ou calcidiol) pela ação das enzimas 25-hidroxilase. A 25(OH)D é carregada até os rins, onde passa por uma segunda hidroxilação nos túbulos renais, a partir da enzima $1\alpha,25$ -hidroxilase, formando a forma biologicamente ativa a $1\alpha,25$ -diidroxivitamina D ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$) ou calcitriol (NORMAN, 2008; MELLANBY, 2016). A enzima 24-hidroxilase ainda transforma o calcidiol e o calcitriol em compostos mais solúveis ($24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e $1\alpha,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) catalisando a sua degradação em metabólitos que são excretados nas fezes, bile e urina (DÍAZ et al., 2015) (Figura 1).

Figura 1 - Síntese e metabolismo da vitamina D



(Adaptado de DEEB, TRUMP & JOHNSON, 2007).

O calcitriol atua sob a regulação do PTH na homeostase do cálcio e do fósforo, suas respostas são mediadas pela ação em receptores nucleares da vitamina D (VDR) no intestino, rins e ossos. No intestino delgado a vitamina D estimula a síntese das proteínas responsáveis pelo transporte do cálcio nos enterócitos, abrindo os canais de cálcio e aumentando a sua absorção. Age também na reabsorção de cálcio nos túbulos renais e indiretamente nos ossos por meio da ação dos osteoclastos, permitindo a sua mobilização para circulação sanguínea e a manutenção da calcemia (MULLIN; DOBS, 2007; CHRISTAKOS et al., 2011).

O calcitriol é responsável por manter os níveis séricos de cálcio suficientes para assegurar uma mineralização óssea adequada, evitando o raquitismo durante a fase de crescimento e a osteomalácia em adultos (HOLICK, 2006). Cães jovens são muito mais sensíveis à deficiência de vitamina D que cães maduros, devido a maior demanda de cálcio para a mineralização das cartilagens, o que pode resultar em comprometimento da mineralização óssea e raquitismo (HAZEWINKEL; TRYFONIDOU, 2002; NRC, 2006).

A $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ é a forma ativa da vitamina D, entretanto, a $25(\text{OH})\text{D}$ é a principal forma metabólica da vitamina D em circulação e a mais apropriada para a mensuração da sua concentração sérica (ALVES et al., 2013). A $25(\text{OH})\text{D}$ encontra-se em maior concentração e possui uma meia-vida mais longa que a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$, além disso a sua síntese não sofre influência direta de outros fatores. A $25(\text{OH})\text{D}$ é o melhor indicador para se determinar as condições da vitamina D no organismo (WEIDNER & VERBRUGGHE, 2016). A síntese da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ é estimulada pelo PTH, suprimida em caso de hipercalcemia e hiperfosfatemia e pelo seu próprio feedback negativo diante de níveis séricos elevados de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$, o que não ocorre diretamente com a $25(\text{OH})\text{D}$ (Figura 1). Indiretamente, elevados níveis de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ podem ter um feedback negativo sobre a produção de $25(\text{OH})\text{D}$ (WEIDNER & VERBRUGGHE, 2016).

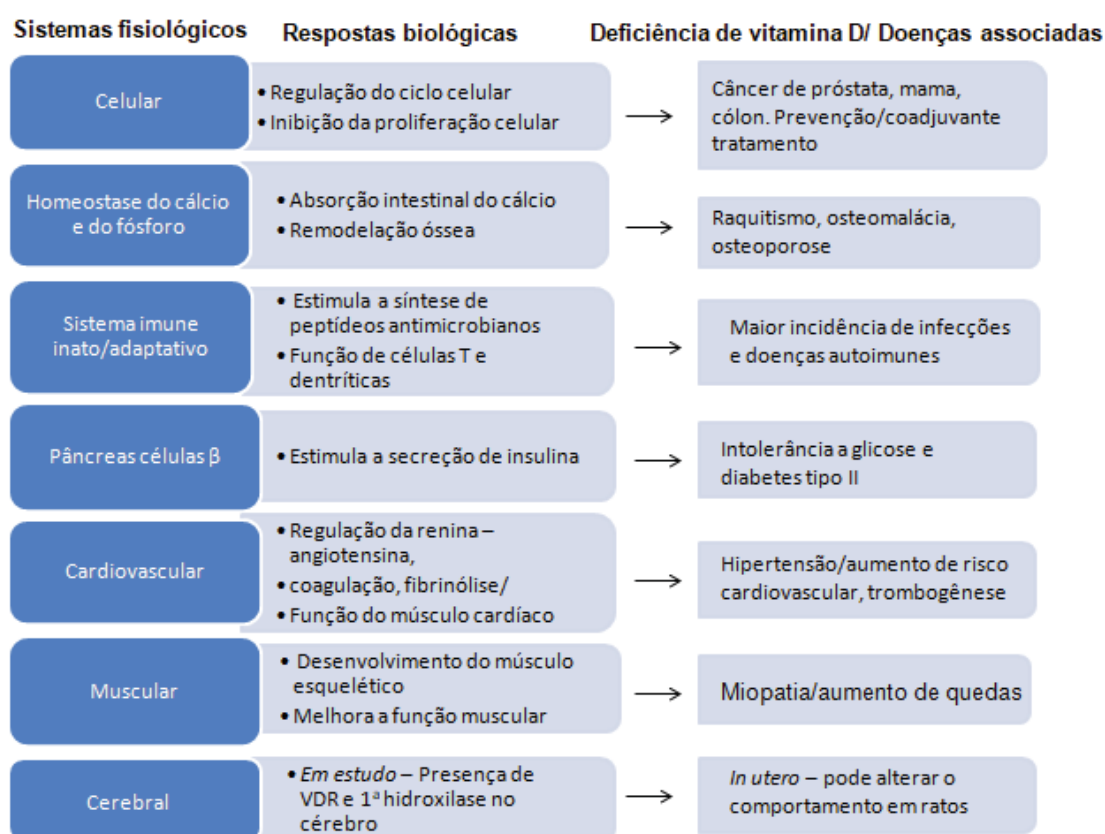
Níveis de $25(\text{OH})\text{D}$ menores que 20-25 ng/ml sugerem deficiência de vitamina D em relação ao desenvolvimento ósseo adequado em cães (HAZEWINDEL & TRYFONIDOU, 2002). Uma pesquisa recente sugeriu como concentração sérica de $25(\text{OH})\text{D}$ ótima para a saúde em cães entre 100-120 ng/ml a partir do uso de biomarcadores como o paratormônio intacto (iPTH), a proteína C-reativa canina, cálcio e fósforo, mas se limitou a uma população de duas raças de cães aparentemente saudáveis e observou uma grande variação nos níveis séricos de $25(\text{OH})\text{D}$ (9,5-249,2 ng/ml). Contudo, ainda não é possível definir uma concentração de vitamina D ideal e, estabelecer, como em humanos, uma classificação que defina estados de suficiência, insuficiência ou deficiência no que se diz respeito à vitamina D em cães. Essas condições são definidas com base em alterações na homeostase do cálcio e na formação do esqueleto (SELTING et al., 2015; WAKSHLAG et al., 2011). Não existe ainda um consenso quanto às referências de concentração sérica da $25(\text{OH})\text{D}$ em cães, não é um exame de rotina e poucos são os parâmetros já estabelecidos.

Embora a vitamina D seja reconhecida pela sua função na homeostase do cálcio e fósforo, nas últimas décadas estudos têm revelado que ela apresenta uma função biológica ampla, atuando em outros processos fisiológicos além do metabolismo ósseo (CARLBERG, 2014; AL NOZHA, 2016; MELLANBY, 2016) (Figura 2.).

Dessa forma, pesquisas em humanos têm destacado a importância da vitamina D na manutenção da saúde sistêmica (AUTIER et al., 2015) e na

patofisiologia de uma série de doenças como cardiopatias (PÉREZ-HERNÁNDEZ et al., 2016), diabetes (AL SAWAH et al., 2016), doenças auto-imunes (LIMKETKAI, et al., 2016), doenças infecciosas (CEBEY-LÓPEZ et al., 2016) e principalmente as neoplasias (ELIASSEN et al., 2016). Estudos em cães são recentes e apesar de escassos, já relacionaram baixas concentrações de 25(OH)D à doença cardíaca valvular crônica e a insuficiência cardíaca congestiva (OSUGA et al, 2015), enteropatia crônica e inflamação sistêmica (TITMARSH et al., 2015) e ao risco de desenvolvimento de neoplasias (WAKSHLAG et al., 2011, SELTING et al., 2014).

Figura 2. Sistemas fisiológicos e respostas biológicas associadas à atuação da vitamina D sérica e doenças relacionadas à sua deficiência.



Adaptado de Norman & Bouillon, 2010.

A $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ atua mediada por receptores de vitamina D (VDR) que estão presentes em quase todos os tecidos do organismo, sendo encontrados em quase 40 tecidos distintos (BIKLE, 2009; NORMAN & BOUILLON, 2010). Além disso, muitos desses tecidos, incluindo as células cancerígenas, expressam o gene (CYP27B1), que codifica a enzima $1\alpha,25$ -hidroxilase, sendo capazes de converter a 25(OH)D em $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ (BIKLE, 2009; MERCHAN et al., 2017).

Logo, tanto a 25(OH)D, quanto a sua forma ativa, o calcitriol, atuam por uma via endócrina e uma via autócrina-paracrina em tecidos extrarrenais (MERCHAN et al., 2017).

Embora o mecanismo de ação da vitamina D não seja totalmente conhecido, sabe-se que o calcitriol ao atingir a célula alvo difunde-se pela membrana plasmática devido a sua característica lipofílica e se liga aos receptores de vitamina D (VDR) presentes no núcleo. Ao se ligar a esses receptores desencadeia uma via genômica que envolve a expressão e a repressão de genes por mecanismos moleculares, que alteram a sequência de DNA. A regulação da expressão desses genes está relacionada a uma série de respostas biológicas associadas à homeostase sistêmica (MERCHAN et al., 2017; CASTRO, 2011).

Entre essas respostas tem sido relatada a capacidade antiproliferativa da vitamina D. A ação da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ em tecidos extrarrenais envolve a transcrição e expressão de genes relativos a fatores de regulação do ciclo celular, inibindo a proliferação celular e estimulando os processos de diferenciação e apoptose. Somando a isso, a ação de inibição dos processos moleculares que regulam a angiogênese e a adesão celular, diminuindo a capacidade de invasão das células e o desenvolvimento de metástases (MULLIN; DOBS, 2007, SAMUEL; SITRIN, 2008; MERCHAN et al., 2017). Essa via ainda atua na diferenciação de células imunes, principalmente linfócitos T e células apresentadoras de antígenos e possui um importante efeito imunomodulador na produção de citocinas inflamatórias (MULLIN; DOBS, 2007).

Dessa forma, tem sido amplamente discutida a ação antineoplásica da vitamina D, atribuindo a ela um papel importante como adjuvante na prevenção, na terapia e no prognóstico de neoplasias (SHUI & GIOVANNUCCI, 2015). Pesquisas recentes em humanos têm sugerido uma relação entre baixas concentrações de vitamina D e a maior incidência (MCDONNELL et al., 2016) e a progressão do câncer de cólon, próstata, mama (JACOBS et al., 2016;), carcinoma de bexiga (ZHANG et al., 2015), câncer de ovário (WEBB et al., 2015) e de pâncreas (ZHANG et al., 2017).

A 25(OH)D aparece como um importante marcador da saúde sistêmica, mas ainda não é possível definir uma relação de causa e efeito entre a deficiência de vitamina D e o desenvolvimento de câncer e outras doenças crônicas. Em estágios mais avançados da doença, o próprio câncer pode bloquear as

moléculas que compõem o denominado sistema vitamina D (VDS), entre elas o VDR e o gene CYP27B1, levando a redução dos níveis séricos de 25(OH)D, inibindo a ação protetora da vitamina D. (AL NOZHA, 2016; MERCHAN et al., 2017).

Abordagens em cães são mais escassas, mas uma investigação sugeriu a relação inversa entre os níveis séricos de 25(OH)D e o risco de desenvolvimento de mastocitoma cutâneos em cães da raça Labrador (WAKSHLAG et al., 2011). Uma pesquisa encontrou dosagens de 25(OH)D mais baixas em cães que desenvolveram espirocercose, uma formação nodular de origem parasitária em esôfago que pode se transformar em tumores neoplásicos, principalmente no grupo que desenvolveu a forma neoplásica da doença (ROSA et al., 2013). Um estudo mais atual verificou diferença significativa nos valores médios de 25(OH)D entre cães saudáveis e cães com hemangiossarcoma esplênico e observou aumento no risco relativo de câncer com a diminuição nas concentrações séricas de 25(OH)D (SELTING et al., 2014).

Um estudo *in vitro* em linhagens celulares tumorais caninas de adenocarcinoma mamário, mastocitoma e osteossarcoma demonstrou os efeitos antiproliferativos da vitamina D e a sua capacidade de potencializar a ação de quimioterápicos, como a cisplatina, diante dessas células tumorais (RASSNICK et al., 2008). Outros estudos *in vitro* observaram respostas antitumorais e efeito inibidor no crescimento de células tumorais em linhagens celulares caninas de adenocarcinoma do saco anal (KUNAKORNSAWAT et al., 2002), carcinoma de células de transição da bexiga (THATTAWAN et al., 2005) e de mastocitoma cutâneo (MALONE et al., 2010).

Em humanos, diversas pesquisas relacionam a deficiência de vitamina D à incidência de câncer de mama, pois além da sua capacidade antiproliferativa, o calcitriol regula a síntese e ação do estrogênio, o principal hormônio responsável pelo estímulo do crescimento das células neoplásicas na mama. A vitamina D atenua a expressão dos receptores de estrogênio (ER) e inibe a codificação da aromatase, a enzima que catalisa a produção do estrógeno (KRISHNA; SWAMI; FELDMAN, 2010).

Os resultados mais consistentes, no entanto, foram os relacionados à progressão do câncer de mama e o risco de mortalidade. Concentrações mais elevadas de 25(OH)D estão associadas ao melhor prognóstico e aumento da

sobrevida em mulheres com câncer de mama (JACOBS et al., 2016). No entanto, não existe nenhum estudo em cães abordando os níveis séricos de 25(OH)D como fator de risco para a incidência de neoplasia mamária, e nem relacionando o *status* da vitamina D com o prognóstico e a sobrevida.

Os animais de companhia, com o seu tempo de vida mais curto, aparecem como um modelo biológico em potencial nos estudos relativos à incidência e ao prognóstico de neoplasias (PINHO et al., 2012). E, nesse caso, se encaixam como modelos ideais nas investigações *in vivo* sobre os efeitos da vitamina D, pois diferente do que ocorre com humanos, a síntese de vitamina D na pele por meio da exposição solar não é uma fonte de vitamina D significativa em cães; sendo possível eliminar uma variável importante durante a investigação (MELLANBY, 2016).

REFERÊNCIAS

AL NOZHA, O.M. Vitamin D and extra-skeletal health: causality or consequence. **International journal of health sciences**, v. 10, n. 3, p. 443, 2016.

AL SAWAH, S. et al. 25-Hydroxyvitamin D and glycemic control: A cross-sectional study of children and adolescents with type 1 diabetes. **Diabetes research and clinical practice**, v. 115, p. 54-59, 2016.

ALVES, M. et al. Vitamina D—importância da avaliação laboratorial. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, v. 8, n. 1, p. 32-39, 2013.

AUTIER, P. et al. Vitamin D status and ill health: a systematic review. **The lancet Diabetes & endocrinology**, v. 2, n. 1, p. 76-89, 2014.

BIKLE, D. Nonclassic actions of vitamin D. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 1, p. 26-34, 2009.

BOREL, P.; CAILLAUD, D.; CANO, N. J. Vitamin D bioavailability: state of the art. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 55, n. 9, p. 1193-1205, 2015.

BOUILLON, R. et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. **Endocrine reviews**, v. 29, n. 6, p. 726-776, 2008.

CARLBERG, C. The physiology of vitamin D—far more than calcium and bone. **Frontiers in physiology**, v. 5, 2014.

CASTRO, L. C. de O sistema endocrinológico vitamina D. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 55, n. 8, p. 566-75, 2011.

CEBEY-LÓPEZ, M. et al. Role of Vitamin D in Hospitalized Children With Lower Tract Acute Respiratory Infections. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 62, n. 3, p. 479-485, 2016.

CHRISTAKOS, S. et al. Vitamin D and intestinal calcium absorption. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 347, n. 1, p. 25-29, 2011.

DÍAZ, L. et al. Mechanistic effects of calcitriol in câncer biology. **Nutrients**, v. 7, n. 6, p. 5020-5050, 2015.

ELIASSEN, A. Heather et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D and risk of breast cancer in women followed over 20 years. **Cancer Research**, p. canres. 0353.2016, 2016.

HAZEWINKEL, H. A W.; TRYFONIDOU, M. A. Vitamin D3 metabolism in dogs. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 197, p. 23–33, 2002.

HOLICK, M.F. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 8, p. 2062, 2006.

HOUGHTON, L.A.; VIETH, Reinhold. The case against ergocalciferol (vitamin D2) as a vitamin supplement. **The American journal of clinical nutrition**, v. 84, n. 4, p. 694-697, 2006

HOW, K.L; HAZEWINKEL, H.A.W; MOL, J.A. Dietary vitamin dependence of cat and dog due do inadequate cutaneous synthesis of Vitamin D. **General and Comparative Endocrinology**. v.96, p.12-18, 1994.

JACOBS, E.T. et al. Vitamin D and colorectal, breast, and prostate cancers: a review of the epidemiological evidence. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 3, p. 232, 2016.

KAEWSAKHORN, T. et al. Effects of calcitriol, seocalcitol, and medium-chain triglyceride on a canine transitional cell carcinoma cell line. **Anticancer research**, v. 25, n. 4, p. 2689-2696, 2005.

