

Acetylcholinesterase activity and total antioxidant levels in dogs with mammary tumors before and after surgical removal

Actividad de acetilcolinesterasa y niveles totales de antioxidantes en perros con tumores de mama antes y después de la extirpación quirúrgica

Joice LM Faria^{1*} Ph.D, Raissa I Rossi¹ M.Sc, Aleksandro S Da Silva² Ph.D, Nathieli B Bottari³ M.Sc, Débora Olsson¹ Ph.D, Jéssica L Dalberto¹ M.Sc, Ricardo E Mendes¹ Ph.D, Felipe AR Sueiro⁴ Ph.D, Wanderson AB Pereira¹ Ph.D, Eduardo N Mueller¹ M.Sc, Maria RC Shetinger³ Ph.D, Naiara Guarda⁵ M.Sc, Rafael N Moresco⁵ Ph.D, Matheus D Baldissera⁶ M.Sc, Gustavo Machado⁷ Ph.D.

¹College of Veterinary Medicine, Instituto Federal Catarinense, Concórdia. Santa Catarina (SC), Brazil. ²Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, SC, Brazil. ³Universidade Federal de Santa Maria, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Santa Maria, RS, Brazil. ⁴Laboratory of Pathology, Campinas, SP, Brazil. ⁵Universidade Federal de Santa Maria, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Santa Maria, RS, Brazil. ⁶Universidade Federal de Santa Maria, Department of Microbiology and Parasitology, Santa Maria, RS, Brazil. ⁷Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. Correspondence: joyce.faria@ifc-concordia.edu.br

Received: June 2017; Accepted: February 2018.

ABSTRACT

Objective. The aim of this study was to evaluate AChE activity in total blood and the FRAP levels in samples from dogs with mammary tumors before and after surgery, as well as the relationship between these variables with immunohistochemical markers of tumor (E-caderina, ki-67, COX-2). **Materials and methods.** In this study, 13 dogs with mammary tumors were divided into two groups (A and B). The group A was formed by dogs with tumors smaller than 3 cm of diameter, and the group B was formed by dogs with tumor of 3 cm of diameter or larger. The AChE activity and FRAP levels were evaluated before and after surgery and the immunohistochemistry were performed at the tumors. **Results.** The AChE activity was significantly increased ($p < 0.05$) in dogs with mammary cancer compared to control animals, and neither surgery or tumor size affected the AChE activity ($p > 0.05$). FRAP levels before surgery were significantly lower ($p < 0.05$) compared to control animals. Also, FRAP levels increased significantly after surgery in animals of the group A compared to data before surgery, a fact not observed in dogs from the group B. E-cadherin showed low significant positive correlation with FRAP levels ($r = 0.37$, $p\text{-value} = 0.05$); COX-2 showed a moderate significant positive correlation to FRAP ($r = 0.55$, $p\text{-value} < 0.05$); and COX-2 showed a low significant positive correlation to AChE ($r = 0.32$, $p\text{-value} = 0.01$). **Conclusions.** AChE and antioxidant levels are modified in dogs with mammary cancer. These variables are involved in various physiological functions, and thus, they might be related to disease pathogenesis.

Keywords: Cancer; cholinergic system; FRAP; immunohistochemistry (*Source: CAB*).

RESUMEN

Objetivo. Evaluar la actividad de la AChE en sangre total y los niveles de FRAP en muestras de perros con tumores mamarios antes y después de la cirugía, así como la relación entre estas variables con marcadores inmunohistoquímicos de tumores (E-caderina, ki-67, COX-2). **Materiales y métodos.** En este estudio, 13 perros con tumores mamarios se dividieron en dos grupos (A y B). El grupo A estaba formado por perros con tumores menores de 3 cm de diámetro y el grupo B estaba formado por perros con tumor de 3 cm de diámetro o más. La actividad de AChE y los niveles de FRAP se evaluaron antes y después de la cirugía y la inmunohistoquímica se realizó en los tumores. **Resultados.** La actividad de la AChE aumentó significativamente ($p < 0.05$) en perros con cáncer mamario en comparación con los animales control, y ni la cirugía ni el tamaño tumoral afectaron la actividad de la AChE ($p > 0.05$). Los niveles de FRAP antes de la cirugía fueron significativamente más bajos ($p < 0.05$) en comparación con los animales control. Además, los niveles de FRAP aumentaron significativamente después de la cirugía en animales del grupo A en comparación con los datos antes de la cirugía, hecho que no se observó en perros del grupo B. La E-cadherina mostró correlación positiva baja con los niveles de FRAP ($r = 0.37$, valor $p = 0.05$); COX-2 mostró una moderada correlación positiva significativa con FRAP ($r = 0.55$, p -valor < 0.05); Y la COX-2 mostró una correlación positiva de baja significación con la AChE ($r = 0.32$, p -valor = 0.01). **Conclusiones.** AChE y los niveles de antioxidantes se modifican en perros con cáncer de mama. Estas variables están implicadas en diversas funciones fisiológicas, y por lo tanto, pueden estar relacionadas con la patogénesis de la enfermedad.

Palabras clave: cancer; cholinergic system; FRAP; immunohistochemistry (*Fuente: CAB*).

INTRODUCTION

Mammary tumors are extremely common in clinical routine of small animals, being the type of tumor most frequently observed in dogs (1). Due to its elevated frequency, many studies have been performed attempting to understand the carcinogenic process, as well as the biological characteristics associated to mammary tumor, i.e., genetic, morphological and biochemistry alterations associated to it (2-5). In this sense, many molecular markers evaluated by immunohistochemistry, have been widely used as prognostic markers, and thus, determine the biological behavior of different types of cancer.

In veterinary medicine, markers such as Ki-67 (cell proliferation), E-cadherin (adhesion molecule), cyclooxygenase-2 (COX-2), estrogen (ER), progesterone (PR), HER-2, p-53 are targets of several researchers in the evaluation of canine mammary tumors (2,3,4). Ki-67 is a protein expressed in different cells during the replication phase, and since tumor cells have a high replication rate, Ki-67 is considered an excellent marker for diagnostic and prognostic of mammary tumors (5). E-cadherin is an adhesion molecule expressed by epithelial cells, such as the epithelial cells of the mammary tubes (6). The expression of this protein has been evaluated in several type of tumors, and a relationship between its decreased expression and aggressive neoplasia, with major metastatic potential and worse prognosis was demonstrated by many authors (6,7). COX-2 is an enzyme expressed during inflammatory stimuli, being

INTRODUCCIÓN

Los tumores mamarios son extremadamente comunes en la rutina clínica de los animales pequeños, siendo el tipo de tumor más frecuentemente observado en perros (1). Debido a su elevada frecuencia, se han realizado muchos estudios tratando de comprender el proceso carcinogénico, así como las características biológicas asociadas al tumor mamario, es decir, las alteraciones genéticas, morfológicas y bioquímicas asociadas al mismo (2-5). En este sentido, muchos marcadores moleculares evaluados por inmunohistoquímica han sido ampliamente utilizados como marcadores pronósticos, y por lo tanto, determinan el comportamiento biológico de diferentes tipos de cáncer.