KRISHNAN, A.V.; SWAMI, Srilatha; FELDMAN, David. Vitamin D and breast cancer: inhibition of estrogen synthesis and signaling. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 121, n. 1, p. 343-348, 2010.

KUNAKORNSAWAT, S. et al. Effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 [1, 25 (OH) 2D3] and its analogues (EB1089 and analog V) on canine adenocarcinoma (CAC-8) in nude mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 5, p. 642-647, 2002.

LIMKETKAI, B.N.; BECHTOLD, Matthew L.; NGUYEN, Douglas L. Vitamin D and the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. **Current Gastroenterology Reports**, v. 18, n. 10, p. 52, 2016.

MALONE, E. K. et al. Calcitriol (1, 25-dihydroxycholecalciferol) enhances mast cell tumour chemotherapy and receptor tyrosine kinase inhibitor activity in vitro and has single-agent activity against spontaneously occurring canine mast cell tumours. **Veterinary and comparative oncology**, v. 8, n. 3, p. 209-220, 2010.

MCDONNELL, S.L. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations \geq 40 ng/mL are associated with $>$ 65% lower cancer risk: pooled analysis of randomized trial and prospective cohort study. **PloS one**, v. 11, n. 4, p. e0152441, 2016.

MELLANBY, R.J. Beyond the skeleton: the role of vitamin D in companion animal health. **Journal of Small Animal Practice**, v. 57, n. 4, p. 175-180, 2016.

MERCHAN, B.B. et al. The role of vitamin D and VDR in carcinogenesis: Through epidemiology and basic sciences. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, 2017.

MORRIS, J. G. Ineffective vitamin D synthesis in cats is reversed by an inhibitor of 7-dehydrocholesterol-delta7-reductase. **The Journal of nutrition**, v. 129, n. 4, p. 903-908, 1999.

MULLIN, G. E.; DOBS, A. Vitamin D and its role in cancer and immunity: a prescription for sunlight. **Nutrition in clinical practice: official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 22, p. 305-322, 2007.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients requirements of dogs and cats**. Washington,DC: The National Academies Press, 2006.

NORMAN, A. W. From vitamin D to hormone D: Fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 2, 2008.

NORMAN, A.W.; BOUILLON, Roger. Vitamin D nutritional policy needs a vision for the future. **Experimental Biology and Medicine**, v. 235, n. 9, p. 1034-1045, 2010.

OSUGA, T. et al. Vitamin D Status in Different Stages of Disease Severity in Dogs with Chronic Valvular Heart Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 6, p. 1518-1523, 2015.

PÉREZ-HERNÁNDEZ, N. et al. Vitamin D and its effects on cardiovascular diseases: a comprehensive review. **The Korean journal of internal medicine**, 2016.

PINHO, S.S. et al. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. **Translational Research**, v. 159, n. 3, p. 165-172, 2012.

RASSNICK, K.M. et al. In vitro and in vivo evaluation of combined calcitriol and cisplatin in dogs with spontaneously occurring tumors. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 62, n. 5, p. 881-891, 2008.

ROSA, C. T.; SCHOEMAN, J. P.; BERRY, J. L.; MELLANBY, R. J.; DVIR, E. Hypovitaminosis D in dogs with spirocercosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, p. 1159–1164, 2013.

SAMUEL, S.; SITRIN, M.D. Vitamin D's role in cell proliferation and differentiation. **Nutrition reviews**, v. 66, n. suppl 2, p. S116-S124, 2008.

SCHROOYEN, P.M.M.; VAN DER MEER, Roelof; DE KRUIF, C. G. Microencapsulation: its application in nutrition. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, n. 04, p. 475-479, 2001.

SELTING, K. A; SHARP, C.R; RINGOLD, R.; THAMM, D.H.; BACKUS. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in dogs—correlation with health and cancer risk. **Veterinary and comparative oncology**, 2014.

SHARP, C.R.; SELTING, K.A.; RINGOLD, R. The effect of diet on serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in dogs. **BMC research notes**, v. 8, n. 1, p. 442, 2015.

SHIRAZI, L. et al. Serum vitamin D (25(OH)D₃) levels and the risk of different subtypes of breast cancer: A nested case–control study. **The Breast**, v. 28, p. 184-190, 2016.

SHUI, I.; GIOVANNUCCI, E. Vitamin D status and cancer incidence and mortality. **Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer**, p. 33, 2015.

TITMARSH, H. F. et al. Low vitamin D status is associated with systemic and gastrointestinal inflammation in dogs with a chronic enteropathy. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0137377, 2015.

TRANG, H.M. et al. Evidence that vitamin D₃ increases serum 25-hydroxyvitamin D more efficiently than does vitamin D₂. **The American journal of clinical nutrition**, v. 68, n. 4, p. 854-858, 1998.

WAKSHLAG, J.J. et al. Cross-sectional study to investigate the association between vitamin D status and cutaneous mast cell tumours in Labrador retrievers. **British Journal of Nutrition**, v. 106, p. S60–S63, 2011.

WEIDNER, N.; VERBRUGGHE, A. Current knowledge of vitamin D in dogs. **Critical reviews in food science and nutrition**, n. just-accepted, 2016

ZHANG, H. et al. Vitamin D Deficiency and Increased Risk of Bladder Carcinoma: A Meta-Analysis. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 1686-1692, 2015.

ZHANG, X. et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels, vitamin D intake, and pancreatic cancer risk or mortality: a meta-analysis. **Oncotarget**, v. 8, n. 38, p. 64395, 2017.

3. CAPÍTULO I. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE 25-HIDROXIVITAMINA D EM CÃES SAUDÁVEIS E A SUA CORRELAÇÃO COM A DIETA

RESUMO

Os valores de referência da concentração sérica de vitamina D em cães não são bem estabelecidos. A principal fonte de vitamina D para os cães é a dieta, pois a sua síntese na pele é ineficiente. Existem fatores que podem afetar a relação entre a ingestão de vitamina D e os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D (25(OH)D), como: faixa etária, sexo, variação genética. Porém, não existem estudos em cães que comprovem a relação desses fatores com os valores séricos de vitamina D. Esse estudo teve como objetivos determinar valores de referência e avaliar se existe diferença entre as concentrações séricas de 25(OH)D em relação ao sexo, a faixa etária, e ao tipo de dieta, além de correlacionar com os níveis de cálcio total e fósforo e com a ingestão de vitamina D. Foram coletadas amostras de sangue de 59 cães saudáveis, população total, (G), dividido em dois grupos: Grupo 1 (G1): n= 30, Beagles, faixas etárias distintas (adultos e filhotes), dieta padronizada e Grupo 2 (G2): n= 29, raças variadas, mesma faixa etária (adultos) e dietas variadas. Foi realizado um questionário com os proprietários a respeito da dieta desses cães. Exames laboratoriais de triagem, incluindo a mensuração do cálcio total e do fósforo foram realizados. A 25(OH)D foi analisada pelo método de quimioluminescência. O intervalo de referência obtido na população total (G) tem limite inferior de 12,2 ng/ml e superior de 74,4 ng/ml com intervalo de confiança de 90%. Não foi observada diferença nos níveis séricos de 25(OH)D entre machos e fêmeas. No G1 os filhotes apresentaram uma concentração de 25(OH)D média (30,6 ng/ml) menor que os adultos (34,9 ng/ml). No G2 não foi observada diferença significativa entre os cães que recebiam alimento comercial e os que se alimentavam de uma combinação de alimento comercial e alimento caseiro. Não foi verificada correlação entre a 25(OH)D e os níveis de cálcio total e fósforo. A ausência de correlação significativa entre a ingestão de vitamina D por quilograma de peso corporal e a concentração de 25(OH)D (G1) sugere que outros fatores podem influenciar nessa relação.

Palavras chave: Vitamina D, canino, valor de referência, adultos, filhotes, nutrição.

ABSTRACT

The reference values of vitamin D serum concentration for dogs have not yet been established. The main source of vitamin D for dogs their diet since their skin synthesis is inefficient. There are factors that may affect the relation between vitamin D intake and serum 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) levels, such as: age, sex, genetic variation. However, there are no studies in dogs that prove the correlation of these factors with serum vitamin D values. The aim of this study was is to determine reference values and to assess whether there is a difference between serum 25(OH)D levels in relation to gender, age, and type of diet. In addition, to correlate the serum concentration of 25(OH)D with serum levels of total calcium and phosphorus and also with vitamin D intake. Blood samples were collected from 59 healthy dogs (G) divided into two groups: Group 1 (G1) – Beagles, different age groups (adults and puppies), standardized diets and Group 2 (G2) – varied breeds, same age group (adults) and various diets. A survey was conducted with the owners regarding the diet of these dogs. Laboratory tests were performed, including the measurement of total calcium and phosphorus. The 25(OH)D was analyzed using the chemiluminescence method. The reference range obtained for the total population (G) was between 12.2 ng/ml and 74.4 ng/ml. No difference was observed between serum levels of 25(OH)D from males and females. In G1, the puppies showed an average 25(OH)D concentration (30.6 ng / ml) lower than in adults (34.9 ng /ml). In G2, no significant difference was observed between dogs receiving commercial feed and those fed on a combination of commercial food and homemade diet. No correlation was found between 25(OH)D and total calcium and phosphorus levels. The lack of a significant correlation between the intake of vitamin D per kilogram of body weight and the concentration of 25(OH)D (G1) suggests that other factors may influence this correlation.

Keywords: Vitamin D, canine, reference range, adults, puppies, nutrition

3.1 INTRODUÇÃO

A vitamina D encontra-se sob duas formas principais na natureza, o colecalciferol (vitamina D₃) e o ergocalciferol (Vitamina D₂) que são metabolizados no organismo para atingir a sua forma ativa, a 1 α ,25 diidroxi-vitamina D (calcitriol). As principais fontes de vitamina D são a via endógena, pela síntese na pele a partir da exposição aos raios ultravioletas, e a via exógena, pela absorção na dieta (NORMAN, 2008; SONNE et al., 2014).

Diferente do que ocorre em humanos e herbívoros, em cães e gatos a síntese na pele é ineficiente em função da baixa disponibilidade do seu precursor, o 7-dihidrocolesterol. A principal fonte de vitamina D para esses animais é a dieta (HOW et al., 1994; MORRIS, 1999; KENNY et al., 2004). A vitamina D ingerida na dieta é absorvida no intestino e transportada na circulação sanguínea, pelas proteínas de ligação da vitamina D (VDBP), para o fígado, onde é convertida na 25-hidroxivitamina D (25(OH)D) e posteriormente para o rim onde ocorre a sua metabolização para a forma ativa (MELLANBY, 2016).

A vitamina D tem importante função na regulação da homeostase do cálcio e do fósforo e em conjunto com o paratormônio (PTH) está envolvida no metabolismo ósseo. A sua atuação ocorre por meio da interação com receptores nucleares da vitamina D (VDR) presentes em vários tecidos como intestino, rins e ossos (NORMAN & BOUILLON, 2010).

Evidências recentes têm indicado que a vitamina D apresenta importante papel na saúde celular e sistêmica, atuando em processos fisiológicos que vão além do metabolismo do cálcio e fósforo (MELLANBY, 2016). Modulando a expressão de genes relacionados ao crescimento celular e apresentando atividade imunomoduladora e anti-inflamatória (MULLIN & DOBS, 2007; SELTING et al., 2014 ; SHARP et al, 2015).

A 25(OH)D é a principal forma metabólica da vitamina D na circulação e possui meia-vida estimada de dez dias a três semanas. Como melhor indicador das condições da vitamina D no organismo, a 25(OH)D é a forma mais apropriada para mensuração da sua concentração sérica. (WEIDNER and VERBRUGGHE, 2016; MULLIN and DOBS, 2007; SONNE et al., 2014). No entanto, não existe um consenso quanto aos valores de referência da concentração sérica de 25(OH)D em cães, poucos são os parâmetros estabelecidos e ainda não é possível definir

os estados de deficiência, insuficiência ou suficiência (WAKSHLAG et al., 2011). Além disso, não há nenhum estudo sobre o *status* da vitamina D em cães no Brasil.

Os níveis séricos de 25(OH)D refletem a vitamina D absorvida na dieta dos cães. As dietas comerciais balanceadas geralmente contêm quantidade suficiente de vitamina D para suprir a necessidade nutricional, determinada entre 500 e 3.200 UI/Kg, segundo as recomendações da “The European Pet Food Industry Federation” (FEDIAF,2017), evitando prejuízos à absorção do cálcio e distúrbios de remodelação óssea. Entretanto, não se tem conhecimento se essa suplementação nos alimentos comerciais, normalmente a vitamina na sua forma D₃, é suficiente para atingir concentrações séricas de vitamina D consideradas ótimas para a saúde geral dos cães. (HAZEWINKEL and TRYFONIDOU, 2002, SHARP et al., 2015).

Esse estudo teve como objetivos determinar valores de referência e avaliar se existe diferença entre as concentrações séricas de 25(OH)D em relação ao sexo, a faixa etária (adultos e filhotes) e ao tipo de dieta, correlacionando com os níveis séricos de cálcio total e fósforo e com a ingestão de vitamina D.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais no Setor de Ciências Agrárias (CEUA-SCA) (nº protocolo 041/2015) e teve consentimento dos proprietários.

3.2.1 Grupo de estudo

O estudo foi realizado em uma população total (G) de 59 cães hígdos, (31 machos e 29 fêmeas, inteiros) com exames clínicos, hematológicos e bioquímicos (ALT, FA, Creatinina e uréia) normais, selecionados de várias regiões da cidade de Curitiba (Paraná, Brasil). Esses cães foram divididos em dois grupos: G1 - 30 cães da raça Beagle pertencentes ao Canil do Laboratório de Estudos em Nutrição Canina (LENUCAN), sendo 15 adultos de 6 anos e 15 filhotes de 6 meses; G2 – 29 cães, de raças diversas, de proprietários e provenientes da Unidade Móvel de Esterilização e Educação em Saúde (UMEES) da UFPR, adultos, com idade de 1 a 10 anos.

3.2.2 Dieta

No G1, os cães Beagle foram criados sob as mesmas condições e submetidos a uma dieta padronizada, um alimento comercial de manutenção da categoria Super Premium suplementado com 2.000 UI/kg de vitamina D, por um período de quatro semanas. Os adultos com peso médio de 12,3 kg receberam em média 219g, uma vez ao dia, de alimentação comercial para adultos. Os filhotes com peso médio de 4,5 kg receberam em média 198g, uma vez ao dia, da mesma alimentação comercial, mas para cães em crescimento (Tabela 1). No G2, os cães recebiam dietas variadas, os proprietários responderam a um questionário sobre a dieta de cada animal, sobre o tipo de alimento oferecido, nome comercial, quantidade e a frequência da alimentação, para verificar a variável dieta no estudo. As quantidades de vitamina D nas rações comerciais foram verificadas a partir de informações fornecidas pelo fabricante contidas no rótulo dos produtos. As referências da vitamina D nos principais alimentos caseiros, estimada a cada 100g de alimento, foram consideradas conforme a tabela de composição química dos alimentos (UNIFESP, 2012)

Tabela 1. Dieta recebida pelos cães Beagle do G1 – Análise da composição química da dieta

Alimento Comercial – Adulto Pequeno e médio porte	Alimento Comercial - Cães em crescimento Pequeno e médio porte
Matéria seca- 92,58%	Matéria seca- 91,88%
Proteína bruta- 26,44%	Proteína bruta- 31,33%
Fibra bruta- 2,48%	Fibra bruta- 2,67%
Extrato etéreo em hidrólise ácida -13,48%	Extrato etéreo em hidrólise ácida – 15,58%
Matéria Mineral – 9,68%	Matéria Mineral – 7,99%
Energia metabolizável – 4135,0 kcal/kg	Energia metabolizável – 4233,0 kcal/kg
*Cálcio Máx – 2,0%	*Cálcio Máx – 2,0 %
*Cálcio Mín - 1,6%	*Cálcio Mín -----
*Fósforo Mín - 10%	*Fósforo Mín - 0,8%
*Vitamina D3 - 2000 UI/kg	*Vitamina D3 - 2000 UI/kg

Valores dos nutrientes expressos com base na matéria seca

*Níveis de garantia da embalagem

3.2.3 Coleta de amostras, exames clínicos e laboratoriais

Os cães, em jejum de no mínimo 8 horas, foram submetidos a exame físico, e em seguida amostras de sangue (5ml) foram coletadas por venopunção da jugular ou cefálica, e acondicionadas em tubos com anticoagulante (EDTA) para realização do hemograma e sem anticoagulante para obtenção do soro. As análises laboratoriais de triagem foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFPR. O hemograma e os exames bioquímicos foram realizados nos analisadores Mindray BS2800Vet[®] e Mindray Chemistry Analyzer BS-200[®], respectivamente. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em microscópio óptico na extensão sanguínea corada com panótico rápido (Instant Prov Newprov[®]).

As amostras de sangue sem anticoagulante foram centrifugadas dentro de uma hora após a coleta para obtenção do soro. No soro foram realizadas as dosagens de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), para perfil hepático e ureia e creatinina para perfil renal. O cálcio total e fósforo foram mensurados por colorimetria pelo método do Arsenazo II e por método cinético UV com solução de molibdato, respectivamente. As amostras de soro que foram destinadas a mensuração de 25(OH)D foram armazenadas e congeladas a – 80°C até a análise.

3.2.4 Mensuração da 25(OH)D

A mensuração da concentração de 25(OH)D nas amostras de soro foi analisada pelo método de quimioluminescência no analisador imunodiagnóstico Vitros ECi (Johnson&johnson[®]) e o kit de ensaio 25-hidroxivitamina D total para Vitros ECi da (Johnson&Johnson[®]). Esse método consiste em uma técnica de imunoensaio competitivo baseado na quantificação da ligação da 25(OH)D da amostra a anticorpos monoclonais específicos que é mensurada indiretamente a partir da leitura de uma reação luminescente. A 25(OH)D da amostra, que se encontra ligada a uma proteína de ligação e é liberada pelo uso de uma solução de desnaturação, compete com o reagente 25-OH vitamina D marcado com peroxidase de rábano (HRP) pelo sítio de ligação no anticorpo monoclonal anti-vitamina D presente nos poços. Os materiais não ligados são removidos após

sucessivas lavagens. O conjugado de anticorpo e reagente marcado com HRP é medido por uma reação luminescente, a partir da adição de um substrato luminogênico. O HRP catalisa uma reação de oxidação desse substrato produzindo luz. Os sinais luminosos são lidos pelo sistema, a quantidade de conjugado de anticorpo e reagente marcado com HRP é indiretamente proporcional a quantidade de 25(OH)D na amostra. Esse método já é validado para cães (SELTING et al., 2014) e utiliza a unidade ng/ml para mensuração da 25(OH)D.

3.2.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software comercial Action Stat Pro 3.1 e a ferramenta Reference Value Advisor 2.1 (GEFFRÉ et al., 2011). As variáveis 25(OH)D, cálcio, fósforo e ingestão de vitamina D foram avaliados pelo teste de Shapiro Wilk para normalidade. A 25(OH)D e o fósforo foram avaliados pelo teste de Wilcoxon-Mann Whitney entre os grupos experimentais (resultados não paramétricos). Os níveis de cálcio, único com resultado paramétrico, foi avaliado por ANOVA e comparado pelo teste de Tukey. Para determinação dos valores de referência fez-se o uso métodos estatísticos robustos para dados não paramétricos. Para a comparação entre adultos e filhotes, fêmeas e machos, utilizou-se o teste Wilcoxon-Mann Whitney. Para comparar as diferentes faixas etárias e a concentração de 25(OH)D entre os cães alimentados com diferentes tipos de dieta foi utilizado o teste de Kruskal Wallis. Para avaliação de correlação entre 25(OH)D, fósforo e cálcio e a correlação entre a ingestão de vitamina D e a concentração de 25(OH)D (G1) foi realizada a matriz de correlação de Spearman. O valor de significância $P \leq 0,05$ foi considerado para todas as análises.

3.3. RESULTADOS

A concentração sérica de 25(OH)D na população total (G) variou de 10,6 a 74,6 ng/ml, com uma mediana de 33,7 ng/ml (interquartis Q1 e Q3; 29,4 e 40,4 ng/ml respectivamente). O intervalo de referência foi de 12,2 a 74,4 ng/ml, com intervalo de confiança de 90% (10,6-15,6 para o limite inferior e 56,5-74,6 ng/ml

para o limite superior). Na distribuição dos sexos eram 28 fêmeas inteiras e 31 machos inteiros. A média de idade foi de 3,4 anos. Não houve diferença significativa na concentração de 25(OH)D entre machos e fêmeas dentro dos respectivos grupos (G1 e G2) ($P>0,05$). As concentrações séricas de 25(OH)D (medianas e interquartis) do G1 e G2 estão apresentadas na Tabela 2 e 3, respectivamente.

A concentração sérica de cálcio na população total (G) variou de 8,2 a 10,5 mg/dl, com uma média e desvio padrão de $9,6\pm 0,48$ mg/dl. O nível de fósforo sérico variou entre 2,3 a 7,5 mg/dl, com uma mediana de 4,0 ng/ml (interquartis Q1 e Q3; 3,5 e 5,4 mg/dl respectivamente). Não houve correlação entre as concentrações de cálcio e fósforo e as concentrações de 25(OH)D, ($P=0,06$ e $P=0,08$, respectivamente). Porém houve correlação significativa entre as concentrações séricas de cálcio e fósforo ($P<0,05$). As concentrações séricas de Ca e P do G1 e G2 estão apresentadas na tabela 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2. Concentrações séricas medianas de 25(OH)D, cálcio total e fósforo em cães hípidos da raça Beagle, adultos e filhotes (G1).

Concentração sérica	Adultos (N=15)	Filhotes (N=15)	Total (N=30)
25(OH)D (ng/ml)	34,9 (33,4-40,8) ^a	30,6 (28,5-33,6) ^b	33,6 (33,4-40,8)
Mín/máx (ng/ml)	13,8-45,8	27-34,7	13,8- 45,8
Cálcio total (mg/dl)	*9,4±0,29	*10,1± 0,18	*9,8±0,46
Mín/máx (mg/dl)	8,9-10,1	9,8-10,5	8,9-10,5
Fósforo (mg/dl)	4,0 (3,7 – 4,1)	6,0 (5,7 – 6,4)	4,95 (4,0-6,0)
Mín/máx (mg/dl)	3,5-4,5	5,4-7,5	3,5-7,5

Os dados são apresentados como mediana (Q1-Q3).

*Únicos dados paramétricos são apresentados como média ± desvio padrão.

Medianas que não possuem a mesma letra sobrescrita são significativamente diferentes.

No G1 houve diferença significativa nas concentrações séricas de 25(OH)D entre adultos e filhotes. Nos cães adultos do G1 a concentração de 25(OH)D foi maior que nos filhotes, com $P=0,007$. (Tabela 2 e Fig 1).

Tabela 3. Concentrações séricas medianas de 25(OH)D, cálcio total e fósforo em cães hígdidos com diferentes tipos de dieta (G2).

Concentração sérica	Alimento comercial (N=15)	Alimento comerc./caseiro (N=13)	Total (N=29) †
25(OH)D (ng/ml)	35,8 (32,8-50,5) ^a	32,7 (30,7-42,9) ^a	34,6 (30,7-46,4)
Mín/máx (ng/ml)	15,5-74,6	10,6-74,1	10,6-74,6
Cálcio total (mg/dl)	*9,3±0,47	*9,5±1,1	*9,4± 0,44
Mín/máx (mg/dl)	8,2-9,8	8,9-10,3	8,2-10,3
Fósforo (mg/dl)	3,3 (3,2-4,0)	3,7 (3,0 -3,8)	3,5 (3,2-3,9)
Mín/máx (mg/dl)	2,3 -5,1	2,5-71	2,3-71

Os dados são apresentados como mediana (Q1-Q3).

*Únicos dados paramétricos são apresentados como média ± desvio padrão.

†Um cão do grupo 2 com alimentação exclusiva de comida caseira

Medianas que não possuem a mesma letra sobrescrita são significativamente difer

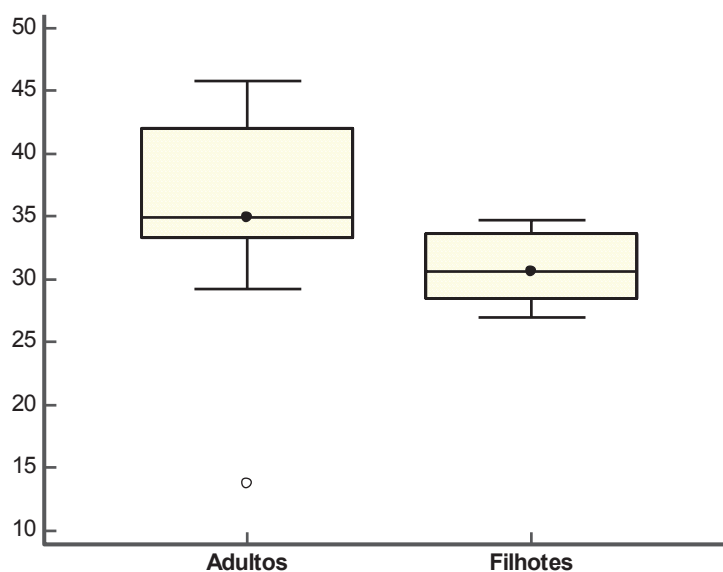


Figura 1. Concentração sérica de 25(OH)D (ng/ml) em cães Beagle adultos e filhotes (G1)

No G1, os Beagles adultos ingeriram em média 35,8 UI por kg de peso corporal ao dia de vitamina D e os filhotes ingeriram em média 88 UI por kg de peso corporal ao dia de vitamina D do alimento Super Premium. Os cães do G2 recebiam alimento comercial de 16 marcas distintas, com suplementação de vitamina D que variou de 560 a 3350 UI/kg. Do total de 29 cães no G2, em cinco dos casos os proprietários não souberam informar o alimento comercial que forneciam aos seus animais. Cerca de treze cães recebiam alimento comercial e

dieta caseira e um recebia exclusivamente dieta caseira. No cão que recebia apenas dieta caseira, verificou-se um das menores concentrações de 25(OH)D (15,7 ng/ml). Na maioria dos casos a dieta caseira consistia de restos de alimentos dos proprietários (arroz, polenta, tubérculos e raízes, frutas, pão, restos de frango e carne) que não contém vitamina D ou apresentam concentrações muito pequenas, em torno de 1 a 15 UI de vitamina D a cada 100g (Tabela de composição química dos alimentos – UNIFESP, 2012).

No G1 não foi observada correlação entre a quantidade de vitamina D (UI) ingerida por animal por quilograma de peso corporal ao dia e os níveis séricos de 25(OH)D ($P=0,08$). (Fig 2.).

No G2, para os cães que consumiam apenas alimento comercial, a concentração sérica de 25(OH)D variou de 15,5 a 74,6 ng/ml. Para os cães que se alimentavam da combinação alimento comercial e alimentação caseira a concentração de 25(OH)D variou de 10,6 a 74,1 ng/ml. Não houve diferença estatística significativa ($p =0,2$) na concentração sérica de vitamina D entre os cães que recebiam apenas alimento comercial em relação aos que recebiam alimento comercial e alimentação caseira (Tabela 2).

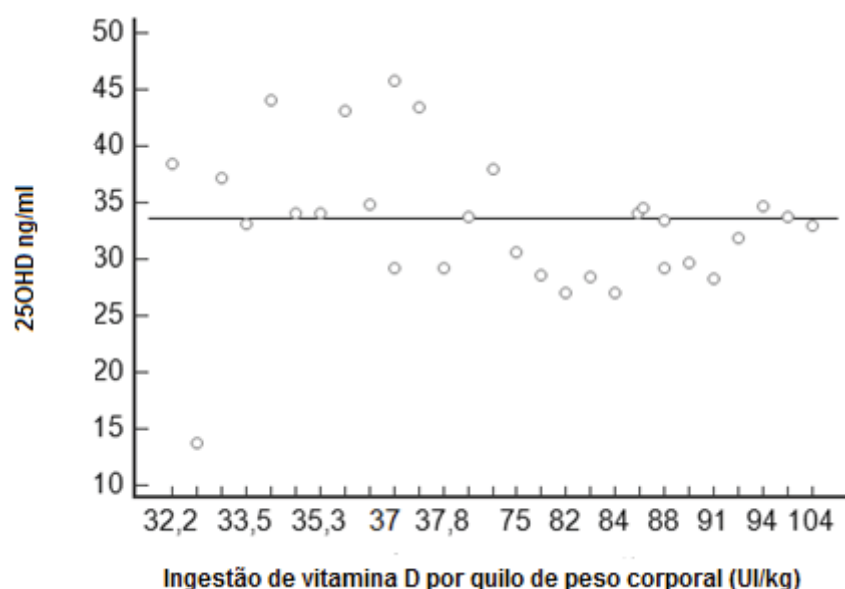


Figura 2. Concentração sérica de 25(OH)D (ng/ml) (mediana representada pela linha de referência horizontal) em cães Beagle adultos e filhotes de acordo com a quantidade de vitamina D ingerida por quilograma de peso corporal (UI/kg) (G1).

3.4. DISCUSSÃO

Na população total (G) de cães avaliados neste estudo foi encontrado um valor mediano (33,7 ng/ml) menor na concentração sérica de 25(OH)D (10,6-74,6 ng/ml) que a encontrada em 320 cães das raças Pastor Alemão e Golden Retriever aparentemente saudáveis (9,5-245 ng/ml, com mediana, Q1 e Q3; 69,9; 54,5 e 88,1 ng/ml, respectivamente) (SHARP et al., 2015). SHARP et al. (2015) observaram diferenças significativas entre os sexos. Nos machos inteiros a concentração de 25(OH)D foi significativamente maior que as fêmeas inteiras, o que foi justificado pela influência dos hormônios sexuais. Entretanto, no presente estudo não foi observada diferença entre machos e fêmeas.

Níveis de 25(OH)D menores que 20-25 ng/ml sugerem deficiência de vitamina D em relação ao desenvolvimento ósseo adequado (HAZEWINKEL & TRYFONIDOU, 2002). Nos cães desse estudo as concentrações séricas de 25(OH)D foram superiores a 25 ng/ml, com exceção de cinco cães, um do G1 e quatro do G2. Em nenhum cão foi verificado hipocalcemia, hipofosfatemia, sinais clínicos de raquitismo, osteomalácia ou algum comprometimento ósseo.

Os estudos em humanos, abordando a influência da vitamina D no desenvolvimento de neoplasias e outras doenças sistêmicas, têm demonstrado que os níveis séricos para obter suficiência nesse quesito podem ser diferentes dos requeridos para o metabolismo ósseo. Contudo, não existe ainda um consenso. A única pesquisa que abordou isso em cães, utilizando o ensaio de quimioluminescência para a mensuração da 25(OH)D sérica, sugeriu como suficiência níveis de 25(OH)D >100ng/ml, insuficiência entre 25 e 100ng/ml e a deficiência em concentrações <25ng/ml (SELTING et al., 2014). Considerando essa classificação, nesse quesito, os cães no presente estudo apresentariam insuficiência de vitamina D e cinco deles estariam em um estado de deficiência.

O papel da vitamina D na manutenção do equilíbrio entre o cálcio e o fósforo no organismo é bem estabelecido. No presente estudo não foi observada correlação direta entre as concentrações séricas de cálcio total e fósforo e os níveis de 25(OH)D. Selting et al. (2014) também não verificaram correlação. Existem outros mecanismos para compensar um eventual desequilíbrio entre cálcio e fósforo, pois a manutenção da homeostase exige controle rigoroso do organismo. No estudo de Tryfonidou et al. (2003), na suplementação de

colecalfiferol em quantidade 100 vezes maior do que o recomendado para cães em crescimento não foi suficiente para causar alterações significativas nas concentrações séricas de cálcio total e fósforo, e a absorção de cálcio se manteve em níveis de controle. A vitamina D em quantidades adequadas é responsável pela absorção de 30% do cálcio proveniente da dieta, podendo atingir 80% em períodos de crescimento, lactação ou gestação, mas vai depender também da quantidade de cálcio e fósforo ingeridos no alimento (HOLICK, 2004). Devemos considerar também que existem alguns mecanismos de absorção passiva do cálcio que independem da vitamina D (CHRISTAKOS et al., 2011).

Nesse estudo foram avaliados dois grupos de cães. No G1, os adultos apresentaram concentração de 25(OH)D significativamente maior que os filhotes. Considerando que eles recebiam dietas comerciais com a mesma quantidade de vitamina D e eram todos saudáveis, esse resultado sugere que pode existir uma diferença fisiológica em relação à absorção dessa vitamina entre filhotes e adultos. Os filhotes, mesmo ingerindo quantidade maior de vitamina D por quilograma corporal, possivelmente absorveram uma quantidade menor desse micronutriente. Alguns estudos sugerem que em filhotes a digestibilidade dos nutrientes pode ser inferior a dos adultos devido à maturação do trato gastrointestinal (FAHEY et al., 2008). Porém, não foram encontradas pesquisas que abordem a digestibilidade de vitaminas relacionadas à idade ou ao estágio da vida. Alguns estudos observaram que altas concentrações de hormônio do crescimento (GH) podem estar relacionadas ao aumento da hidroxilação da 25(OH)D em 1,25(OH)D, reduzindo os níveis plasmáticos de 25(OH)D (HAZEWINKEL & TRYFONIDOU, 2002; TRYFONIDOU et al., 2003), podendo justificar a menor concentração de 25(OH)D nos filhotes no presente estudo.

No G1, cães Beagle com dieta controlada, não houve correlação significativa entre a ingestão de vitamina D por quilograma de peso corporal e as concentrações de 25(OH)D (G1). Deve-se considerar que nem toda vitamina D ingerida será absorvida ou estará disponível na circulação, e que fatores individuais intrínsecos como a variação genética, escore corporal biodisponibilidade e absorção podem afetar esta relação (WEIDNER & VERBRUGGHE, 2016). Uma pesquisa em humanos verificou forte associação entre o percentual de gordura corporal e os níveis de 25(OH)D. A vitamina D metabolizada no organismo, por sua característica lipossolúvel, tem como

principal reservatório os adipócitos. Em indivíduos obesos devido a sua maior capacidade de armazenamento em gordura, os níveis circulantes de 25(OH)D disponíveis podem estar diminuídos (CARRELLI et al., 2016). Ainda não existem estudos que comprovem essa hipótese em cães.

Nos cães que recebiam dietas variadas (G2), apesar de não ter sido observada diferença significativa na concentração sérica de 25(OH)D entre os que recebiam apenas alimento comercial em relação aos alimentados com a combinação de alimento comercial e dieta caseira, o cão que se alimentava exclusivamente de comida caseira apresentou um dos níveis de 25(OH)D mais baixos, mas por se tratar de apenas um indivíduo não é possível afirmar que isso esteja relacionado à dieta que recebia. Porém, poucos são os alimentos naturalmente ricos em vitamina D (HOLLIS, 2005), e as dietas caseiras são frequentemente deficientes nesse nutriente. (STOCKMAN et al., 2013).