En medicina veterinaria, marcadores como Ki-67 (proliferación celular), cadherina-E (molécula de adhesión), ciclooxigenasa-2 (COX-2), estrógeno (ER), progesterona (PR), HER-2, p-53 son blanco de varios investigadores en la evaluación de tumores mamarios caninos (2-4). El Ki-67 es una proteína expresada en diferentes células durante la fase de replicación, y dado que las células tumorales tienen una alta tasa de replicación, el Ki-67 es considerado un excelente marcador para el diagnóstico y pronóstico de tumores mamarios (5). La cadherina-E es una molécula de adhesión expresada por células epiteliales, como las células epiteliales de los tubos mamarios (6). La expresión de esta proteína ha sido evaluada en varios tipos de tumores, y muchos autores han demostrado una relación entre la disminución de su expresión y la neoplasia agresiva, con mayor potencial metastásico y peor pronóstico (6,7). La

very important for activation of the inflammation cascade. Also, the presence of this protein has been associated with tumor progression (8), and recently studies indicated that COX-2 was associated with higher metastatic potential and poor prognosis of breast cancer (6,8,9).

The etiology of breast cancer is considered multifactorial, i.e., hormonal, environmental, genetic and oxidative factors may be associated with the carcinogenesis processes (10). The exact mechanism that oxidative stress induces carcinogenesis is not well established; however, free radicals may contribute to lipid peroxidation and biochemical alterations, in addition to cell damage (11). Oxidative and free radicals by cellular metabolic activity, that could be associated with the carcinogenic process, are minimized by antioxidant mechanisms, which can be measured by ferric reducing ability of plasma (FRAP). It is important to empathize that individuals with cancer show reduced antioxidant levels, which contributes to disease progression (12).

Acetylcholinesterase (AChE) is an enzyme present in cholinergic and non-cholinergic tissues, being responsible for acetylcholine (ACh) hydrolysis in the post-synaptic cleft (13). ACh has an important role mediating inflammation, being able to attenuate the release of proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and interleukins (IL-1 and IL-6) (13,14). According to Das (14), the AChE activity can be considered a systemic marker of inflammation in several diseases, including cancer. Also, the AChE has been implicated in the tumorigenesis, since AChE can be amplified, mutated and/or highly expressed in many types of tumors, altering the AChE activity (15,16). Thus, the aim of this study was to evaluate the AChE activity and FRAP levels in dogs with mammary cancer before and after surgical procedure to remove these tumors, as well as the relation between these variables with immunohistochemical markers of tumor.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals and sampling. This study used 13 dogs with mammary tumors that were routinely attended by veterinarians from the clinical service and surgery of the *Instituto Federal Catarinense*. Total blood (10 mL) was collected in tubes with and without EDTA before surgery and 10 days after. Blood samples containing EDTA were aliquoted, diluted, and used for AChE assessment, haemogram, and platelet counts. Blood samples without EDTA were centrifuged at 3000 x g for 15 min to obtain serum to be used to evaluate biochemical variables (creatinine,

COX-2 es una enzima que se expresa durante los estímulos inflamatorios, siendo muy importante para la activación de la cascada de inflamación. Además, la presencia de esta proteína se ha asociado con la progresión del tumor (8), y estudios recientes indican que la COX-2 se asocia con un mayor potencial metastásico y un mal pronóstico del cáncer de mama (6,8,9).

La etiología del cáncer de mama se considera multifactorial, es decir, los factores hormonales, ambientales, genéticos y oxidativos pueden estar asociados con los procesos de carcinogénesis (10). El mecanismo exacto de que el estrés oxidativo induce a la carcinogénesis no está bien establecido; sin embargo, los radicales libres pueden contribuir a la peroxidación lipídica y a las alteraciones bioquímicas, además del daño celular (11). Los radicales libres y oxidativos formados por la actividad metabólica celular, que podrían estar asociados con el proceso carcinogénico, son minimizados por los mecanismos antioxidantes, los cuales pueden ser medidos por la capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP). Es importante empatizar con el hecho de que los individuos con cáncer muestran niveles reducidos de antioxidantes, lo que contribuye a la progresión de la enfermedad (12).

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima presente en los tejidos colinérgicos y no colinérgicos, siendo responsable de la hidrólisis de acetilcolina (ACh) en la hendidura postsináptica (13). La ACh tiene un papel importante como mediador de la inflamación, pudiendo atenuar la liberación de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), e interleucinas (IL-1 e IL-6) (13,14). Según Das (14), la actividad de AChE puede considerarse un marcador sistémico de inflamación en varias enfermedades, incluido el cáncer. Además, la AChE se ha implicado en la tumorigénesis, ya que la AChE puede ser amplificada, mutada y/o altamente expresada en muchos tipos de tumores, alterando la actividad de la AChE (15,16). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad de AChE y los niveles de FRAP en perros con cáncer de mama antes y después del procedimiento quirúrgico para extirpar estos tumores, así como la relación entre estas variables con los marcadores inmunohistoquímicos del tumor.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación y muestreo. En este estudio se utilizaron 13 perros con tumores mamarios que fueron atendidos de manera rutinaria por veterinarios del servicio clínico y quirúrgico del *Instituto Federal Catarinense*. La sangre total (10 mL) se recolectó en tubos con y sin EDTA antes de la cirugía y 10 días después. Las muestras de sangre que contenían EDTA

alkaline phosphatase, alanine aminotransferase (ALT)), and FRAP levels.

The dogs were divided into two groups (A and B). The group A was formed by dogs with tumors smaller than 3 cm of diameter, and the group B was formed by dogs with tumors of 3 cm of diameter or larger. Tumor fragments were collected for histopathological and immunohistochemistry evaluation. Also, total blood was collected from seven healthy dogs (the control group) for AChE activity and FRAP levels assessment. Before surgical procedure, abdominal ultrasound and X-ray were performed to verify comorbidities and metastasis

AChE activity. For AChE activity assessment, an aliquot of 40 μ L of blood collected with EDTA was diluted in sodium phosphate buffer containing Triton X-100, according the methodology described by Worek and colleagues (17), where the AChE activity was measured at 436 nm in 37°C. The method is based on the hydrolysis of acetylcholine substrate forming acetate thiocoline, which in turn reacts with 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) to form a yellow anion 5-thio-2-nitrobenzoico. The color intensity is directly proportional to the quantity of product formed. The results were expressed in mU/ μ mol of Hg.

FRAP levels. FRAP levels in serum samples was performed according to the methodology described by Benzie and Strain (18), using a semi-automatized method (Cobas Mira Plus) as detailed described below. FRAP reagent (300 mL) freshly prepared was warmed to 37°C and a reagent for blank reading was taken (M1) at 593 nm; 10 mL of sample was added, along a with 30 μ L of H₂O; at a final sample dilution of 1/34. Absorbance (A) readings were taken after 0.5 s and every 15 s thereafter, during the monitoring period. The change in absorbance (Δ A593 nm) between the final reading selected and the M1 reading was calculated for each sample and related to Δ A593 nm of a FeII standard solution tested in parallel. The results were expresses in μ mol/L.