Considerando que a fonte primordial de vitamina D para cães é a dieta, pode-se sugerir que as diferenças nos níveis de 25(OH)D encontradas nessa população em comparação com outros estudos ocorram pelas variações na quantidade dessa vitamina na alimentação, além dos fatores individuais citados. Deve-se considerar também que existem fatores relacionados à própria formulação dos alimentos comerciais que podem afetar a sua biodisponibilidade. Embora existam poucas investigações a respeito desses fatores e ainda sejam pouco conclusivos, estudos sugerem que certos tipos de ácidos graxos podem favorecer a absorção de vitamina D e as fibras podem diminuir a sua biodisponibilidade, pois promovem a perda biliar de 25(OH)D e favorecem a eliminação rápida de seus metabólitos. (BOREL, CAILLAUD & CANO, 2015).

Uma limitação para a avaliação dos teores de vitamina D nas dietas foi a dificuldade de obter informações exatas quanto ao teor desse nutriente nas formulações comerciais e determinar a quantidade de alimento ingerido pelos cães do G2. A grande maioria das apresentações dos alimentos comerciais cita apenas os valores mínimos de suplementação e muitos não informam a quantidades. Os fabricantes informam apenas a concentração de vitamina D suplementada, não considerando a fração contida nos ingredientes na fabricação da ração. Dessa forma, não é possível determinar a quantidade exata de vitamina D presente nesses alimentos. A impossibilidade de analisar o teor desse nutriente nas rações comerciais é uma limitação nesse estudo. Em grande parte dos casos

esses animais recebiam restos de comida dos proprietários ou como complemento à ração alimentos que não apresentavam vitamina D, ou quantidades pequenas da mesma. Assim, no G2 não foi possível correlacionar diretamente a concentração sérica de 25(OH)D com a quantidade de vitamina D presente na dieta.

Segundo as recomendações da “The European Pet Food Industry Federation” (FEDIAF, 2017) a quantidade mínima de vitamina D em uma formulação para cães em crescimento e adultos em manutenção é de no mínimo 500UI/kg e no máximo 3.200 UI/kg, devendo ser balanceada com a relação Ca:P na dieta. Os alimentos comerciais que os cães desse estudo recebiam atendem a essa recomendação, e suprem a necessidade nutricional relacionada ao desenvolvimento ósseo e ao equilíbrio entre cálcio e fósforo. A única exceção foi um alimento comercial fornecido a um cão do G2, que apresentava 3.350UI/kg de vitamina D, atendendo as recomendações anteriores da “American Association of Feed Control” (AAFCO, 2014) que recomenda um limite máximo de 5.000 UI/kg.

Estudos são necessários para definir se os níveis ideais de suplementação de vitamina D nas formulações dietéticas refletem em concentrações séricas adequadas para a conservação da saúde celular, e quais os níveis adequados sem que ocorra toxicidade ou efeitos adversos, como hipercalcemia ou comprometimento da remodelação óssea.

3.5 CONCLUSÃO

O intervalo de referência para a concentração sérica de 25(OH)D encontrado na população geral (G) de cães é de 12,2 a 74,4 ng/ml. Não há diferença nos níveis de 25(OH)D entre machos e fêmeas, porém os adultos apresentam valores de 25(OH)D maiores que os filhotes (G1). Não existe diferença em relação à concentração sérica de 25(OH)D em cães que recebem apenas alimento comercial e aquelas se alimentam de uma combinação de alimento comercial e alimento caseiro. Não há correlação das concentrações de cálcio total e fósforo com os níveis séricos de 25(OH)D (G2). A ausência de correlação significativa entre a ingestão de vitamina D por quilograma de peso

corporal e a concentração de 25(OH)D (G1) sugere que outros fatores podem influenciar nessa r

REFERÊNCIAS

AAFCO - American Association of Feed Control. **Officials Official Publication, 1st ed.** Association of American Feed Control Officials Inc. Washington, DC, 2014.

BOREL, P.; CAILLAUD, D.; CANO, N. J. Vitamin D bioavailability: State of the art. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 55, n. 9, p. 1193-1205, 2015

CARRELLI, A. et al. Vitamin D Storage in Adipose Tissue of Obese and Normal Weight Women. **Journal of Bone and Mineral Research**, 2016.

CHRISTAKOS, S.; DHAWAN, P.; PORTA, A.; MADY, L.J.; SETH, T. Vitamin D and intestinal calcium absorption. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 347, n. 1, p. 25-29, 2011.

CLINE, J. Calcium and vitamin D metabolism, deficiency, and excess. **Topics in companion animal medicine**, v. 27, n. 4, p. 159-164, 2012.

FAHEY JR, G.C.; BARRY, K.A.; SWANSON, Kelly S. Age-related changes in nutrient utilization by companion animals. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 28, p. 425-445, 2008.

FEDIAF - The European Pet Food Industry Federation. **Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs.** The European Pet Food Industry Federation, Bruxelles, 2017.

GEFFRÉ, A et al.. Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 1, p. 107-112, 2011.

HAZEWINKEL, H.A.W.; TRYFONIDOU, M. A. Vitamin D3 metabolism in dogs. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 197, p. 23-33, 2002.

HOLICK, M.F. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. **The American journal of clinical nutrition**, v. 80, n. 6, p. 1678S-1688S, 2004.

HOLLIS, B.W. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. **The Journal of nutrition**, v. 135, n. 2, p. 317-322, 2005.

HOW, K.L; HAZEWINKEL, H.A. W; MOL, J.A. Dietary vitamin dependence of cat and dog due do inadequate cutaneous synthesis of Vitamin D. **General and Comparative Endocrinology**. v.96, p.12-18, 1994.

KENNY, D. E. ; O'HARA, T. M.; CHEN, T. C.; LU, Z.; TIAN,X; HOLICK, M.F. Vitamin D content in Alaskan Arctic zooplankton, fishes, and marine mammals. **Zoo Biology**, v. 23, n. 1, p. 33–43, 2004.

LIMKETKAI, B.N.; BECHTOLD, M.L.; NGUYEN, D.L. Vitamin D and the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. **Current Gastroenterology Reports**, v. 18, n. 10, p. 52, 2016.

MELLANBY, R. J. Beyond the skeleton: the role of vitamin D in companion animal health. **Journal of Small Animal Practice**, v. 57, n. 4, p. 175-180, 2016.

MORRIS, J. G. Ineffective vitamin D synthesis in cats is reversed by an inhibitor of 7-dehydrocholesterol-delta7-reductase. **The Journal of nutrition**, v. 129, n. 4, p. 903–908, 1999.

MULLIN, G. E.; DOBS, A. Vitamin d and its role in cancer and immunity: a prescription for sunlight. **Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 22, p. 305–322, 2007

NORMAN, A. W. From vitamin D to hormone D: Fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 2, 2008.

NORMAN, A.W.; BOUILLON, R. Vitamin D nutritional policy needs a vision for the future. **Experimental Biology and Medicine**, v. 235, n. 9, p. 1034-1045, 2010.

OSUGA, T. et al. Vitamin D Status in Different Stages of Disease Severity in Dogs with Chronic Valvular Heart Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 6, p. 1518-1523, 2015.

SHARP, C.R.; SELTING, K.A.; RINGOLD, R. The effect of diet on serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in dogs. **BMC research notes**, v. 8, n.1, p. 442, 2015.

SELTING, K.A et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in dogs–correlation with health and cancer risk. **Veterinary and comparative oncology**, 2014.

SONNE, C. et al. Altered vitamin D status in liver tissue and blood plasma from Greenland sledge dogs (*Canis familiaris*) dietary exposed to organohalogen contaminated minke whale (*Balaenoptera acuterostrata*) blubber. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, p. 403–408, 2014.

STOCKMAN, J. et al. Evaluation of recipes of home-prepared maintenance diets for dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 242, n. 11, p. 1500-1505, 2013.

TABELA DE COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ALIMENTOS. Universidade Federal de São Paulo. 2012. <http://www.unifesp.br/dis/servicos/nutri/> - Acessado setembro de 2016.

TRYFONIDOU, M. A et al. Dietary 135-fold cholecalciferol supplementation severely disturbs the endochondral ossification in growing dogs. **Domestic animal endocrinology**, v. 24, n. 4, p. 265-285, 2003.

WEIDNER, N.; VERBRUGGHE, A. Current knowledge of vitamin D in dogs. **Critical reviews in food science and nutrition**, n. just-accepted, 2016.

4. CAPÍTULO II. CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE 25- HIDROXIVITAMINA D COMO FATOR PREDITIVO E PROGNÓSTICO EM CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA

RESUMO

Estudos recentes em humanos têm relacionado à deficiência de vitamina D ao risco de câncer de mama, à mortalidade e a uma menor sobrevida. No entanto, não existe ainda nenhum estudo em cadelas com neoplasia mamária. Esse estudo tem como objetivos avaliar a relação entre os níveis séricos de 25(OH)D em cadelas e o risco de desenvolvimento de neoplasia mamária, o prognóstico e a sobrevida. Os cães nesse estudo foram separados em grupo controle (GC) e grupo com neoplasia mamária (GN). Para o GC foram selecionadas 78 cadelas adultas, saudáveis ao exame clínico e laboratorial. No GN foram incluídas 65 cadelas, adultas, diagnosticadas com tumor mamário, antes de serem submetidas ao tratamento. Após a mastectomia e de acordo com o tipo de neoplasia mamária definido pelo exame histopatológico foram divididas em três subgrupos: tumor mamário benigno, tumor mamário maligno e tumores mamários com outras neoplasias associadas. Nesse grupo foram verificados os exames de estadiamento e realizado levantamento das fichas clínicas e contato telefônico com os proprietários ao final do estudo para informações a respeito da progressão da doença, óbito e sobrevida. Os níveis séricos de 25(OH)D foram analisados pelo método de quimioluminescência. As cadelas do GN apresentaram concentrações séricas de 25(OH)D (24,9 ng/ml) significativamente inferiores ao GC (43,7 ng/ml) e o risco de desenvolver neoplasia mamária foi 6,2 vezes maior em cadelas com níveis séricos de vitamina D menores que 26,2 ng/ml. Contudo não houve diferença entre os subgrupos de neoplasia mamária. Em relação aos fatores prognósticos não houve diferença significativa nos valores médios de 25(OH)D entre os graus histológicos do tumor; da mesma forma, não houve diferença significativa na presença ou ausência de metástase. O risco de mortalidade aumentou em mais de 5 vezes em cadelas com neoplasia mamária que apresentavam concentrações séricas de 25(OH)D inferiores a 26,2 ng/ml. Os valores séricos de 25(OH)D no tercil inferior (<26,2 ng/ml) tiveram efeito significativo na curva de sobrevivência em relação ao tercil médio (26,2-43,2 ng/ml), mas não em relação ao tercil superior (43,2ng/ml). Os resultados do presente estudo são favoráveis ao papel da deficiência de vitamina D como um fator de risco para neoplasia mamária em cadelas. A mortalidade e o tempo de sobrevida apresentaram forte associação com os valores séricos de vitamina D em cadelas com neoplasia mamária.

Palavras-chave: vitamina D, cão, tumor de mama, mortalidade, sobrevida

ABSTRACT

Recent studies in humans have linked vitamin D deficiency to a higher breast cancer risk, mortality, and decreased survival. However, there is still no study on bitches with mammary neoplasm. This study aims to evaluate the relationship between serum levels of 25(OH)D in bitches and the risk of developing mammary neoplasm, prognosis and survival. The dogs in this study were separated in control group (CG) and group with mammary neoplasm (GN). For GC, 78 healthy adult dogs were selected for clinical and laboratory examination. In GN, 65 adult bitches, diagnosed with breast tumor and before being treated were included. After the mastectomy and according to the type of mammary neoplasm by histopathological examination were divided into three subgroups: benign breast tumor, malign breast tumor and breast tumors with other associated neoplasms. In group GN the staging exams were carried out, clinical files were obtained and the owners were contacted by telephone at the end of the study for information regarding the progression of the disease, death and survival. Serum levels of 25(OH)D were analyzed by chemiluminescence method. The bitches in GN had serum concentrations of 25(OH)D (24.9 ng/mL) significantly lower than GC (43.7 ng/mL) and the risk of developing breast cancer was 6.2 times higher in bitches with serum vitamin D levels lower than 26.2 ng/mL. However, there was no difference between the subgroups of mammary neoplasm. Regarding prognostic factors, there was no significant difference in the mean values of 25(OH)D between the histological grades of the tumor; likewise, there was no significant difference presence or absence of metastasis. The risk of mortality increased more than five fold in bitches with breast neoplasms that had serum concentrations of 25(OH)D lower than 26.2 ng/mL. Serum values of 25(OH)D in the lower tertile (<26.2 ng/mL) had a significant effect on the survival curve over the mean tertile (26.2-42.3 ng/mL), but not in relation to the upper tertile (43.2 ng/mL). The results of the present study are favorable to the role of vitamin D deficiency as a risk factor for breast cancer in bitches. Mortality and survival time were strongly associated with serum vitamin D values in bitches with mammary neoplasm.

Keywords: Vitamin D, Bitches, breast tumor, mortality, survival

4.1 INTRODUÇÃO

A vitamina D é um hormônio seco-esteróide conhecido pelo seu importante papel na manutenção da homeostase do cálcio e fósforo. No entanto, estudos recentes em humanos e cães têm evidenciado a influência da vitamina D em outros processos fisiológicos além do metabolismo ósseo (MOJTO et al., 2016; MELLANBY, 2016; WAKSHLAG et al., 2011; SELTING et al., 2014, OSUGA et al., 2015; TITMARSH et al., 2015).

Baixos níveis séricos de vitamina D têm sido relacionados ao risco de desenvolvimento de neoplasias e com a progressão da doença, em humanos (YIN et al., 2013; FELDMAN et al., 2014; MCDONNELL et al., 2016; JACOBS et al., 2016), e em cães (SELTING et al., 2014).

A vitamina D apresenta mais de uma forma metabólica e atinge a sua forma ativa após ser metabolizada no organismo. Em cães, ao contrário do que ocorre em humanos e herbívoros, a sua fonte principal é a dieta (WEIDNER & VERBRUGGHE, 2016).

A forma ativa da vitamina D, $1\alpha,25$ hidroxivitamina D ($1\alpha,25(\text{OH})\text{D}$) ou calcitriol, atua mediada por receptores nucleares da vitamina D (VDR) presentes nos tecidos alvo, principalmente intestino, rins e ossos. No entanto o VDR é expresso em quase todos os tecidos o organismo, dentre eles, o músculo cardíaco, músculo liso vascular, medula óssea, cérebro, próstata, glândula mamária, cólon e em células, como linfócitos T e B, e células apresentadoras de antígenos (BOUILLON et al., 2008; BAEKE et al., 2010).

A presença de receptores de vitamina D foi demonstrada em tecidos de mastocitoma (RUSSEL et al., 2010) e osteossarcoma (DAVIES et al., 2012) em cães. O VDR foi observado em tecido mamário neoplásico em humanos (LOPES et al., 2010). No entanto, ainda não existem relatos em tecido mamário de cadelas.

O calcitriol, mediado pelos receptores da vitamina D, regula a expressão de genes relacionados a uma série de mecanismos moleculares responsáveis pela manutenção da homeostase sistêmica (MERCHAN et al., 2017). Embora esse mecanismo de ação ainda não seja totalmente conhecido, sabe-se que a vitamina D, ao se ligar aos receptores presentes no núcleo das células alvo, desencadeia uma via genômica que envolve a transcrição e a síntese de proteínas relacionadas à regulação do crescimento celular e à modulação da inflamação;

processos de papel central no desenvolvimento das neoplasias (KAEWSAKHORN et al., 2005; SAMUEL & SITRIN, 2008, MERCHAN et al., 2017). Dessa forma, a vitamina D atua inibindo a inflamação, a proliferação celular, a angiogênese e a invasão celular e, estimula os processos de diferenciação e apoptose celular (MULLIN & DOBS, 2007; MERCHAN et al., 2017).

A forma metabólica, 25-hidroxivitamina D (25(OH)D), é o melhor indicador das condições da vitamina D no organismo e o biomarcador de escolha na mensuração das concentrações séricas de vitamina D (WEIDNER & VERBRUGGHE, 2016).

Cães com níveis séricos de 25(OH)D baixos apresentam um risco relativo aumentado de desenvolver câncer, como o hemangiossarcoma esplênico (SELTING et al., 2014), linfoma (GERBER; HAUSER; REUSCH, 2004) mastocitoma (WAKSHLAG et al., 2011). Contudo, essa relação não foi observada em cães com osteossarcoma (WILLCOX; HAMMETT-STABLER; HAUCK, 2016).

Embora ainda não haja um consenso, em humanos a deficiência de vitamina D tem sido associada à incidência e ao prognóstico do câncer de mama (BAUER et al., 2013; SHIRAZI et al., 2016). Além da sua ação antiproliferativa, estudos constataram que o calcitriol atenua a expressão dos receptores de estrogênio (ER) e inibe a síntese e as ações biológicas desse hormônio esteroide, o principal estimulador do crescimento das células do câncer de mama (KRISHNA; SWAMI & FELDMAN, 2010). Assim como em humanos, os ER também estão relacionados com o desenvolvimento de tumores mamários em cadelas (TIMMERMANS-SPRANG; GRACANIN & MOL, 2017; GENTILE et al., 2017).

O tumor de mama é o tipo de neoplasia que mais acomete as cadelas, e a incidência em fêmeas caninas é três vezes maior que nas mulheres. Os tumores mamários caninos e humanos compartilham semelhanças no seu comportamento biológico e em alguns aspectos moleculares, genéticos e histológicos, o que torna os tumores mamários em cadelas um bom modelo para o estudo do câncer de mama em humanos (SHAFIEE et al., 2013, GENTILE et al., 2017).

Além disso, várias pesquisas têm relacionado baixos níveis de 25(OH)D em mulheres com câncer de mama ao pior prognóstico e menor sobrevida (TRETLLI et al., 2012; MAALMI et al., 2014; LIM; JEON & SUH, 2015). Assim como foi constatada forte relação das concentrações séricas de vitamina D com a progressão do câncer e o índice de mortalidade (JACOBS et al., 2016).

Entretanto, não existem investigações que relacionem as concentrações séricas de vitamina D com a neoplasia mamária em cadelas, e nem estudos em cães que associem o *status* da vitamina D com o prognóstico e a sobrevida.

Dessa forma, esse estudo tem como objetivos verificar a relação entre os níveis séricos de 25(OH)D em cadelas e o risco de desenvolvimento de neoplasia mamária, o prognóstico e a sobrevida.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais no Setor de Ciências Agrárias (CEUA-SCA) (n° protocolo 041/2015) e teve consentimento dos proprietários.

Os cães foram separados em grupo controle (GC) e grupo com neoplasia mamária (GN).

4.2.1 Grupo controle (GC)

Foram selecionadas 78 cadelas adultas, com idades de 1 a 14 anos, de raças variadas, inteiras ou castradas, submetidas a processos eletivos no projeto da Unidade Móvel de Esterilização e Educação em Saúde (UMEES), e no Hospital Veterinário da UFPR (HV-UFPR), ou proveniente de proprietários particulares. Foram incluídas as cadelas saudáveis ao exame clínico e com exames hematológicos e bioquímicos (ALT, FA, creatinina e ureia) normais.

4.2.2 Grupo neoplasia mamária (GN)

Foram selecionadas 65 cadelas, adultas, com idades de 4 a 18 anos, de raças variadas, inteiras ou castradas, atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná (HV-UFPR) com diagnóstico de neoplasia mamária. O estudo foi realizado no período de maio de 2015 a novembro de 2016 e obedeceu aos seguintes critérios de inclusão: cadelas com tumor mamário, incluídas no momento do diagnóstico, antes de serem submetidas à ressecção do

tumor ou quimioterapia e com posterior confirmação do diagnóstico por exame histopatológico. Após a mastectomia, o tecido mamário foi encaminhado ao Laboratório de Patologia Veterinária do HV-UFPR para exame e classificação histopatológica conforme critérios do Consenso para o Diagnóstico, Prognóstico e Tratamento do tumor mamário (Cassali et al., 2011).

De acordo com o tipo de neoplasia mamária, definido pelo exame histopatológico, foram divididas em três subgrupos: tumor mamário benigno (16 cadelas), tumor mamário maligno (39 cadelas) e tumores mamários associados a outros tipos de neoplasia (10 cadelas). O terceiro subgrupo consiste de cadelas com tumor de mama, benignos (2) e malignos (8), com uma ou mais neoplasias malignas, associadas ou localizadas em outras áreas do corpo.

Foram verificados os exames de estadiamento, como radiografia de tórax e ultrassom abdominal, para verificar a presença ou não de metástase. Foi realizado levantamento das fichas clínicas e contato telefônico com os proprietários ao final do estudo para obter-se informações a respeito da evolução da neoplasia, cadelas que vieram a óbito e as que permanecem vivas e o período de sobrevivência. Foi considerado o tempo de sobrevivência global, o período da entrada do indivíduo no estudo (data do diagnóstico) até a ocorrência do óbito ou o fim do estudo. Não foram incluídas cadelas com alterações laboratoriais compatíveis com nefropatia crônica e nem com diagnóstico confirmado de doença endócrina.

4.2.3 Coleta das amostras e exames laboratoriais

As cadelas, em jejum de no mínimo 8 horas, foram submetidas a exame físico, e em seguida as amostras de sangue (5,0 ml) foram coletadas por venopunção da jugular ou cefálica e acondicionadas em tubos com anticoagulante (EDTA) para realização do hemograma e sem anticoagulante para obtenção do soro. As análises laboratoriais de triagem foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFPR. O hemograma e os exames bioquímicos foram realizados nos analisadores Mindray BC-2800Vet[®] e Mindray Chemistry Analyzer BS-200[®], respectivamente. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em microscópio óptico na extensão sanguínea corada com panótico rápido (Instant Prov Newprov[®]).

As amostras de sangue sem anticoagulante foram centrifugadas para a

obtenção do soro. No soro foram realizadas as dosagens de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase Alcalina (FA), para perfil hepático e ureia e creatinina para perfil renal. O cálcio total e fósforo foram mensurados apenas para controle. As amostras de soro que foram destinadas a mensuração de 25ODH foram congeladas e armazenadas a -20°C até a análise.

4.2.4 Mensuração da 25(OH)D

A mensuração da concentração de 25(OH)D nas amostras de soro foi analisada, pelo método de quimioluminescência, no analisador imunodiagnóstico Vitros ECI (Johnson&Johnson[®]) e o kit de ensaio 25-hidroxivitamina D total para Vitros ECI da (Johnson&Johnson[®]). Esse método consiste em uma técnica de imunoensaio competitivo, baseado na quantificação da ligação da 25(OH)D da amostra a anticorpos monoclonais específicos, que é mensurada indiretamente a partir da leitura de uma reação luminescente. A 25(OH)D da amostra, que se encontra ligada a uma proteína de ligação e é liberada pelo uso de uma solução de desnaturação, compete com o reagente 25-OH vitamina D, marcado com peroxidase de rábano (HRP), pelo sítio de ligação no anticorpo monoclonal anti-vitamina D presente nos poços. Os materiais não ligados são removidos após sucessivas lavagens. O conjugado de anticorpo e reagente marcado com HRP é medido por uma reação luminescente, a partir da adição de um substrato luminogênico. O HRP catalisa uma reação de oxidação desse substrato, produzindo luz. Os sinais luminosos são lidos pelo sistema, a quantidade de conjugado de anticorpo e reagente marcado com HRP é indiretamente proporcional à quantidade de 25(OH)D na amostra. Esse método é validado para cães (SELTING et al., 2014) e utiliza a unidade ng/ml para mensuração da 25(OH)D.

4.2.5 Dieta

No grupo controle, os proprietários responderam a um questionário sobre a dieta de cada animal, sobre o tipo de alimento oferecido, nome comercial, quantidade e a frequência da alimentação. No grupo de cadelas com neoplasia mamária foi realizado o mesmo questionário, com posterior contato telefônico com o proprietário para informações adicionais sobre a dieta. As quantidades de

vitamina D nas rações comerciais foram verificadas a partir de informações fornecidas pelo fabricante, contidas no rótulo dos produtos. As referências da vitamina D nos principais alimentos caseiros foram consideradas conforme a tabela de composição química dos alimentos (UNIFESP, 2012).

4.2.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software MedCalc 14.8.1.0 e a ferramenta Action Stat Pro 3.1. As variáveis 25(OH)D, cálcio e fósforo foram avaliadas pelo teste de Shapiro Wilk para normalidade. A 25(OH)D, o cálcio e o fósforo foram avaliados pelo teste de Wilcoxon-Mann Whitney entre os grupos experimentais (resultados não paramétricos). As idades resultaram em dados paramétricos que foram comparados pelo Teste de Tukey. Para a comparação entre grupo controle e grupo com neoplasia mamária, cadelas com e sem metástase, cadelas vivas e cadelas que vieram a óbito e entre cadelas inteiras e castradas utilizou-se o teste Wilcoxon-Mann Whitney. Para comparação entre os subgrupos tumores de mama e os graus de classificação histopatológica utilizou-se o teste de Kruskal Wallis.

Os valores séricos de 25(OH)D encontrados foram divididos em três categorias de acordo com o teriles de 33% e 66%, considerando as variáveis como fator de três níveis, e a partir dessas categorias, foi calculado o risco relativo de desenvolver neoplasia mamária. Para a análise de sobrevida global, a comparação da curva de sobrevivência entre as três categorias e razão do risco de mortalidade utilizou-se o método de Kaplan-Meier. Para obter a curva de probabilidade do tempo de sobrevida em relação aos três níveis categorizados de 25(OH)D utilizou-se a análise de regressão Cox de riscos proporcionais. O valor de significância $P \leq 0,05$ foi considerado para todas as análises.

4.3 RESULTADOS

No grupo controle, a concentração de 25(OH)D variou de 8,6 a 85,1 ng/ml e no grupo neoplásico, de 8,0 a 52,6 ng/ml. Os níveis séricos de 25(OH)D foram significativamente menores no grupo de neoplasia mamária em comparação ao grupo controle (tabela 1.) ($P < 0,0001$). (Fig 1). Os subgrupos tumor de mama benigno, tumor de mama maligno e tumor de mama associado a outros tipos de

neoplasia também apresentaram valores médios significativamente inferiores ao grupo controle (Fig 2.). Porém, não foi observada diferença na concentração sérica de 25(OH)D entre os mesmos ($P>0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração sérica de 25(OH)D nos grupo controle (GC) e neoplasia mamária (GN) e de acordo com os subgrupos de neoplasia mamária: benigna, maligna e associada à outra neoplasia.

	Nº de cães	25(OH)D (ng/ml)
Controle	78	43,7 (30,8-51,9) ^a
Neoplasia Mamária	65	24,9 (7,5 -31,8)
• Benigno	16	27,1 (20,1-31,0) ^b
• Maligno	39	23,2 (17,5-32,9) ^b
• Associada à outra neoplasia	10	25,7 (16,9-28,4) ^b

Os dados são apresentados como mediana (Q1-Q3)

Medianas que não possuem a mesma letra sobrescrita são significativamente diferentes

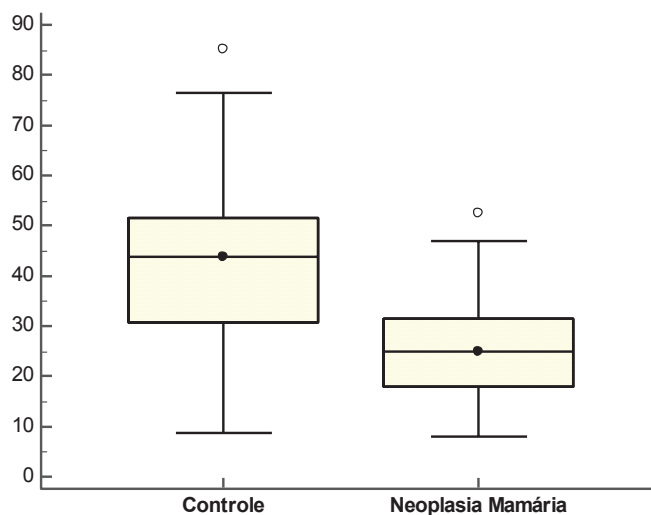


Fig 1. Box plot evidenciando as medianas (linhas horizontais com círculo central) e amplitude máxima e mínima das concentrações séricas de 25(OH)D no grupo controle e no grupo neoplásico.

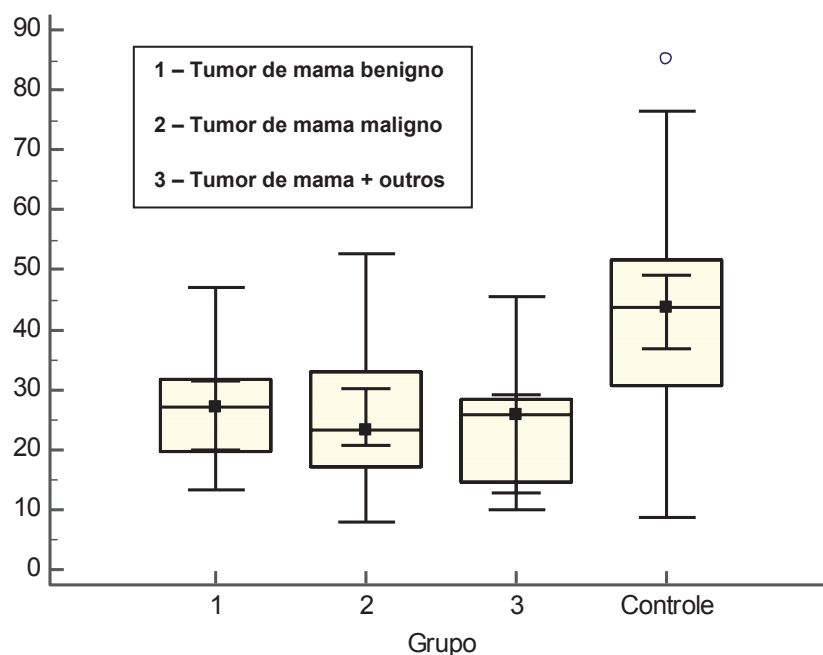


Fig 2. Box plot evidenciando as medianas (linhas horizontais com círculo central), os interquartis (linhas paralelas internas) e amplitude máxima e mínima das concentrações séricas de 25(OH)D nos subgrupos tumor de mama benigno, tumor de mama maligno, tumor de mama associado a outras neoplasias e no grupo controle.

Em relação à presença ou não de metástases e entre os graus histológicos nas neoplasias malignas, não foi verificada diferença nos níveis de 25(OH)D ($P > 0,005$), como pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2. Concentração sérica de 25(OH)D de acordo com a classificação histológica e a presença ou não de metástase em cadelas com neoplasia mamária maligna dos grupos adenocarcinoma e misto.

Características de malignidade	Nº de cães	25(OH)D (ng/ml)
Grau I	32	25,6 (21,1-33,4)
Grau II	11	20,8 (15,9- 29,9)
Grau III	2	17,6 (8,0-27,3)
Com metástase	12	24,1 (12,2-33,1)
Sem metástase	35	24,0 (18,5-30,9)

Os dados são apresentados como mediana (Q1-Q3)

*Em dois casos não foi realizada a classificação histológica por se tratar de adenocarcinoma mamário metastático em pulmão em que se optou por não realizar a mastectomia, apenas uma biópsia em pulmão.

A concentração sérica de 25(OH)D foi dividida em três categorias, de acordo com a determinação dos terteis de 33% e 66%, e a partir desses valores foi calculado o odds ratio, a razão de chance para neoplasia mamária em relação ao grupo controle (tabela 3). O Odds ratio foi inversamente proporcional às concentrações séricas de 25(OH)D, sendo inferior a um em níveis superiores a 42,3 ng/ml e superior a 6 em níveis inferiores a 26,2 ng/ml. Cadelas com concentrações séricas de 25(OH)D inferiores a 26,2 ng/ml apresentaram 6,2 vezes mais risco de desenvolver neoplasia mamária em relação às cadelas com níveis superiores a 42,3 ng/ml. Porém, não houve diferença estatística significativa no odds ratio em cadelas com concentrações séricas no nível intermediário, entre 26,2 e 42,3 ng/ml em relação aos níveis superiores e inferiores ($P=0,5588$).

Tabela 3. Odds ratio, razão de chance de desenvolvimento de neoplasia mamária.

25(OH)D ng/ml	Odds ratio (IC 95%)
<26,2	6,2069 ($P < 0,0001$)
26,2-42,3	1,2321 ($P=0,5588$)
>42,3	0,0917 ($P<0,0001$)

IC: Intervalo de confiança.

Quando $P < 0,05$ existe diferença significativa entre os grupos.

Das 14 cadelas que vieram a óbito, duas foram submetidas à eutanásia, e não houve nenhum relato de morte por causas acidentais ou aleatórias. O valor mediano de 25(OH)D sérico em cadelas, com neoplasia mamária, que vieram a óbito foi significativamente menor em comparação as cadelas vivas, como pode ser verificado na tabela 4 ($P=0,001$). Essa diferença está evidenciada na figura 3.

Tabela 4. Concentração sérica de 25(OH)D em cadelas com neoplasia mamária que vieram a óbito e cadelas que permaneceram vivas.

	Nº de cães	25(OH)D (ng/ml)
Vivo	51	27,3 (21,0-33,2) ^a
Óbito	14	15,2 (10,6 -24,1) ^b

Os dados são apresentados como mediana (Q1-Q3).

Medianas que não possuem a mesma letra sobrescrita são significativamente diferentes.

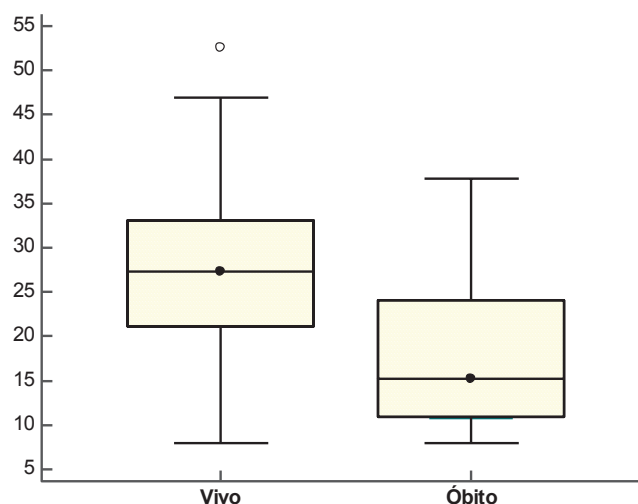


Fig 3. Box plot evidenciado as medianas (linha horizontal) e a amplitude (mínimo e máximo) das concentrações séricas de 25(OH)D nas cadelas vivas e nas que vieram a óbito.

Utilizando a concentração sérica de 25(OH)D como fator de risco e a dividindo em categorias: nível baixo, médio e alto, foi analisado o seu efeito no tempo de sobrevivida (figura 4). As curvas de sobrevivência entre as categorias diferiram significativamente e os níveis de 25(OH)D tiveram uma influência significativa sobre o tempo de sobrevivência ($P=0,005$). As cadelas com níveis de 25(OH)D no tercil inferior apresentaram um risco aumentado de mortalidade em comparação ao tercil médio ($P=0,001$), porém o tercil superior não demonstrou efeito significativo sobre a curva de sobrevivência. O risco de óbito foi cerca de 5 vezes maior nas cadelas, com tumor mamário, com concentrações séricas de 25(OH)D inferiores a 26,2 ng/ml (Tabela 5.)