Immunohistochemistry. For immunohistochemistry evaluation, the slides were immersed in methanol: hydrogen peroxide solution during 15 minutes to block endogenous peroxidases of the tissues, followed by two washes during 5 min in PBS solution. After, it was performed the antigen recuperation in humid heat at 90°C (Steam Cuisine 700 Hi Spped-T-Fal®) for 20 min, followed by cooling at room temperature during 20 min. Blocking of unspecific reactions was performed with milk

se alicuotaron, diluyeron y utilizaron para la evaluación de AChE, hemograma y recuento de plaquetas. Las muestras de sangre sin EDTA se centrifugaron a 3000 x g durante 15 minutos para obtener suero que se utilizó para evaluar las variables bioquímicas (creatinina, fosfatasa alcalina, alanina aminotransferasa (ALT)) y los niveles de FRAP.

Los perros se dividieron en dos grupos (A y B). El grupo A estaba formado por perros con tumores menores de 3 cm de diámetro, y el grupo B por perros con tumores de 3 cm de diámetro o mayores. Se recolectaron fragmentos de tumores para la evaluación histopatológica e inmunohistoquímica. Además, se recogió sangre total de siete perros sanos (el grupo de control) para evaluar la actividad de AChE y los niveles de FRAP. Antes de la intervención quirúrgica, se realizaron ecografías abdominales y radiografías para verificar comorbilidades y metástasis.

Actividad de AChE. Para la evaluación de la actividad de AChE, se diluyó una alícuota de 40 μ L de sangre recogida con EDTA en tampón fosfato sódico que contenía Triton X-100, de acuerdo con la metodología descrita por Worek et al (17), donde se midió la actividad de AChE a 436 nm a 37°C. El método se basa en la hidrólisis del sustrato de acetilcolina que forma tiocolina acetato, que a su vez reacciona con 5,5'-dithiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) para formar un anión amarillo 5-thio-2-nitrobenzoico. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de producto formado. Los resultados se expresaron en mU/ μ mol de Hg.

Niveles FRAP. Los niveles de FRAP en las muestras de suero se realizaron de acuerdo con la metodología descrita por Benzie y Strain (18), utilizando un método semiautomatizado (Cobas Mira Plus) como se detalla a continuación. El reactivo FRAP (300 mL) recién preparado se calentó a 37°C y se tomó un reactivo para lectura en blanco (M1) a 593 nm; se agregaron 10 mL de muestra, con 30 L de H₂O; a una dilución final de 1/34 de la muestra. Las lecturas de absorbancia (A) se tomaron después de 0.5 s y cada 15 s a partir de entonces, durante el período de monitoreo. El cambio en la absorbancia (Δ A593 nm) entre la lectura final seleccionada y la lectura de M1 se calculó para cada muestra y se relacionó con A593 nm de una solución estándar de FeII probada en paralelo. Los resultados se expresaron en μ mol/L.

Inmunohistoquímica. Para la evaluación inmunohistoquímica, los portaobjetos se sumergieron en metanol: solución de peróxido de hidrógeno durante 15 minutos para bloquear las peroxidases endógenas de los tejidos, seguido de dos lavados durante 5 minutos en solución de PBS. Posteriormente se realizó la recuperación del antígeno en calor húmedo a 90°C (Steam Cuisine

powder Molico® 5% diluted in PBS solution during 25 min. The slides were incubated overnight with primary antibody diluted with PBS solution. Primary antibodies for COX-2 – clone SP21 diluted 1:100 (Cell Marque®), E-cadherin – clone EP700Y diluted 1:300 (Cell Marque®) and Ki-67 – clone SP6 diluted 1:500 (Cell Marque®) were used. Goat anti-mouse Biotinylated diluted in PBS solution was used as a secondary antibody. This antibody was incubated during 30 min and performed washes during 5 minutes with PBS solution. Amplification and accentuation of reaction was performed using avidin-biotin peroxidase system (according manufacture recommendations – Horseradish Peroxidase - Dako®) for 30 min followed by the addition of diaminobenzidine (according to manufacturer's recommendations – DAB Reagent Set KPL®) for 5 min, followed by water wash. Slides were stained by Harris hematoxylin (1:2) in distilled water during 1 min. Following, the slides were washed in water, dehydrated and mounted with coverslip in Entelan®. For the COX-2 marker were used normal intestinal mucosa as a positive control. For the Ki-67 marker were used normal lymph node as a positive control. For the E-cadherin marker were used normal epidermis as a positive control. Negative controls were assessed using NaCl 0.9% solution.

Histopathology. Three fragments were collected for histopathology. The samples were fixed in buffered formalin 10% solution, routinely processed, and sections stained with hematoxylin and eosin technique (HE). Neoplastic lesions were described according to Cassali and colleagues (1).

Statistical analysis. The date of seric parameters, tumors, and haemogram were analyzed using a descriptive statistical method; measures of central tendency (median) and dispersion (amplitude – difference of minimum and maximum value) were computed. For AChE activity and FRAP levels, the control group and pre and post-surgery groups were compared by Kruskal-Wallis H followed by Nemenyi post hoc test. Also, the parameters were related as variability of pre-surgical and post-surgical in consideration of groups A and B, and later groups A and B in relation of surgery effects using Mann-Whitney U. The difference between groups A and B on tumor size were performed by Mann-Whitney U. Haemogram and biochemical parameters (erythrocytes, hemoglobin, total leukocytes, platelets, creatinine, alkaline phosphatase, and alanine aminotransferase) were tested as differences between groups A and B (tumor size) using Mann-Whitney U. It was considered statistically different when $p < 0.05$. All analyses were performed in Software R-Language v.2.15.2. (R Development Core Team, 2012).

700 Hi Spped-T-Fal®) durante 20 min, seguido de un enfriamiento a temperatura ambiente durante 20 min. El bloqueo de reacciones inespecíficas se realizó con leche en polvo Molico® 5% diluida en solución de PBS durante 25 min. Los portaobjetos se incubaron durante la noche con anticuerpos primarios diluidos con solución de PBS. Anticuerpos primarios para COX-2 - clon SP21 diluido 1:100 (Cell Marque®) E-cadherina-clon EP700Y diluido 1:300 (Cell Marque®) y Ki-67 - clon SP6 diluido 1:500 (Cell Marque®). Se utilizó Cabra anti-ratón biotinilato diluido en solución de PBS como anticuerpo secundario. Este anticuerpo se incubó durante 30 minutos y se lavó durante 5 minutos con solución de PBS. La amplificación y acentuación de la reacción se realizó utilizando el sistema de avidina-biotina peroxidasa (de acuerdo con las recomendaciones de fabricación - Peroxidasa de rábano rústico - Dako®) 30 min seguido de la adición de diaminobenzidina (de acuerdo con las recomendaciones del fabricante - DAB Reagent Set KPL®) durante 5 min, seguido de lavado con agua. Se tiñeron los portaobjetos con hematoxilina Harris (1:2) en agua destilada durante 1 min. A continuación, los portaobjetos fueron lavados en agua, deshidratados y montados con cubreobjetos en Entelan®. Para el marcador COX-2 se utilizó la mucosa intestinal normal como control positivo. Para el marcador Ki-67 se utilizaron ganglios linfáticos normales como control positivo. Para el marcador de cadherina-E se utilizó epidermis normal como control positivo. Los controles negativos se evaluaron con una solución de NaCl al 0.9% (p/v).

Histopatología. Se recogieron tres fragmentos para histopatología. Las muestras se fijaron en solución tamponada de formalina al 10% (v/v), se procesaron rutinariamente y se tiñeron con la técnica de hematoxilina y eosina (HE). Las lesiones neoplásicas fueron descritas según Cassali et al (1).

Análisis estadístico. Se analizó la fecha de los parámetros séricos, tumores y hemograma mediante un método estadístico descriptivo; se calcularon las medidas de tendencia central (mediana) y dispersión (amplitud - diferencia de valor mínimo y máximo). Para los niveles de actividad de AChE y FRAP, el grupo control y los grupos pre y postoperatorio fueron comparados por Kruskal-Wallis H seguido de la prueba post hoc de Nemenyi. Además, los parámetros se relacionaron como variabilidad prequirúrgica y posquirúrgica para los grupos A y B, y más tarde los grupos A y B en relación con los efectos de la cirugía con el uso de Mann-Whitney U. La diferencia entre los grupos A y B en el tamaño del tumor fue realizada por Mann-Whitney U. El hemograma y los parámetros bioquímicos (eritrocitos, hemoglobina, leucocitos totales, plaquetas, creatinina, fosfatasa alcalina y aminotransferasa) se probaron como diferencias

In addition, it was tested the correlation between E-cadherin, Ki-67 and COX-2 and the AChE and FRAP by Point-Biserial correlation, an especial type of correlation that allows the use of dichotomy and continues variables. For this analysis, dichotomy variables were E-cadherin (code as 1 if it was tested negative and coded 2 if it was positive), Ki-67 (coded as 1 if < 25% and coded as 2 if \geq 25%) and COX-2 (coded as 1 if + and/or ++ and coded as 2 if > +++). In addition, Ki-67 levels were analysed as percentage (its raw form) and correlated (Pearson's correlation) with the levels of E-cadherin, and COX-2. It was also correlated E-cadherin versus COX-2.

Ethics committee. All procedures were performed under the appropriate guidelines and with the approval of Ethics Committee for Animal Experimentation (CEUA/Instituto Federal Catarinense (IFC), protocol 13/2015).

RESULTS

Clinical evaluation and tumor staging.

The dogs showed no laboratory abnormalities, except thrombocytosis (not significant), such as demonstrated in Table 1. However, it was detected lung metastasis in one of the dogs (Group B) studied in the first evaluation.

Table 1. Results from haemogram, platelet counts, and biochemical variables (creatinine, alkaline phosphatase and alanine aminotransferase – ALT) from dogs with mammary cancer before and after surgical removal of tumor(s).

Parameters	Group A	Group B	P	Reference
Erythrocytes (μL^3)	6.75 ± 0.86	6.56 ± 0.47	0.64	5.8–8.5
Hemoglobin (g/dL)	15.95 ± 1.01	15.30 ± 1.63	0.51	14.0–19.1
Total leukocytes (mm^3)	9700 ± 3658	12600 ± 5632	0.44	4900-17000
Platelets (mm^3)	306500 ± 25630	358000 ± 84200	0.39	181000-525000
Creatinine (mg/dL)	0.80 ± 0.06	0.61 ± 0.26	0.26	0.6–2.0
Phosphatase (UI/L)	54.70 ± 12.6	58.0 ± 6.9	0.87	12-121
ALT (UI/L)	55 ± 18.5	40 ± 15.7	0.85	18-86

Results are presented as median \pm standard deviation. There was no difference between groups considering $p < 0.05$.

Histopathological examination, degree of malignancy and immunohistochemistry.

Out of 13 dogs, three showed benign and 10 showed malignant tumors, among which five were carcinoma, three mixed sarcomas, two papillary carcinomas, one tubular carcinoma and one anaplastic carcinoma. These results

entre los grupos A y B (tamaño del tumor) mediante el uso de Mann-Whitney U. Se consideró estadísticamente diferente cuando $p < 0.05$. Todos los análisis se realizaron en Software R-Language v.2.15.2 (R Development Core Team, 2012).

Además, se evaluó la correlación entre la cadherina-E, Ki-67 y COX-2 y la AChE y FRAP mediante la correlación de Punto-Biserial, un tipo especial de correlación que permite el uso de dicotomía y variables continuas. Para este análisis, las variables de dicotomía fueron: cadherina-E (codificada 1 si la prueba fue negativa y código 2 si fue positiva), Ki-67 (codificada 1 si es < 25% y código 2 si es \geq 25%) y COX-2 (código 1 si es + y/o +++ y código 2 si es > +++). Además, los niveles de Ki-67 fueron analizados como porcentaje (su forma cruda) y correlacionados (la correlación de Pearson) con los niveles de cadherina-E, y COX-2. También se correlacionó E-cadherina versus COX-2.

Comité de ética. Todos los procedimientos fueron realizados bajo los lineamientos apropiados y con la aprobación del Comité de Ética para la Experimentación Animal (CEUA/Instituto Federal Catarinense (IFC), protocolo 13/2015).

RESULTADOS

Evaluación clínica y estadificación del tumor.

Los perros no mostraron anomalías de laboratorio, excepto trombocitosis (no significativa), como se demuestra en la Tabla 1. Sin embargo, se detectó metástasis pulmonar en uno de los perros (Grupo B) estudiados en la primera evaluación.

Examen histopatológico, grado de malignidad e inmunohistoquímica.

De 13 perros, tres mostraron tumores benignos y 10 malignos, entre los que se encontraban cinco carcinomas, tres sarcomas mixtos, dos carcinomas papilares, un carcinoma tubular y un carcinoma anaplásico. Estos resultados pueden ser visualizados en la Tabla 2, que también incluye los resultados de inmunohistoquímica (Ki-67, cadherina-E, y COX-2), (Figura 1).

AChE en sangre total. La actividad de AChE fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los perros con cáncer de mama en comparación con los animales de control (Figura 2A), pero no se observaron diferencias ($p > 0.05$) antes y después de la cirugía (Figura 2B). El tamaño del tumor no influyó en la actividad de AChE, es decir, no hubo diferencias ($p > 0.05$) entre los grupos A y B (Figura 2C).

can be visualized in Table 2, which also includes the results of immunohistochemistry (Ki-67, E-cadherin, and COX-2) (Figure 1).

AChE activity in total blood. The AChE activity was significantly higher ($p < 0.05$) in dogs with mammary cancer compared to control animals (Figure 2A), but no differences ($p > 0.05$) were observed before and after surgery (Figure 2B). Tumor size did not influence AChE activity, i.e., there was no difference ($p > 0.05$) between groups A and B (Figure 2C).

FRAP levels in serum. FRAP levels before surgery were significantly lower ($p < 0.05$) compared to control animals (Figure 3A). There was no differences on FRAP levels ($p > 0.05$) between groups before and after tumor removal ($p > 0.05$; Figure 3B). FRAP levels increased significantly after surgery in animals of the group A, a fact not observed in dogs from the group B (Figure 3C).

Niveles de FRAP en suero. Los niveles de FRAP antes de la cirugía fueron significativamente más bajos ($p < 0,05$) en comparación con los animales de control (Figura 3A). No hubo diferencias en los niveles de FRAP ($p > 0.05$) entre los grupos antes y después de la extirpación del tumor ($p > 0.05$; Figura 3B). Los niveles de FRAP aumentaron significativamente después de la cirugía en animales del grupo A, un hecho no observado en perros del grupo B (Figura 3C).