Tabela 5. Razão de risco de óbito nas cadelas com neoplasia mamária calculada pela análise de sobrevivência de Kaplan-Meier

25(OH)D ng/ml	Razão de risco (IC 95%)
<26,2 ng/ml	5,7085 (1,8574-175443)
26,2 – 43,2 ng/ml	0,1752 (0,05700-0,5384)
>43,2 ng/ml	---

IC: intervalo de confiança

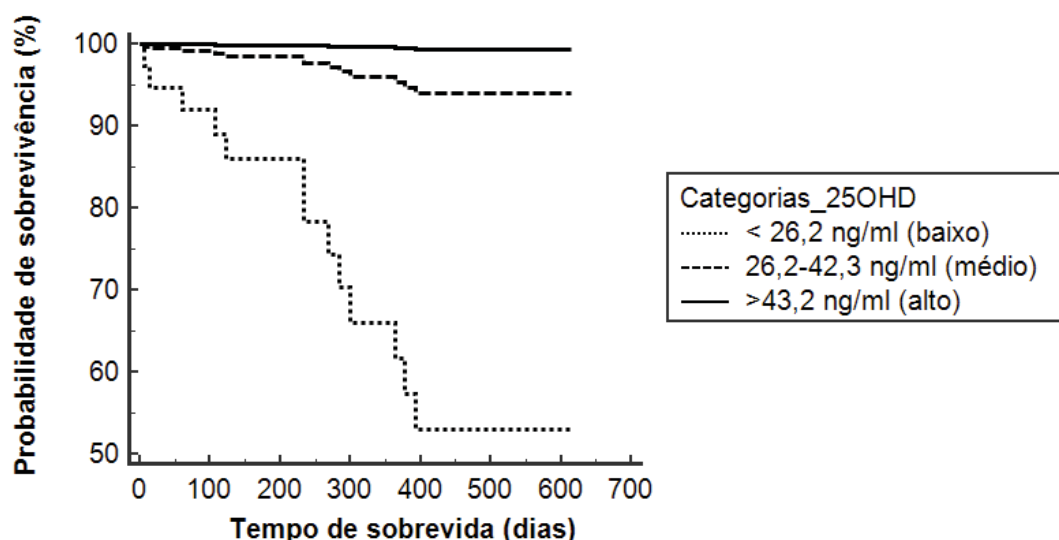


Fig 4. Curva de probabilidade de sobrevivência e tempo de sobrevivência de acordo com os níveis de 25(OH)D no grupo neoplasia mamária.

Avaliando outros fatores que podem ter influenciado o risco de morte e a sobrevivência, das 14 cadelas que vieram a óbito, 13 apresentavam adenocarcinoma e uma possuía adenoma com outra neoplasia maligna associada e 50% dessas cadelas apresentavam metástase. No entanto, a maioria das cadelas com adenocarcinoma (7) apresentavam tumor de grau histológico I, quatro delas tinham tumores de grau II e apenas uma possuía adenocarcinoma de grau III; e uma não foi classificada, pois já apresentava adenocarcinoma complexo metastático em pulmão e os proprietários optaram por não realizar a mastectomia.

Considerando outras variáveis de influência nos níveis de 25(OH)D, como idade, dieta e estado reprodutivo, verificamos no presente estudo que a média de idade do GC (quatro anos) foi menor que a do grupo com neoplasia mamária (10 anos). Porém, cadelas a partir dos 4 anos estavam presentes no grupo com neoplasia mamária (GN). E no grupo controle não houve diferença significativa nos níveis de 25(OH)D entre as cadelas com menos de 4 anos e mais de 4 anos ($p > 0,05$). A média de idade foi semelhante entre os subgrupos de neoplasia mamária no GN ($p > 0,05$). Em relação ao estado reprodutivo, no GC, 31 cadelas eram castradas e 47 inteiras e no GN, 10 eram castradas e 55 eram inteiras. Não houve diferença significativa na concentração de 25(OH)D entre cadelas castradas (44,7 ng/ml) e inteiras (43,8 ng/ml) no GC e nem no GN, 21,4 ng/ml e 25,3 ng/ml, respectivamente ($p > 0,05$).

Quanto à variável dieta, em ambos os grupos, controle e neoplásico, os cães recebiam dietas variadas. No GC, 51 cadelas alimentavam-se apenas de ração, 26 recebiam ração e comida caseira e uma exclusivamente comida caseira. No GN, 35 cadelas se alimentavam apenas de ração, 28 recebiam ração e comida caseira e duas exclusivamente comida caseira. Os alimentos caseiros consistiam basicamente de sobras de alimentos ou porções de carne, frango ou legumes adicionais. Nos questionários realizados com os proprietários dos cães do grupo controle, foram citadas 30 marcas e apresentações distintas de alimentos comerciais que variavam na quantidade vitamina D na sua composição de 550 a 3350 UI/Kg. Em doze casos, os proprietários não souberam informar o alimento comercial que forneciam aos seus animais. No grupo neoplásico, foram relatadas 28 marcas e apresentações distintas de alimentos comerciais que variavam na quantidade vitamina D na composição de 580 a 3.000 UI/Kg. Em doze casos, os proprietários não souberam informar o alimento comercial que forneciam aos seus animais. Nem todos os fabricantes informavam as quantidades de vitamina D presentes nos alimentos comerciais no rótulo do produto. Não foi possível precisar a quantidade de alimento ingerido por esses animais, e por consequência a quantidade de vitamina D.

4.4 DISCUSSÃO

Os resultados desse estudo apontam concentrações séricas de 25(OH)D significativamente menores em cadelas com neoplasia mamária (GN) em comparação ao grupo controle (GC), o que sugere que níveis séricos de vitamina D mais baixos pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de tumores mamários em cadelas.

Valores de 25(OH)D inferiores a 20-25ng/ml sugerem deficiência de vitamina D (HAZEWINKEL & TRYFONIDOU, 2002). Nesse estudo cerca de 50% das cadelas com neoplasia mamária e 16% do grupo controle apresentavam valores inferiores a 25ng/ml.

Embora existam poucos estudos em cães, essa associação entre baixas concentrações séricas de vitamina D e risco de neoplasias foi relatado em cães com linfoma e mastocitoma (WAKSHLAG et al., 2011; GERBER; HAUSER & REUSCH, 2004). Porém, apenas um estudo utilizou a mesma metodologia do

presente estudo, o imunoensaio por quimioluminescência. SELTING et al. (2014) verificaram uma relação entre a vitamina D sérica e o desenvolvimento de hemangiossarcoma esplênico e obtiveram um valor médio de 25(OH)D sérico de 49,2 ng/ml em cães com hemangiossarcoma esplênico e de 68,9 ng/ml no grupo controle. Observaram também uma relação inversa entre o risco relativo de câncer e os níveis séricos de 25(OH)D. Todavia, não existe nenhum estudo que relacione as concentrações séricas de vitamina D em cadelas com neoplasia mamária.

Em mulheres, esses estudos são recorrentes, mas ainda não existem resultados conclusivos. Meta-análises que abordam o assunto (JACOBS et al., 2016) revelaram que investigações epidemiológicas do tipo caso-controle encontraram evidências de que os níveis de 25(OH)D podem estar inversamente associados ao risco de câncer de mama (KIM et al., 2014) , ao contrário dos estudos prospectivos que não verificaram relação entre a suplementação de vitamina D e uma menor incidência de neoplasia mamária (JEFFREYS, REDANIEL & MARTIN, 2015). No presente estudo foi observada uma relação inversamente proporcional entre o risco de neoplasia mamária e as concentrações séricas de 25(OH)D, sendo que níveis inferiores a 26,2 ng/ml aumentaram em mais de seis vezes esse risco. Esses resultados corroboram com a relação inversa entre vitamina D sérica e câncer de mama encontrada por Alipour et al. (2014) em mulheres asiáticas e KIM et al. (2014) em mulheres brancas. Alipour et al. (2014) verificaram um risco três vezes maior de câncer de mama em níveis séricos de vitamina D inferiores a 12,5 ng/ml e Kim et al. (2014), um risco 7,5 vezes maior em concentrações menores que 20 ng/ml.

Quanto às características do tumor relacionadas ao prognóstico, no presente estudo não houve diferença nos valores de séricos de 25(OH)D em relação à malignidade, possivelmente por conta do número pequeno De tumores mamários benignos em comparação ao de cadelas com tumores malignos. O grau histológico dos tumores malignos: I, II e III, e a presença ou não de metástase não apresentaram relação com a concentração sérica de 25(OH)D.

A maioria das pesquisas em humanos abordam os tumores de mama malignos. Em um estudo em mulheres com tumores benignos e malignos, não foi observada diferença significativa nos níveis de 25(OH)D entre massas de mama benignas e malignas (ALIPOUR et al., 2014). Em relação ao grau histológico dos

tumores malignos, a literatura não é conclusiva. Goodwin et al. (2009) e YAO et al. (2016) observaram concentrações deficientes de vitamina D sérica associadas aos tumores de grau mais alto, mas outros estudos não verificaram diferença significativa e nenhuma correlação entre os graus de câncer de mama em mulheres e a vitamina D sérica (KERMANI et al., 2011; HATSE et al., 2012; IMTIAZ et al., 2012; SHIRAZI et al., 2016). Por fim, a associação entre a presença de metástase e os valores séricos deficientes de 25(OH)D em mulheres com câncer de mama ainda é algo controverso (KERMANI et al., 2011). Entretanto, uma pesquisa que comparou os níveis de vitamina D sérica em pacientes em estágio inicial e avançado da doença relatou concentrações significativamente maiores em mulheres com câncer de mama em estágio inicial do que naquelas com estágio avançado ou metastático (PALMIERI et al., 2006).

As abordagens a respeito dos níveis de 25(OH)D em relação à mortalidade e a sobrevida em pacientes com câncer de mama fornecem dados mais consistentes (JACOBS et al., 2016). No presente estudo, os resultados encontrados demonstram uma associação entre as concentrações séricas de vitamina D e a mortalidade. As cadelas com neoplasia mamária que vieram a óbito apresentaram valores séricos de 25(OH)D significativamente inferiores e o risco de óbito aumentou mais de 5 vezes em cadelas com concentrações séricas de 25(OH)D menores que 26,2 ng/ml. Apesar da metade das cadelas que vieram a óbito não apresentarem metástase e a maioria apresentar tumor de grau I, é importante considerar também que outros fatores como malignidade do tumor, grau histológico, presença de metástase e estágio da doença podem ter influenciado o risco de morte e a sobrevida.

Uma meta-análise (KIM & JEM, 2014) analisou cerca de seis estudos prospectivos que avaliaram a mortalidade relacionada aos níveis séricos de vitamina D em pacientes com câncer de mama. Em quatro desses estudos, as mulheres que apresentaram concentrações séricas mais elevadas de 25(OH)D tiveram uma relação significativa com o menor risco de mortalidade em comparação àquelas que tinham baixas concentrações (< 21 ng/ml) e esse risco diminuiu em 42% em pacientes com níveis de 25(OH)D maiores que 29,1 ng/ml (KIM & JEM, 2014). Um estudo recente obteve evidências convincentes sobre a associação da vitamina D com o menor risco de mortalidade em mulheres com câncer de mama (YAO et al., 2016).

Os achados do presente estudo suportam a hipótese de que os níveis séricos de vitamina D podem ter efeito no tempo de sobrevida em cadelas com neoplasia mamária. A curva de sobrevivência foi menor em cadelas com valores de 25(OH)D sérico no nível inferior (<26, 2 ng/ml) em relação ao nível intermediário (26,2-43,2 ng/ml), porém não houve efeito significativo do nível superior (> 43,2 ng/ml) na sobrevida. Isso se deve provavelmente ao fato de que um número pequeno de cadelas com neoplasia mamária, apenas seis, apresentou concentrações séricas no tercil superior. Quatro estudos em mulheres com câncer de mama relataram um tempo de sobrevida superior significativo em pacientes com valores de vitamina D séricos mais elevados (GOODWIN et al., 2009, HATSE et al., 2012; TRETLI et al., 2012, VRIELING et al., 2014). Apenas um estudo não encontrou associação significativa com a sobrevida (VILLASEÑOR et al., 2013). Uma pesquisa atual reforçou a premissa de que concentrações mais elevadas de 25(OH)D estão associadas com uma melhor sobrevida em pacientes com câncer de mama (YAO et al., 2016).

Embora várias pesquisas relacionem a deficiência de vitamina D ao câncer de mama em mulheres, ainda existem controvérsias, pois existem outros fatores que podem influenciar os níveis séricos de vitamina D, como: exposição aos raios ultravioletas, capacidade distinta de sintetizar vitamina D na pele entre as raças e grupos étnicos e a dieta (KIM et al., 2014). Em cães, a síntese de vitamina D na pele a partir da exposição ao sol não é significativa, o que ressalta a dieta como o principal fator de influência (WEIDNER & VERBRUGGHE, 2016).

No presente estudo, as cadelas de ambos os grupos recebiam dietas que variavam de alimento comercial e uma combinação de alimento comercial e comida caseira. Apenas uma cadela no grupo controle e duas no grupo neoplásico se alimentavam apenas de comida caseira. As dietas caseiras são reconhecidamente deficientes em vitamina D (STOCKMAN et al., 2013), mas no estudo do capítulo I não foi verificada diferença nas concentrações séricas de 25(OH)D entre cães que se alimentam apenas de ração e os que recebem uma combinação de ração e comida caseira. Os alimentos comerciais, que as cadelas do grupo controle e do grupo neoplásico recebiam, atendem as quantidades de vitamina D recomendada em uma formulação para cães adultos, da “The European Pet Food Industry Federation” (FEDIAF, 2017), de no mínimo 500UI/kg e no máximo 3.200 UI/kg, e da “American Association of Feed Control” (AAFCO,

2014), que sugere um limite máximo de 5.000 UI/kg. Em ambos os grupos, a quantidade de vitamina D nos alimentos comerciais citados variavam dentro de um intervalo semelhante. Não foi possível precisar a quantidade de vitamina D ingerida pelas cadelas no grupo controle e no grupo neoplasia, além de não se ter uma relação do escore da condição corporal das cadelas saudáveis e com neoplasia mamária, o que é uma limitação nesse estudo.

No presente estudo não houve diferença nas concentrações de 25(OH)D entre cadelas castradas e cadelas inteiras no GC e nem no GN. A influência hormonal e o efeito da ovariectomia como prevenção no desenvolvimento de neoplasia mamária é algo comprovado (BEAUVAIS, CARDWELL & BRODBELT et al., 2012). Na presente investigação, a grande maioria das cadelas do GN não eram castradas. Um estudo encontrou relação entre o estado reprodutivo e os níveis de 25(OH)D (SHARP et al., 2015). Sharp et al. (2015) observaram concentrações séricas de 25(OH)D menores em cadelas saudáveis castradas em relação as cadelas saudáveis inteiras. Cães castrados possuem uma maior tendência à obesidade e o armazenamento nos adipócitos pode reduzir os níveis de 25(OH)D circulantes. Essa hipótese já foi investigada em mulheres obesas, mas ainda não existe comprovação em cães (CARRELLI et al., 2016).

Não existem estudos que associem as concentrações séricas de 25(OH)D e a idade em cães e nem que avaliem a vitamina D em animais idosos. No entanto, os filhotes parecem ser mais sensíveis à deficiência de vitamina D em cães (HAZEWINKEL & TRYFONIDOU, 2002). Essa proposição foi reforçada pelos resultados encontrados no capítulo I, mas a maioria dos animais nesse estudo eram filhotes, adultos jovens ou de meia idade, não sendo possível uma avaliação dos níveis séricos em animais idosos. Em humanos, frequentemente tem se observado níveis de 25(OH)D menores em idosos em comparação a indivíduos mais jovens, o que se justifica por uma diminuição a exposição ao sol e menor capacidade de síntese de vitamina D na pele, diminuição na ingestão ou menor metabolização (BOREL, CAILLAUD & CANO, 2014). Contudo, não foi verificada diferença em relação à absorção da vitamina D entre jovens e idosos (JOHNSON et al., 2005). Em cães, a síntese de vitamina D na pele não é importante, porém não é possível descartar uma influência da idade nas concentrações séricas de

25(OH)D nos cães do presente estudo, seja pela diminuição da ingestão, absorção ou menor capacidade de metabolização da vitamina D.

Apesar das dificuldades de eliminar todas as variáveis de influência, as evidências nesse estudo são favoráveis ao papel da vitamina D como um fator de risco para neoplasia mamária em cadelas e à sua relação com a sobrevida.

4.5 CONCLUSÃO

Os níveis séricos de 25(OH)D podem estar relacionados ao risco de desenvolvimento de neoplasia mamária em cadelas. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas nas concentrações séricas de 25(OH)D em relação a fatores prognósticos como malignidade, grau histológico do tumor e presença de metástase; a mortalidade e o tempo de sobrevida apresentaram associação com os valores séricos de vitamina D em cadelas com neoplasia mamária.

REFERÊNCIAS

ALIPOUR, S. et al. Levels of serum 25-hydroxy-vitamin d in benign and malignant breast masses. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 1, p. 129-32, 2014.

BAEKE, F. et al. Vitamin D: modulator of the immune system. **Current opinion7-18)ion in pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 482-496, 2010.

BAUER, S.R. et al. Plasma vitamin D levels, menopause, and risk of breast cancer: dose-response meta-analysis of prospective studies. **Medicine**, v. 92, n. 3, p. 123, 2013.

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.

BOREL, P.; CAILLAUD, D.; CANO, N.J. Vitamin D bioavailability: state of the art. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 55, n. 9, p. 1193-1205, 2015.

BOUILLON, R. et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. **Endocrine reviews**, v. 29, n. 6, p. 726-776, 2008.

CARRELLI, A. et al. Vitamin D Storage in Adipose Tissue of Obese and Normal Weight Women. **Journal of Bone and Mineral Research**, 2016.

CASSALI, G.D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian journal of veterinary pathology**, v. 4, n. 2, p. 153-180, 2011.