Análisis de correlaciones. La cadherina-E mostró una correlación positiva baja, pero significativa, con los niveles de FRAP ($r = 0.37$; valor de $p = 0.05$), lo que significa que las muestras positivas para la cadherina E mostraron mayores niveles de FRAP. No se observó ninguna correlación entre la cadherina E y AChE ($p = 0.21$). El otro marcador (Ki-67) no se correlacionó ni con FRAP ni con AChE ($p = 43$, $p = 12$), y finalmente el marcador COX-2 mostró una correlación positiva significativa moderada con FRAP ($r = 0.55$, valor $p < 0.05$), lo que significa que los niveles más altos de COX-2 (>+++), pudieron aumentar los

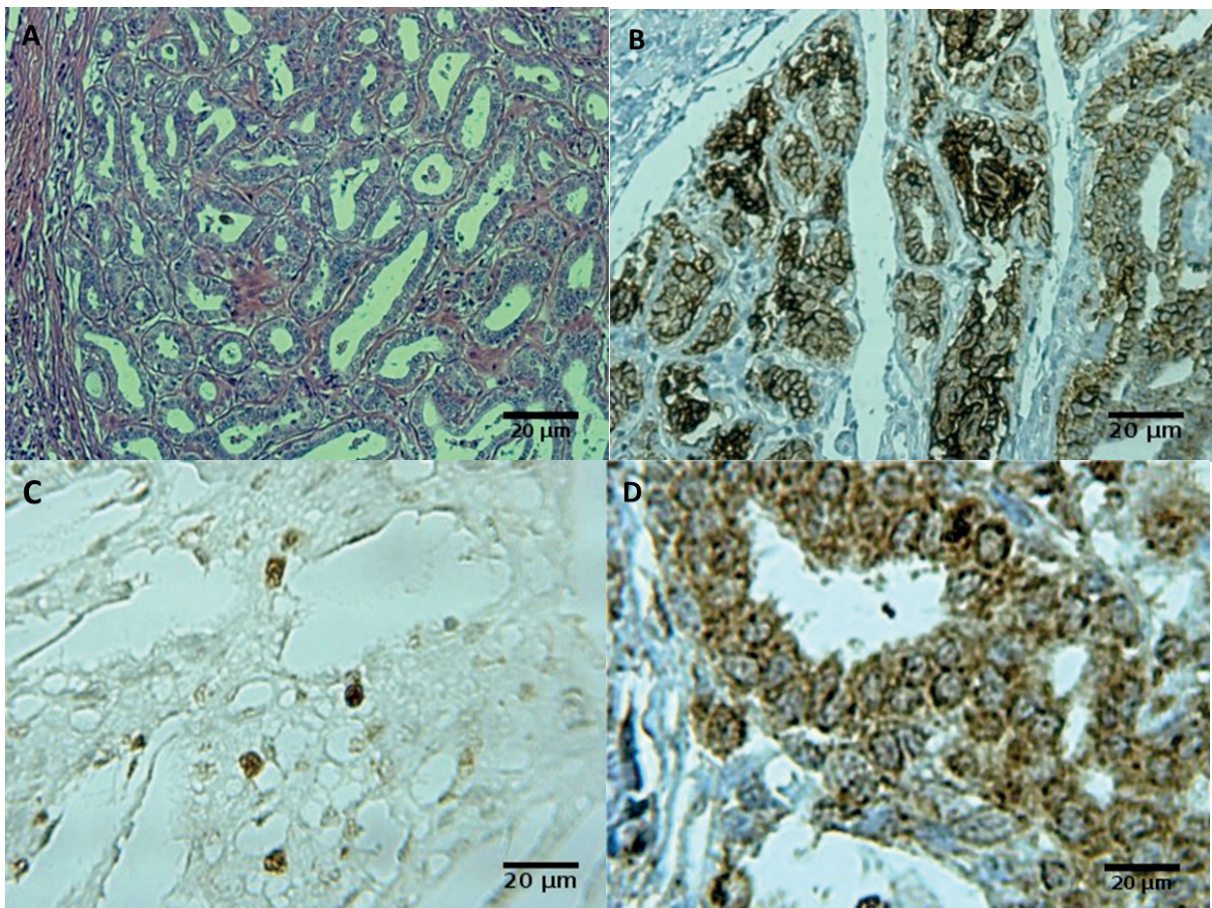


Figure. 1. Mammary tumor in dogs *Canis familiares*: Photomicrographs show sample of papillary carcinoma grade II characterized by papillary arborescent epithelial proliferation. Hematoxylin and eosin (A). The same papillary carcinoma showed a strong expression of E-cadherin (B), expression. of the Ki-67 (C) and a strong expression of COX-2 (D).

Table 2. Histological and immunohistochemical results of canine mammary tumors separated into two groups according to tumor size: the group A (tumors smaller than 3 cm) and the group B (tumors larger than 3 cm).

Groups	Histological results	Ki-67 (%)	Cox-2 [#]	E-Cadherin [#]
A	Papillary carcinoma grade II	74.00	++++	++++
A	Being mixed tumor	8.00	++	+++++
A	Papillary carcinoma grade III	0.78	+	+++++
A	Being mixed tumor	NP*	NP*	-
A	Being mixed tumor	6.00	-	+++++
B	Carcinoma in a mixed tumor grade III	33.33	+++++	++++
B	Carcinoma in a mixed tumor grade I	19.33	+	++++
B	Carcinoma in a mixed tumor grade I	34.00	+++++	+++++
B	Sarcoma in a mixed tumor	47.33	++	-
B	Carcinoma in a mixed tumor grade I	24.66	+++++	++++
B	Carcinoma in a mixed tumor grade I	17.33	++++	++++
B	Tubular carcinoma grade I	32.00	++	+++
B	Anaplastic carcinoma	54.00	+++++	-
B	Sarcoma in a mixed tumor	27.33		
B	Sarcoma in a mixed tumor	28.66	++++	-

*NP – not performed; [#] concerning staining intensity: - (absent), + (weak), ++/+++ (intermediate), ++++/+++++ (strong).

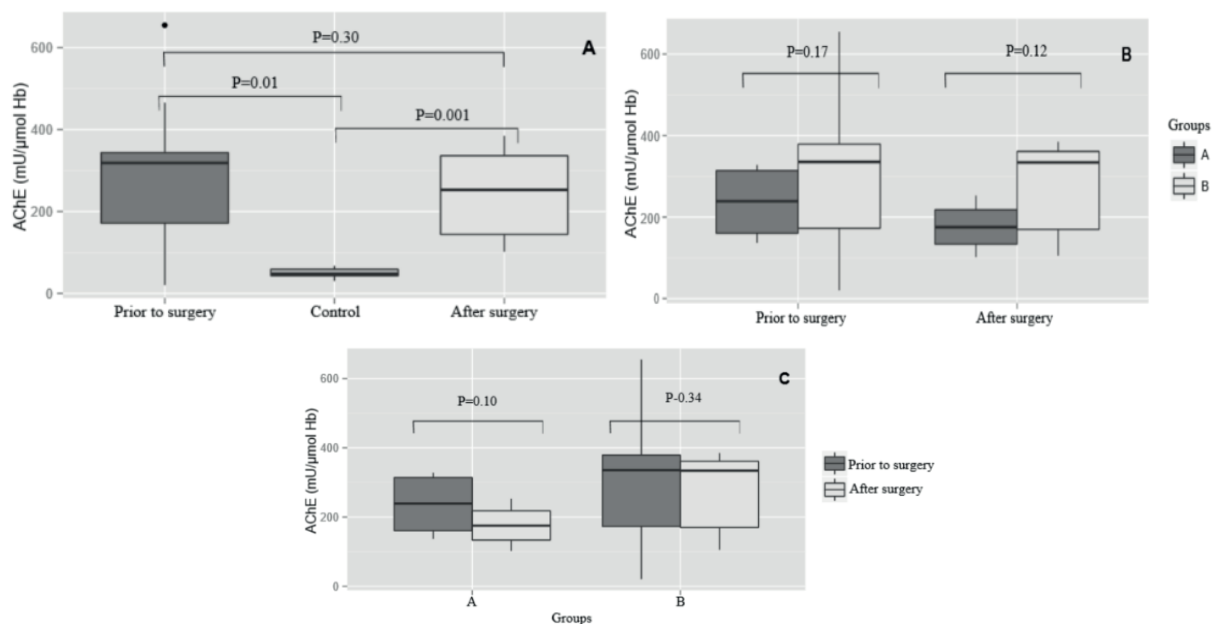


Figure 2. Acetylcholinesterase (AChE) activity in dogs with mammary tumor divided into two groups based on tumor size (A - tumor of at least 3 cm; B - tumor larger than 3 cm): (a) AChE activity in total blood for dogs with mammary cancer (before and after surgery) compared to healthy dogs, regardless of tumor size. (b) Comparison within the group considering the before and after surgical removal.

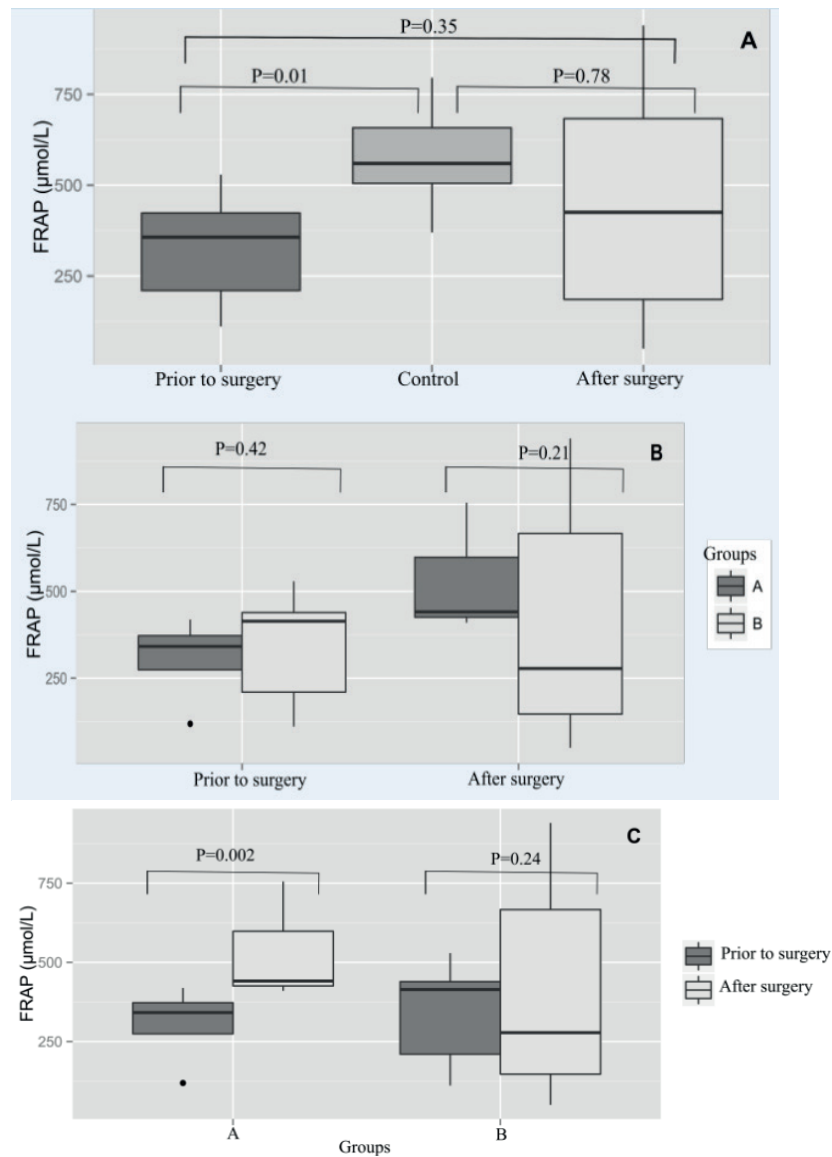


Figure 3. The ferric reducing ability plasmatic (FRAP) in dogs with mammary tumor divided into two groups based on tumor size (A - tumor of at least 3 cm; B - tumor larger than 3 cm): (a) Seric levels of FRAP from dogs with breast tumors (before and after surgery) compared to healthy dogs, regardless of tumor size. (b) Comparison between groups, according to the FRAP levels before and after surgery. (c) Comparison within the same group considering before and after surgical removal.

Correlation analyses. E-cadherin showed low, but significant positive correlation with FRAP levels ($r=0.37$, $p=0.05$), which means that samples positives for E-cadherin showed increased levels of FRAP. No correlation between E-cadherin and AChE was observed ($p=0.21$). The other marker (Ki-67) was correlated neither to FRAP nor to AChE ($p=43$, $p=12$), and finally the marker COX-2 showed a moderate significant positive correlation to FRAP ($r=0.55$, $p<0.05$), which means that higher levels of COX-2 (>+++) were able to increase FRAP levels. In addition, COX-2 showed a low significant

Table 3. Point-biserial correlation between acetylcholinesterase (AChE) activity and ferric reducing ability plasmatic (FRAP) levels with markers of diagnostic and prognostic of tumors (E-cadherin, Ki-67 and COX-2).

Characteristic	Median AChE (min-max)	Median FRAP (min-max)
Total	309 (0-655)	357 (0-1582)
Correlation* with E-cadherin	-0.01	0.37*
Correlation* with Ki-67	-0.06	0.01
Correlation* with COX-2	0.32*	0.55*

*Statistical significant correlation

positive correlation to AChE ($r=0.32$, $p=0.01$) (Table 3). Among markers, the only significant positive correlation was between Ki-67 and COX-2 ($\rho=0.51$, $p=0.04$).

DISCUSSION

The results obtained in this study show, for the first time, a positive correlation between seric AChE activity molecular markers of dog with mammary tumors. Several studies have shown a relation between tumorigenesis and AChE activity, as well observed in this present work. The AChE exerts important functions in the central nervous system, but also is distributed in many tissues, and exerts other functions such as the capacity to regulate proliferation, differentiation, and apoptosis (13-15). The relation between cell cycle and AChE activity raises a number of questions about the role of AChE in tumorigenesis, since several studies have linked the cholinesterase to many tumor types. Also, increased AChE activity is observed in different tumor types (19,20). In this sense, the results observed in this present study are in accordance to results observed in the literature, where higher AChE activity was observed in dogs with mammary tumors compared to the control group. The variability of AChE activity in the group B can be explained by histopathological analyses that found different types of tumors. According to Martínez-Moreno and coworkers (19), the AChE activity may vary according to the histological type of tumor, explaining the wide variation on the AChE activity.