DAVIES, J. et al. Vitamin D receptor, retinoid X receptor, Ki-67, survivin, and ezrin expression in canine osteosarcoma. **Veterinary medicine international**, v. 2012, 2012.

FELDMAN, D. et al. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. **Nature reviews cancer**, v. 14, n. 5, p. 342-357, 2014

GENTILE, L.B. et al. Establishment of primary mixed cell cultures from spontaneous canine mammary tumors: Characterization of classic and new cancer-associated molecules. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. e0184228, 2017.

GERBER, B.; HAUSER, B.; REUSCH, C. E. Serum levels of 25-hydroxycholecalciferol and 1, 25-dihydroxycholecalciferol in dogs with hypercalcaemia. **Veterinary research communications**, v. 28, n. 8, p. 669-680, 2004.

GOODWIN, P.J. et al. Prognostic effects of 25-hydroxyvitamin D levels in early breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 23, p. 3757-3763, 2009.

HATSE, S. et al. Vitamin D status at breast cancer diagnosis: correlation with tumor characteristics, disease outcome and genetic determinants of vitamin D insufficiency. **Carcinogenesis**, p. bgs187, 2012.

HAZEWINKEL, H. A W.; TRYFONIDOU, M. A. Vitamin D3 metabolism in dogs. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 197, p. 23–33, 2002.

IMTIAZ, S. et al. Vitamin D deficiency in newly diagnosed breast cancer patients. **Indian journal of endocrinology and metabolism**, v. 16, n. 3, p. 409, 2012.

JACOBS, E.T. et al. Vitamin D and colorectal, breast, and prostate cancers: a review of the epidemiological evidence. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 3, p. 232, 2016.

JEFFREYS, M.; REDANIEL, M.T.; MARTIN, R.M. The effect of pre-diagnostic vitamin D supplementation on cancer survival in women: a cohort study within the UK Clinical Practice Research Datalink. **BMC cancer**, v. 15, n. 1, p. 670, 2015.

JOHNSON, J.L. et al. Bioavailability of vitamin D from fortified process cheese and effects on vitamin D status in the elderly. **Journal of dairy science**, v. 88, n. 7, p. 2295-2301, 2005.

KERMANI, I.A. et al. Association of serum level of 25 hydroxy-vitamin D with prognostic factors for breast cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 12, n. 6, p. 1381-4, 2011.

KAEWSAKHORN, T. et al. Effects of calcitriol, seocalcitol, and medium-chain triglyceride on a canine transitional cell carcinoma cell line. **Anticancer research**, v. 25, n. 4, p. 2689-2696, 2005.

KIM, Y. et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D3 is associated with decreased risk of postmenopausal breast cancer in whites: a nested case-control study in the multiethnic cohort study. **BMC cancer**, v. 14, n. 1, p. 29, 2014.

KIM, Y.; JE, Y. Vitamin D intake, blood 25 (OH) D levels, and breast cancer risk or mortality: a meta-analysis. **British journal of cancer**, v. 110, n. 11, p. 2772-2784, 2014.

KRISHNAN, A.V.; SWAMI, Srilatha; FELDMAN, David. Vitamin D and breast cancer: inhibition of estrogen synthesis and signaling. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 121, n. 1, p. 343-348, 2010.

LIM, S.T; JEON, Y.W.; SUH, Y.J. Association between alterations in the serum 25-hydroxyvitamin d status during follow-up and breast cancer patient prognosis. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 16, n. 6, p. 2507-13, 2015.

LOPES, Nair et al. Alterations in Vitamin D signalling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions Vitamin D pathways unbalanced in breast lesions. **BMC cancer**, v. 10, n. 1, p. 483, 2010.

MAALMI, H. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and survival in colorectal and breast cancer patients: systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. **European journal of cancer**, v. 50, n. 8, p. 1510-1521, 2014.

MCDONNELL, S.L. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations ≥ 40 ng/mL are associated with $> 65\%$ lower cancer risk: pooled analysis of randomized trial and prospective cohort study. **PloS one**, v. 11, n. 4, p. e0152441, 2016.

MELLANBY, R. J. Beyond the skeleton: the role of vitamin D in companion animal health. **Journal of Small Animal Practice**, v. 57, n. 4, p. 175-180, 2016.

MERCHAN, B.B. et al. The role of vitamin D and VDR in carcinogenesis: Through epidemiology and basic sciences. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, 2017.

MOJTO, V. et al. The nonskeletal effects of vitamin D3 and the threshold limit associated with the risk of health complications. **Bratislavske lekarske listy**, v. 117, n. 3, p. 133-136, 2016.

MULLIN, G.E.; DOBS, A. Vitamin D and its role in cancer and immunity: a prescription for sunlight. **Nutrition in Clinical Practice: official publication of**

the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition, v. 22, n. 3, p. 305-322, 2007

OSUGA, T. et al. Vitamin D Status in Different Stages of Disease Severity in Dogs with Chronic Valvular Heart Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 6, p. 1518-1523, 2015.

PALMIERI, C. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels in early and advanced breast cancer. **Journal of clinical pathology**, v. 59, n. 12, p. 1334-1336, 2006.

RUSSELL, D. S. et al. An immunohistochemical study of vitamin D receptor expression in canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of comparative pathology**, v. 143, n. 2, p. 223-226, 2010.

SAMUEL, S.; SITRIN, M.D. Vitamin D's role in cell proliferation and differentiation. **Nutrition reviews**, v. 66, n. suppl 2, p. S116-S124, 2008.

SELTING, K. A. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in dogs—correlation with health and cancer risk. **Veterinary and comparative oncology**, 2014.

SHAFIEE, R. et al. Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: an Clinico-Cytopathological study with environmental factors influencing public health and medicine. **Cancer cell international**, v. 13, n. 1, p. 469, 2013.

SHIRAZI, L. et al. Serum vitamin D (25(OH)D₃) levels and the risk of different subtypes of breast cancer: A nested case–control study. **The Breast**, v. 28, p. 184-190, 2016.

TIMMERMANS-SPRANG, E.P. M.; GRACANIN, Ana; MOL, Jan A. Molecular Signaling of Progesterone, Growth Hormone, Wnt, and HER in Mammary Glands of Dogs, Rodents, and Humans: New Treatment Target Identification. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 4, 2017.

TITMARSH, H. F. et al. Low vitamin D status is associated with systemic and gastrointestinal inflammation in dogs with a chronic enteropathy. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0137377, 2015.

TRETLI, S. et al. Serum levels of 25-hydroxyvitamin D and survival in Norwegian patients with cancer of breast, colon, lung, and lymphoma: a population-based study. **Cancer Causes & Control**, v. 23, n. 2, p. 363-370, 2012.

VILLASEÑOR, A. et al. Associations of serum 25-hydroxyvitamin D with overall and breast cancer–specific mortality in a multiethnic cohort of breast cancer survivors. **Cancer Causes & Control**, v. 24, n. 4, p. 759-767, 2013.

VRIELING, A. et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D and postmenopausal breast cancer survival: Influence of tumor characteristics and lifestyle factors?. **International journal of cancer**, v. 134, n. 12, p. 2972-2983, 2014.

WAKSHLAG, J.J. et al. Cross-sectional study to investigate the association between vitamin D status and cutaneous mast cell tumours in Labrador retrievers. **British Journal of Nutrition**, v. 106, p. S60–S63, 2011.

WEIDNER, N.; VERBRUGGHE, A. Current knowledge of vitamin D in dogs. **Critical reviews in food science and nutrition**, n. just-accepted, 2016

WILLCOX, J.L.; HAMMETT-STABLER, C.; HAUCK, M.L. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in dogs with osteosarcoma do not differ from those of age-and weight-matched control dogs. **The Veterinary Journal**, v. 217, p. 132-133, 2016.

YAO, S. et al. Association of Serum Level of Vitamin D at Diagnosis With Breast Cancer Survival: A Case-Cohort Analysis in the Pathways Study. **JAMA oncology**, 2016.

YIN, L et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D serum concentration and total cancer incidence and mortality: a systematic review and meta-analysis. **Preventive medicine**, v. 57, n. 6, p. 753-764, 2013.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente dissertação agrega valores de referência para as concentrações séricas de vitamina D em cães e contribui para o conhecimento do *status da* vitamina D dentro da nossa realidade, tendo em vista que não existe nenhum outro estudo sobre a concentração sérica de 25(OH)D em cães no Brasil. Até o presente momento, esse é o primeiro estudo que aborda os níveis séricos de 25(OH)D como fator de risco para neoplasia mamária em cadelas e relaciona o *status* da vitamina D com a mortalidade e o tempo de sobrevivência em cães.

As pesquisas sobre a vitamina D em cães são escassas, e, além disso, faltam informações em relação à quantidade da vitamina D suplementada nos alimentos comerciais para animais de companhia. Esse panorama denota o quanto a vitamina D ainda é subestimada na Medicina Veterinária e limita a avaliação da dieta como uma variável importante.

Estudos relacionados à vitamina D são complexos e envolvem muitas variáveis e fatores de influência como: idade, sexo, estado reprodutivo, escore corporal, biodisponibilidade. Além disso, a vitamina D pode estar associada a uma série de alterações sistêmicas. Dessa forma, são necessárias pesquisas que avaliem mais detalhadamente o efeito desses fatores nos níveis séricos de 25(OH)D.

Os resultados desse estudo apontam evidências de que, assim como em mulheres, as concentrações séricas de 25(OH)D podem ter valor preditivo e prognóstico em cadelas com neoplasia mamária. Esses resultados abrem caminhos para novas investigações, porém são necessários ensaios clínicos, randomizados e controlados, que avaliem os efeitos a longo prazo de uma suplementação de vitamina D em cadelas saudáveis e com neoplasia mamária.

Os cães podem funcionar como um modelo interessante no estudo da vitamina D, sendo possível eliminar uma das variáveis, já que a exposição à radiação solar não é um fator de influência. Existem algumas semelhanças no comportamento biológico e nos aspectos moleculares, genéticos e histopatológicos da neoplasia mamária em cadelas e mulheres. Além disso, os cães possuem um tempo de vida mais curto. O que permite que esses animais sejam potenciais modelos de estudo para o efeito dos níveis séricos de 25(OH)D

no risco de neoplasia mamária, e no tempo de sobrevida em pacientes com tumor de mama.

Por fim, esse estudo pode contribuir para avanços nos conhecimentos a respeito do papel sistêmico da vitamina D e nas suas perspectivas como biomarcador na avaliação da saúde geral em cães.

REFERÊNCIAS

- AAFCO - American Association of Feed Control. **Officials Official Publication, 1st ed.** Association of American Feed Control Officials Inc. Washington, DC, 2014.
- ALIPOUR, S. et al. Levels of serum 25-hydroxy-vitamin d in benign and malignant breast masses. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 1, p. 129-32, 2014
- AL NOZHA, O.M. Vitamin D and extra-skeletal health: causality or consequence. **International journal of health sciences**, v. 10, n. 3, p. 443, 2016.
- AL SAWAH, S. et al. 25-Hydroxyvitamin D and glycemic control: A cross-sectional study of children and adolescents with type 1 diabetes. **Diabetes research and clinical practice**, v. 115, p. 54-59, 2016.
- ALVES, M. et al. Vitamina D—importância da avaliação laboratorial. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, v. 8, n. 1, p. 32-39, 2013.
- AUTIER, P. et al. Vitamin D status and ill health: a systematic review. **The lancet Diabetes & endocrinology**, v. 2, n. 1, p. 76-89, 2014.
- BAEKE, F. et al. Vitamin D: modulator of the immune system. **Current opinion in pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 482-496, 2010.
- BAUER, S.R. et al. Plasma vitamin D levels, menopause, and risk of breast cancer: dose-response meta-analysis of prospective studies. **Medicine**, v. 92, n. 3, p. 123, 2013.
- 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.
- BIKLE, D. Nonclassic actions of vitamin D. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 1, p. 26-34, 2009.
- BOREL, P.; CAILLAUD, D.; CANO, N. J. Vitamin D bioavailability: state of the art. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 55, n. 9, p. 1193-1205, 2015.
- BOUILLON, R. et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. **Endocrine reviews**, v. 29, n. 6, p. 726-776, 2008.
- CARLBERG, C. The physiology of vitamin D—far more than calcium and bone. **Frontiers in physiology**, v. 5, 2014.

CARRELLI, A. et al. Vitamin D Storage in Adipose Tissue of Obese and Normal Weight Women. **Journal of Bone and Mineral Research**, 2016.

CASSALI, G. D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian journal of veterinary pathology**, v. 4, n. 2, p. 153-180, 2011.

CASTRO, L. C. de. O sistema endocrinológico vitamina D. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 55, n. 8, p. 566-75, 2011.

CEBEY-LÓPEZ, M. et al. Role of Vitamin D in Hospitalized Children With Lower Tract Acute Respiratory Infections. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 62, n. 3, p. 479-485, 2016.

CHRISTAKOS, S. et al. Vitamin D and intestinal calcium absorption. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 347, n. 1, p. 25-29, 2011

CLINE, J. Calcium and vitamin D metabolism, deficiency, and excess. **Topics in companion animal medicine**, v. 27, n. 4, p. 159-164, 2012.

DAVIES, J. et al. Vitamin D receptor, retinoid X receptor, Ki-67, survivin, and ezrin expression in canine osteosarcoma. **Veterinary medicine international**, v. 2012, 2012.

DÍAZ, L. et al. Mechanistic effects of calcitriol in cancer biology. **Nutrients**, v. 7, n. 6, p. 5020-5050, 2015.

EKMEKCIOGLU, C.; HALUZA, D. ; KUNDI, M. 25-Hydroxyvitamin D Status and Risk for Colorectal Cancer and Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis of Epidemiological Studies. **International journal of environmental research and public health**, v. 14, n. 2, p. 127, 2017.

ELIASSEN, A. H. et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D and risk of breast cancer in women followed over 20 years. **Cancer Research**, p. canres. 0353.2016, 2016.

FAHEY JR, G.C.; BARRY, Kathleen A.; SWANSON, Kelly S. Age-related changes in nutrient utilization by companion animals. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 28, p. 425-445, 2008.

FEDIAF - The European Pet Food Industry Federation. **Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs**. The European Pet Food Industry Federation, Bruxelles, 2017.

FELDMAN, D. et al. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. **Nature reviews cancer**, v. 14, n. 5, p. 342-357, 2014

GEFFRÉ, A. et al. Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 1, p. 107-112, 2011.

GENTILE, L.B. et al. Establishment of primary mixed cell cultures from spontaneous canine mammary tumors: Characterization of classic and new cancer-associated molecules. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. e0184228, 2017.

GERBER, B.; HAUSER, B.; REUSCH, C. E. Serum levels of 25-hydroxycholecalciferol and 1, 25-dihydroxycholecalciferol in dogs with hypercalcaemia. **Veterinary research communications**, v. 28, n. 8, p. 669-680, 2004.

GOODWIN, P.J. et al. Prognostic effects of 25-hydroxyvitamin D levels in early breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 23, p. 3757-3763, 2009.

HATSE, S. et al. Vitamin D status at breast cancer diagnosis: correlation with tumor characteristics, disease outcome and genetic determinants of vitamin D insufficiency. **Carcinogenesis**, p. bgs187, 2012.

HAZEWINKEL, H. A W. ; TRYFONIDOU, M. A. Vitamin D3 metabolism in dogs. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 197, p. 23–33, 2002.

HOLICK, Michael F. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. **The American journal of clinical nutrition**, v. 80, n. 6, p. 1678S-1688S, 2004.

HOLICK, Michael F. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 8, p. 2062, 2006.

HOLLIS, Bruce W. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. **The Journal of nutrition**, v. 135, n. 2, p. 317-322, 2005.

HOUGHTON, L.A.; VIETH, Reinhold. The case against ergocalciferol (vitamin D2) as a vitamin supplement. **The American journal of clinical nutrition**, v. 84, n. 4, p. 694-697, 2006.

HOW, K.L; HAZEWINKEL, H.A.W; MOL, J.A. Dietary vitamin dependence of cat and dog due do inadequate cutaneous synthesis of Vitamin D. **General and Comparative Endocrinology**. v.96, p.12-18, 1994.

IMTIAZ, S. et al. Vitamin D deficiency in newly diagnosed breast cancer patients. **Indian journal of endocrinology and metabolism**, v. 16, n. 3, p. 409, 2012.

JACOBS, E.T. et al. Vitamin D and colorectal, breast, and prostate cancers: a review of the epidemiological evidence. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 3, p. 232, 2016.

JEFFREYS, M.; REDANIEL, Maria Theresa; MARTIN, Richard M. The effect of pre-diagnostic vitamin D supplementation on cancer survival in women: a cohort study within the UK Clinical Practice Research Datalink. **BMC cancer**, v. 15, n. 1, p. 670, 2015.

JOHNSON, J. L. et al. Bioavailability of vitamin D from fortified process cheese and effects on vitamin D status in the elderly. **Journal of dairy science**, v. 88, n. 7, p. 2295-2301, 2005.

KAEWSAKHORN, T. et al. Effects of calcitriol, seocalcitol, and medium-chain triglyceride on a canine transitional cell carcinoma cell line. **Anticancer research**, v. 25, n. 4, p. 2689-2696, 2005.

KENNY, D. E. et al. Vitamin D content in Alaskan Arctic zooplankton, fishes, and marine mammals. **Zoo Biology**, v. 23, n. 1, p. 33–43, 2004.

KERMANI, I. A. et al. Association of serum level of 25 hydroxy-vitamin D with prognostic factors for breast cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 12, n. 6, p. 1381-4, 2011.

KIM, Y. et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D3 is associated with decreased risk of postmenopausal breast cancer in whites: a nested case–control study in the multiethnic cohort study. **BMC cancer**, v. 14, n. 1, p. 29, 2014.

KIM, Y; JE, Y. Vitamin D intake, blood 25 (OH) D levels, and breast cancer risk or mortality: a meta-analysis. **British journal of cancer**, v. 110, n. 11, p. 2772-2784, 2014.