The AChE activity is also involved in the inflammation process (13,14). It is known that AChE has an anti-inflammatory role, and increased AChE activity could be associated with increased inflammation (21), such as observed in this present study due to the positive correlation between COX-2 levels and AChE activity. COX-2 is a protein expressed during inflammation, being associated to tumor development, and promotion of angiogenesis (22), associated to bad prognosis in dogs with mammary tumors (23). Also, we can observe that even with different histological tumor type, higher levels of the marker COX-2 were detected mainly in dogs with larger tumors. It has been demonstrated that tumor size has an important impact on prognosis and dogs survival (1,8). Although the range of survival of these animals was not established (study not finalized), it is believed that these dogs have a significant reduction on survival, impacted by the size of tumors and the strong marker COX-2, which leads to believe that this is an aggressive

niveles de FRAP. Además, la COX-2 mostró una baja correlación positiva significativa con AChE ($r=0,32$, $p=0.01$) (Tabla 3). Entre los marcadores, la única correlación positiva significativa fue entre Ki-67 y COX-2 ($\rho = 0.51$, $p=0.04$).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio muestran, por primera vez, una correlación positiva entre los marcadores moleculares de actividad sérica AChE en perros con tumores mamarios. Varios estudios han mostrado una relación entre la tumorigénesis y la actividad de AChE, así como se observa en este trabajo. La AChE ejerce importantes funciones en el sistema nervioso central, pero también está distribuida en muchos tejidos, y ejerce otras funciones como la capacidad de regular la proliferación, diferenciación y apoptosis (13-15). La relación entre el ciclo celular y la actividad de AChE plantea una serie de preguntas sobre el papel de la AChE en la tumorigénesis, ya que varios estudios han relacionado la colinesterasa con muchos tipos de tumores. Además, se observa un aumento de la actividad de AChE en diferentes tipos de tumores (19,20). En este sentido, los resultados observados en el presente estudio están de acuerdo con los resultados observados en la literatura, donde se observó una mayor actividad de AChE en los perros con tumores mamarios en comparación con el grupo control. La variabilidad de la actividad de AChE en el grupo B puede ser explicada por análisis histopatológicos que encontraron diferentes tipos de tumores. Según Martínez-Moreno et al (19), la actividad de AChE puede variar en función del tipo histológico del tumor, lo que explica la gran variación de la actividad de AChE.

La actividad de AChE también está implicada en el proceso de inflamación (13,14). Se sabe que la AChE tiene un papel antiinflamatorio, y el aumento de la actividad de la AChE podría asociarse con un aumento de la inflamación (21), como se observa en el presente estudio debido a la correlación positiva entre los niveles de COX-2 y la actividad de la AChE. La COX-2 es una proteína que se expresa durante la inflamación, estando asociada al desarrollo tumoral, y a la promoción de la angiogénesis (22), asociada al mal pronóstico en perros con tumores mamarios (23). Además, podemos observar que incluso con diferentes tipos de tumores histológicos, se detectaron niveles más altos del marcador COX-2 principalmente en perros con tumores más grandes. Se ha demostrado que el tamaño del tumor tiene un impacto importante en el pronóstico y la supervivencia de los perros (1,8). Aunque no se estableció el rango de supervivencia de estos animales (estudio no finalizado), se cree que estos perros tienen una reducción significativa en la supervivencia, impactados por el tamaño de los tumores y el

neoplasia (23,24). Ki-67 marker is used to evaluate cell proliferation, being associated with a worse prognosis (1,4). Thus, we believe that these two variables are associated, both indicating a bad prognosis.

Regarding E-cadherin, it is possible to state that many animals have a high labeling index, independently of the type or tumor size, unlike observed in other studies that a reduction in E-cadherin expression was observed in mostly aggressive neoplasias, being defined as an unfavorable prognostic marker (1,7). In the other hand, Ferreira et al (25) demonstrated that E-cadherin was expressed in both benign and malign cells, as well observed in this work. These same authors also demonstrated that reduction in E-cadherin levels shows a relation to high Ki-67 levels, and this could be associated with a bad prognosis. Nevertheless, there is no data that suggests a direct functional interaction between these markers, and so, the association between them and an unfavorable prognosis is uncertain. Brunetti and colaboradores (2) demonstrated that reduction in expression of E-cadherin would be associated with a greater invasiveness of the tumor, but not associated with major tumor proliferation, presenting a small influence on animal survival. In this study, it was not observed correlation between these markers, what may have happened in consequence of reduced number of animals in this experimental design. Apparently, an inverse relation between Ki-67 and E-cadherin was not observed, however, in dogs with anaplastic carcinoma, considered an aggressive tumor, there was no E-cadherin marker but Ki-67.

Oxidative stress has been implicated in the carcinogenesis on some types of tumors, and the levels of antioxidants can be associated to lower risk of disease (26). Although this study did not evaluate the parameters of oxidative stress, the antioxidant levels were produced to fight free radicals formed during the oxidation processes (27). Our results show that FRAP levels were lower in dogs with mammary tumor, however FRAP levels increased after treatment of animals from the group A. Similar results were observed by Evans and others (28), which demonstrated that cancer has the capacity of increasing oxidation and, consequently, decrease the antioxidant mechanism. On the other hand, Singh and coworkers (29) showed reduced FRAP levels after surgery and chemotherapy in woman with mammary tumors. According to these authors, the use of chemotherapeutic drugs, that leads to mitochondrial damage and increased reactive oxygen species (ROS), are responsible for reducing FRAP levels, as

marcador fuerte de COX-2, lo que lleva a creer que se trata de una neoplasia agresiva (23,24). El marcador Ki-67 se utiliza para evaluar la proliferación celular, estando asociado a un peor pronóstico (1,4). Por lo tanto, creemos que estas dos variables están asociadas, ambas indicando un mal pronóstico.

En cuanto a la cadherina-E, es posible afirmar que muchos animales tienen un alto índice de marcado, independientemente del tipo o tamaño del tumor, a diferencia de lo observado en otros estudios que se observó como una reducción en la expresión de la cadherina-E en neoplasias mayormente agresivas, definiéndose como un marcador pronóstico desfavorable (1,7). Por otro lado, Ferreira et al (25) demostraron que la cadherina-E se expresaba tanto en las células benignas como en las malignas, como también se observó en este trabajo. Estos mismos autores también demostraron que la reducción en los niveles de cadherina-E muestran una relación con los niveles altos de Ki-67, y esto podría estar asociado con un mal pronóstico. Sin embargo, no existen datos que sugieran una interacción funcional directa entre estos marcadores, por lo que la asociación entre ellos y un pronóstico desfavorable es incierta. Brunetti y colaboradores (2) demostraron que la reducción en la expresión de cadherina-E estaría asociada con una mayor invasividad del tumor, pero no con una mayor proliferación tumoral, presentando una pequeña influencia en la supervivencia animal. En este estudio no se observó correlación entre estos marcadores, lo que puede haber ocurrido como consecuencia del reducido número de animales en este diseño experimental. Aparentemente, no se observó una relación inversa entre Ki-67 y E-cadherina, sin embargo, en perros con carcinoma anaplásico, considerado un tumor agresivo, no hubo marcador de cadherina-E sino de Ki-67.