KRISHNAN, A.V.; SWAMI, Srilatha; FELDMAN, David. Vitamin D and breast cancer: inhibition of estrogen synthesis and signaling. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 121, n. 1, p. 343-348, 2010.

KUNAKORNSAWAT, S. et al. Effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 [1, 25 (OH) 2D3] and its analogues (EB1089 and analog V) on canine adenocarcinoma (CAC-8) in nude mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 5, p. 642-647, 2002.

LIM, S.T. ; JEON, Y.W. ; SUH, Y.J.. Association between alterations in the serum 25-hydroxyvitamin d status during follow-up and breast cancer patient prognosis. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 16, n. 6, p. 2507-13, 2015.

LIMKETKAI, B.N.; BECHTOLD, M. L.; NGUYEN, D.L. Vitamin D and the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. **Current Gastroenterology Reports**, v. 18, n. 10, p. 52, 2016.

LOPES, N. et al. Alterations in Vitamin D signalling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions Vitamin D pathways unbalanced in breast lesions. **BMC cancer**, v. 10, n. 1, p. 483, 2010.

MAALMI, H. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and survival in colorectal and breast cancer patients: systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. **European journal of cancer**, v. 50, n. 8, p. 1510-1521, 2014.

MALONE, E. K. et al. Calcitriol (1, 25-dihydroxycholecalciferol) enhances mast cell tumour chemotherapy and receptor tyrosine kinase inhibitor activity in vitro and has single-agent activity against spontaneously occurring canine mast cell tumours. **Veterinary and comparative oncology**, v. 8, n. 3, p. 209-220, 2010.

MCDONNELL, S.L. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations ≥ 40 ng/mL are associated with $> 65\%$ lower cancer risk: pooled analysis of randomized trial and prospective cohort study. **PloS one**, v. 11, n. 4, p. e0152441, 2016.

MELLANBY, R. J. Beyond the skeleton: the role of vitamin D in companion animal health. **Journal of Small Animal Practice**, v. 57, n. 4, p. 175-180, 2016.

MERCHAN, B.B et al. The role of vitamin D and VDR in carcinogenesis: Through epidemiology and basic sciences. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, 2017.

MOJTO, V. et al. The nonskeletal effects of vitamin D3 and the threshold limit associated with the risk of health complications. **Bratislavske lekarske listy**, v. 117, n. 3, p. 133-136, 2016.

MORRIS, J. G. Ineffective vitamin D synthesis in cats is reversed by an inhibitor of 7-dehydrocholesterol-delta7-reductase. **The Journal of nutrition**, v. 129, n. 4, p. 903–908, 1999.

MULLIN, G. E.; DOBS, A. Vitamin D and its role in cancer and immunity: a prescription for sunlight. **Nutrition in clinical practice: official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 22, p. 305–322, 2007.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients requirements of dogs and cats**. Washington,DC: The National Academies Press, 2006.

NORMAN, A.W. From vitamin D to hormone D: Fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 2, 2008.

NORMAN, A.W.; BOUILLON, R. Vitamin D nutritional policy needs a vision for the future. **Experimental Biology and Medicine**, v. 235, n. 9, p. 1034-1045, 2010.

OSUGA, T. et al. Vitamin D Status in Different Stages of Disease Severity in Dogs with Chronic Valvular Heart Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 6, p. 1518-1523, 2015.

PALMIERI, C. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels in early and advanced breast cancer. **Journal of clinical pathology**, v. 59, n. 12, p. 1334-1336, 2006.

PÉREZ-HERNÁNDEZ, N. et al. Vitamin D and its effects on cardiovascular diseases: a comprehensive review. **The Korean journal of internal medicine**, 2016.

PINHO, S.S. et al. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. **Translational Research**, v. 159, n. 3, p. 165-172, 2012.

RAMAGOPALAN, S.V. et al. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution. **Genome research**, v. 20, n. 10, p. 1352-1360, 2010

RASSNICK, K.M. et al. In vitro and in vivo evaluation of combined calcitriol and cisplatin in dogs with spontaneously occurring tumors. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 62, n. 5, p. 881-891, 2008.

ROSA, C. T.; SCHOEMAN, J. P.; BERRY, J. L.; MELLANBY, R. J.; DVIR, E. Hypovitaminosis D in dogs with spirocercosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, p. 1159–1164, 2013.

RUSSELL, D. S. et al. An immunohistochemical study of vitamin D receptor expression in canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of comparative pathology**, v. 143, n. 2, p. 223-226, 2010.

SAMUEL, S.; SITRIN, M.D. Vitamin D's role in cell proliferation and differentiation. **Nutrition reviews**, v. 66, n. suppl 2, p. S116-S124, 2008.

SCHROOYEN, P.M.M; VAN DER MEER, R.; DE KRUIF, C. G. Microencapsulation: its application in nutrition. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, n. 04, p. 475-479, 2001.

SELTING, K.A. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in dogs—correlation with health and cancer risk. **Veterinary and comparative oncology**, 2014.

SHAFIEE, R. et al.: Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: an Clinico-Cytopathological study with environmental factors influencing public health and medicine. **Cancer cell international**, v. 13, n. 1, p. 469, 2013..

SHARP, C.R.; SELTING, K.A.; RINGOLD, R. The effect of diet on serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in dogs. **BMC research notes**, v. 8, n. 1, p. 442, 2015

SHIRAZI, L. et al. Serum vitamin D (25(OH)D 3) levels and the risk of different subtypes of breast cancer: A nested case–control study. **The Breast**, v. 28, p. 184-190, 2016.

SHUI, I. ; GIOVANNUCCI, E. Vitamin D status and cancer incidence and mortality. **Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer**, p. 33, 2015

SONNE, C.; KIRKEGAARD, M.; JAKOBSEN, J.; JENSSEN, B.J, LETCHER, R.J.; DIETZ, R. Altered vitamin D status in liver tissue and blood plasma from Greenland sledge dogs (*Canis familiaris*) dietary exposed to organohalogen

contaminated minke whale (*Balaenoptera acuterostrata*) blubber. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, p. 403–408, 2014.

STOCKMAN, J. et al. Evaluation of recipes of home-prepared maintenance diets for dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 242, n. 11, p. 1500-1505, 2013.

TABELA DE COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ALIMENTOS. Universidade Federal de São Paulo. 2012. <http://www.unifesp.br/dis/servicos/nutri/> - Acessado setembro de 2016.

TIMMERMANS-SPRANG, E.P.M; GRACANIN, A.; MOL, J.A. Molecular Signaling of Progesterone, Growth Hormone, Wnt, and HER in Mammary Glands of Dogs, Rodents, and Humans: New Treatment Target Identification. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 4, 2017.

TITMARSH, H. F. et al. Low vitamin D status is associated with systemic and gastrointestinal inflammation in dogs with a chronic enteropathy. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0137377, 2015.

TRANG, H.M. et al. Evidence that vitamin D3 increases serum 25-hydroxyvitamin D more efficiently than does vitamin D2. **The American journal of clinical nutrition**, v. 68, n. 4, p. 854-858, 1998.

TRETLI, S. et al. Serum levels of 25-hydroxyvitamin D and survival in Norwegian patients with cancer of breast, colon, lung, and lymphoma: a population-based study. **Cancer Causes & Control**, v. 23, n. 2, p. 363-370, 2012.

TRYFONIDOU, M. A. et al. Dietary 135-fold cholecalciferol supplementation severely disturbs the endochondral ossification in growing dogs. **Domestic animal endocrinology**, v. 24, n. 4, p. 265-285, 2003.

VILLASEÑOR, A. et al. Associations of serum 25-hydroxyvitamin D with overall and breast cancer-specific mortality in a multiethnic cohort of breast cancer survivors. **Cancer Causes & Control**, v. 24, n. 4, p. 759-767, 2013.

VRIELING, A. et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D and postmenopausal breast cancer survival: Influence of tumor characteristics and lifestyle factors?. **International journal of cancer**, v. 134, n. 12, p. 2972-2983, 2014.

WAKSHLAG, J. J. et al. Cross-sectional study to investigate the association between vitamin D status and cutaneous mast cell tumours in Labrador retrievers. **British Journal of Nutrition**, v. 106, p. S60–S63, 2011.

WEIDNER, N.; VERBRUGGHE, A. Current knowledge of vitamin D in dogs. **Critical reviews in food science and nutrition**, n. just-accepted, 2016

WILLCOX, J.L.; HAMMETT-STABLER, C.; HAUCK, M.L. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in dogs with osteosarcoma do not differ from

those of age-and weight-matched control dogs. **The Veterinary Journal**, v. 217, p. 132-133, 2016.

YAO, S. et al. Association of Serum Level of Vitamin D at Diagnosis With Breast Cancer Survival: A Case-Cohort Analysis in the Pathways Study. **JAMA oncology**, 2016.

YIN, L. et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D serum concentration and total cancer incidence and mortality: a systematic review and meta-analysis. **Preventive medicine**, v. 57, n. 6, p. 753-764, 2013.

ZHANG, H. et al. Vitamin D Deficiency and Increased Risk of Bladder Carcinoma: A Meta-Analysis. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 1686-1692, 2015.

ZHANG, X. et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels, vitamin D intake, and pancreatic cancer risk or mortality: a meta-analysis. **Oncotarget**, v. 8, n. 38, p. 64395, 2017.

APÊNDICE

Apêndice 1 – Questionário nutricional realizado com os proprietários a respeito da dieta dos cães



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

QUESTIONÁRIO - DIETA

Nome do animal:		Ficha clínica:	
Idade:	Sexo:	Raça:	Peso:

Esse questionário pertence a um projeto de mestrado que tem como objetivo estabelecer valores para a concentração sanguínea de vitamina D em cães com neoplasia e relacionar com as dietas que recebem. Serão aproveitadas as amostras de sangue coletadas de seu animal durante a consulta pelo médico veterinário. Sua colaboração é de extrema importância para o andamento desse projeto, seguem abaixo algumas perguntas rápidas sobre a alimentação do seu cão que devem ser respondidas com sinceridade. Peço por gentileza que assinem o termo de consentimento na última página concordando com a participação na pesquisa.

1. Qual o tipo de alimentação você tem oferecido ao seu cão nas últimas 3 semanas?

Ração ()

Comida Caseira ()

1.1 No caso de ração, qual a marca?

No caso de comida caseira, qual o tipo de alimento?

Arroz ()

Frango ()

Carne ()

Batata ()

Outros _____

1.2 Costuma fornecer a comida caseira junto ou separado da ração (no caso de também oferecer comida caseira) ?

2. Qual a frequência em que você alimenta seu cão?

1 x ao dia ()

2x ao dia ()

3x ao dia ()

3. Qual a quantidade de alimento que você oferece ao seu Cão ao dia? Controla a quantidade?

½ copo ()

1 copo ()

2 copos ()

3 copos ()

Outra _____

4. Você ofereceu algum petisco ao seu animal nas últimas 3 semanas?

Sim () Não ()

Se sim, que tipo de petisco?

Biscoitos ()

Bifinhos ()

Palitos ()

Outros ()

Quantos por dia?

Quai(s) a(s) marcas?

Apêndice 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido fornecido aos proprietários

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, nacionalidade _____

idade _____ anos, estado civil _____, profissão _____
 endereço _____ RG _____, estou permitindo a

participação do meu animal em um estudo denominado: **Concentração sérica de vitamina D em cães** cujos objetivos e justificativas são: Estabelecer valores para a concentração sanguínea de vitamina D em cães saudáveis e em cães com neoplasia relacionando com as dietas que recebem.

Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar, meu animal irá se beneficiar de exames clínicos e de sangue de rotina que vão permitir avaliar seu estado de saúde naquele momento. E sendo ele parte do projeto da Unidade Móvel de Esterilização e Educação em Saúde (UMEES), serão utilizadas as amostras de sangue já coletadas como protocolo para avaliar se ele possui condições de serem submetidos à anestesia e cirurgia de castração, a coleta não será feita apenas para uso em pesquisa.

Recebi, os esclarecimentos necessários sobre os procedimentos a serem realizados e que eles não causarão nenhum tipo de desconforto ao animal, pois vão consistir apenas da coleta de sangue.

Estou ciente de que o meu animal será atendido, respeitado e receberá os cuidados necessários, como qualquer outro elemento submetido da mesma forma a procedimentos onde não estejam sendo utilizados para fins de pesquisa.

Também fui informado de que posso recusar a participação do meu animal no estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e se desejar sair da pesquisa, não serei prejudicado à assistência que possa estar recebendo ao meu animal.

O referido projeto a ser realizado na Universidade Federal do Paraná (UFPR) conta com pesquisadores envolvidos a mestrandos do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias Flávia Moreira da Fonseca e a Prof^a. Dra. Rosângela Locatelli Dittrich e com eles poderei manter contato pelos telefones: 8470-1757 e 3350-5729

É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo, todos os dados a respeito serão sigilosos a terceiros, durante e depois da participação da pesquisa.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de tudo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em permitir a participação do mesmo, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, pela participação do meu animal.

Curitiba __, de _____ de _____

Proprietário ou responsável pelo animal

ANEXO

Anexo 1 – Certificado de aprovação na comissão de ética no uso de animais - CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 041/2015, referente ao projeto "Concentração sérica de vitamina D em cães", sob a responsabilidade de Rosângela Locatelli Ditttrich – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, em reunião de 27/05/2015

Vigência do projeto	16/06/2015 a 16/08/2016
Espécie/Linhagem	Cães da raça Beagle e raças variadas
Número de animais	160 (cento e sessenta animais)
Peso/Idade	Peso médio de 2 a 15 kg / Idade entre 5 meses a 7 anos
Sexo	Ambos
Origem	Animais da rotina do HV – UFPR, do canil do Laboratório de Estudos em Nutrição Canina (LENUCAN) e de um canil comercial.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 041/2015, regarding the project "Serum vitamin D concentration in dogs", under Rosângela Locatelli Ditttrich supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), in session of 05/27/2015

Duration of the project	06/16/2015 to 08/16/2016
Specie/Line	Beagle dogs and varied breeds
Number of animals	160 (one hundred and sixty animals)
Wheight/Age	Average weight of 2 to 15 kg / age from 5 months to 7 years
Sex	Both
Origin	Animals from Veterinary hospital - UFPR, Laboratory of Canine Nutrition (LENUCAN) and a commercial kennel.

Curitiba, 27 de Maio de 2015.

Ananda Portella Félix
Presidente CEUA-SCA

Simone Tostes de Oliveira Stedile
Vice-Presidente CEUA-SCA

Anexo 2 – Certificado adicional de aprovação na comissão de ética no uso de animais - CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO ADICIONAL

Certificamos que o protocolo número 041/2015, referente ao projeto “**Concentração sérica de vitamina D em cães**”, aprovado pela CEUA em 27/05/2015, sob a responsabilidade de **Rosângela Locatelli Dittrich** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada à colheita de sangue dos animais pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, em reunião de 17/12/2015, com a ressalva que seja adicionado mais 80 cães, procedentes do projeto da Unidade Móvel de Esterilização e Educação em Saúde (UMEES), sendo adotado o mesmo procedimento experimental já aprovado no protocolo 041/2015.

ADDITIONAL CERTIFICATE

We certify that the protocol number 041/2015, regarding the project “**Serum vitamin D concentration in dogs**”, approved by CEUA in 05/27/2015, under **Rosângela Locatelli Dittrich** supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved the blood collection from the animals by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), in session of 12/17/2015, with the addition of 80 dogs from the “Unidade Móvel de Esterilização e Educação em Saúde (UMEES)” project, with the same procedures previously approved on 041/2015 protocol.

Curitiba, 17 de Dezembro de 2015.

Ananda Portella Félix

Presidente CEUA-SCA

Anexo 3 – Princípios do método de quimioluminescência- Kit de ensaio 25-hidroxitamina D total para Vitros ECi da (Johnson&Johnson®).

tVitD

VITROS[®] Products
Immunodiagnostic

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Advertências e Precauções

Princípios do Procedimento

O teste de 25-OH Vitamin D Total VITROS é efectuado utilizando a Embalagem de Reagente para 25-OH Vitamin D Total VITROS e os Calibradores para 25-OH Vitamin D Total VITROS nos Sistemas de Imunodiagnóstico ECi/ECiQ VITROS, no Sistema de Imunodiagnóstico VITROS 3600 e no Sistema Integrado VITROS 5600 utilizando Tecnologia Intellicheck®.

Utiliza-se uma técnica de imunoensaio competitivo, que envolve a libertação da 25-OH vitamina D na amostra a partir da proteína de ligação, utilizando uma solução de desnaturação de pH baixo e a competição subsequente da 25-OH vitamina D livre com reagente 25-OH vitamina D marcado com peroxidase de rábano (HRP) para anti-vitamina D monoclonal ligado aos poços. Os materiais não ligados são removidos por lavagem.

O conjugado de HRP ligado é medido por uma reacção luminescente.³ É adicionado um reagente contendo substratos luminogénicos (um derivado do luminol e um sal perácido) e um agente de transferência de electrões aos poços. O HRP no conjugado ligado catalisa a oxidação do derivado de luminol, produzindo luz. O agente de transferência de electrões (um substituto da acetanilida) aumenta o nível de luz produzida e prolonga a respectiva emissão. Os sinais luminosos são lidos pelo sistema. A quantidade de conjugado de HRP ligado é indirectamente proporcional à concentração de 25-OH vitamina D presente.

Tipo de Teste	Sistema*	Tempo de Incubação	Tempo para o primeiro resultado	Temperatura do Teste	Volume da Amostra de Reacção
Imunoensaio competitivo	ECi/ECiQ, 3600, 5600	16 minutos	24 minutos	37 °C	60 µL

* Nem todos os produtos e sistemas estão disponíveis em todos os países.

Esquema da Reacção

Poço revestido com estreptavidina