El estrés oxidativo ha sido implicado en la carcinogénesis de algunos tipos de tumores, y los niveles de antioxidantes pueden estar asociados a un menor riesgo de enfermedad (26). Aunque este estudio no evaluó los parámetros del estrés oxidativo, los niveles de antioxidantes fueron producidos para combatir los radicales libres formados durante los procesos de oxidación (27). Nuestros resultados muestran que los niveles de FRAP fueron más bajos en perros con tumor mamario, sin embargo, los niveles de FRAP aumentaron después del tratamiento de animales del grupo A. Resultados similares fueron observados por Evans y otros (28), que demostraron que el cáncer tiene la capacidad de aumentar la oxidación y, en consecuencia, disminuir el mecanismo antioxidante. Por otro lado, Singh et al (29) mostraron niveles reducidos de FRAP después de la cirugía y quimioterapia en mujeres con tumores mamarios. Según estos autores, el uso de fármacos quimioterápicos, que conducen al daño mitocondrial y al aumento de

well observed by Sharma and colleagues (12). According to these authors, reduced FRAP levels may be associated with minor defense capacity of cells against cancer, possibly due to genetic alterations associated with tumorigenesis, also affecting the genes involved in protein synthesis associated with the antioxidant mechanisms. Also, the inflammatory process involved during tumorigenesis can affect the antioxidant system. Moreover, highest COX-2 expression and AChE activities were observed in patients with tumors, demonstrating the potential of cancer to be inflammatory stimuli.

In conclusion based on the results, we have verified a positive correlation between AChE activity and COX-2, and these could be associated to increased tumor inflammation, influencing cancer prognosis. Also, FRAP levels were significantly lower in dog with mammary tumors, contributing to increased oxidative stress. A strong presence of the marker COX-2 is observed in the most aggressive tumors, being positively correlated to Ki-67, which can be associated to a bad prognosis of these patients. In relation to E-cadherin, a higher variability in results was observed, not being possible to correlate this marker to others.

Conflict of interest statement

The authors declare no conflicts of interest with regard to publication of this manuscript.

Acknowledgments

We thank CAPES and CNPq for financial support.

las especies reactivas de oxígeno (ROS), son responsables de la reducción de los niveles de FRAP, también observados por Sharma et al (12). Según estos autores, la reducción de los niveles de FRAP puede estar asociada a una menor capacidad de defensa de las células contra el cáncer, posiblemente debido a alteraciones genéticas asociadas a la tumorigenesis, afectando también a los genes implicados en la síntesis de proteínas asociadas a los mecanismos antioxidantes. Además, el proceso inflamatorio involucrado durante la tumorigenesis puede afectar el sistema antioxidante. Además, se observaron mayores actividades de expresión de COX-2 y AChE en pacientes con tumores, demostrando el potencial del cáncer para ser estímulos inflamatorios.

En conclusión, con base en los resultados, se ha verificado una correlación positiva entre la actividad AChE y la COX-2, que podría asociarse a un aumento de la inflamación tumoral, influyendo en el pronóstico del cáncer. Además, los niveles de FRAP fueron significativamente más bajos en perros con tumores mamarios, lo que contribuyó a aumentar el estrés oxidativo. Se observa una fuerte presencia del marcador COX-2 en los tumores más agresivos, estando positivamente correlacionado con el Ki-67, lo que puede estar asociado a un mal pronóstico de estos pacientes. En relación con la cadherina-E, se observó una mayor variabilidad en los resultados, no siendo posible correlacionar este marcador con otros.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés con respecto a la publicación de este manuscrito.

Agradecimientos

Agradecemos a CAPES y CNPq por el apoyo financiero.

REFERENCES

1. Cassali GD, Lavallo GE, Ferreira E, Estrela-Lima A. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. Brazilian. J Vet Pathol. 2014; 7(2): 38-69.
2. Brunetti B, Sarli G, Preziosi R, Monari I, Benazzi C. E-Cadherin and catenin reduction influence invasion but not proliferation and survival in canine malignant mammary tumors, Vet Pathol. 2005; 42(6):781-787.
3. Yoshida K, Yoshida S, Choisunirachon N, Saito T, Matsumoto K, Mochizuki M, et al. The relationship between clinicopathological features and expression of epithelial and mesenchymal markers in spontaneous canine mammary gland tumors. J Vet Med Sci. 2014; 76(10):1321-1324.
4. Zuccari DAPC, Pavam MV, Terzian ACB, Pereira RS, Ruiz CM, Andrade JC. Immunohistochemical evaluation of e-cadherin, Ki-67 and PCNA in canine mammary neoplasias: Correlation of prognostic factors and clinical outcome. Pesq Vet Bras. 2008; 28(4):207-215.

5. Terzian ACB, Zuccari DAPC, Pereira RS, Pavam MV, Ruiz CM, Sueiro FAR, Coelho C. Avaliação da caspase-3 e Ki-67 como marcadores prognósticos nas neoplasias mamárias em cadelas. *Braz J Vet Res An Sci.* 2007; 44(2):96-102.
6. Reis AL, Carnevali J, Schmitt GC, Gärtner F. Immunohistochemical study of the expression of E-cadherin in canine mammary tumors. *Vet Rec.* 2006; 152(20):621-624.
7. Sarli G, Preziosi R, Benazzi C, Castellani G., Marcato PS. Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. *J Vet Diagn Invest.* 2007; 14(1):25-34.
8. Méric JB, Rottey S, Olausse K, Soria JC, Khayat D, Rixe O, Spano, JP. Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development. *Critic Rev Onc Hematol.* 2006; 59(1):51-64.
9. Stasinopoulos I, Moni N, Bhujwalla ZM. The malignant phenotype of breast cancer cells is reduced by cox-2 silencing. *Neoplasia.* 2008; 10(11):1163-1169.
10. Abou-zeid L, Baraka HN. Combating oxidative stress as a hallmark of cancer and aging: Computational modeling and synthesis of phenylene diamine analogs as potential antioxidant. *Saudi Pharma J.* 2014; 22(3):264-272.
11. Pande D, Negi R, Khanna S, Khanna R, Khanna HD. Vascular endothelial growth factor levels in relation to oxidative damage and antioxidant status in patients with breast cancer. *J Breast Cancer.* 2010; 14(3):181-184.
12. Sharma M, Rajappa M, Satyman A, Sharma A (2010) Oxidant/anti-oxidant dynamics in patients with advanced cervical cancer: *Mol Cel Bioch.* 2010; 341(1-2):65-72.
13. Pavlov VA, Tracey KJ. The cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain, Behavior Immunity.* 2005; 19(1):493-499.
14. Das UN. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as markers of low-grade systemic inflammation. *Annals Hepatol.* 2012; 11(3):409-411.
15. Ruiz-Espejo F, Cabezas-Herrera J, Illana J, Campoy FJ, Vidal CJ. Cholinesterase activity and acetylcholinesterase glycosylation are altered in human breast cancer. *Breast Ca Res Treat.* 2002; 72(1):11-22.
16. Ye X, Zhang C, Chen Y, Zhou T. Upregulation of acetilcolinesterase mediated by p53 contributes to cisplatin-induced apoptosis in human breast cancer cell. *J Cancer.* 2015; 6(1):48-53.
17. Worek, F, Mast U, Kiderlen D, Diepold C, Eyer P. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin Chim Acta.* 1999; 288(1):73-90.
18. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Anal Bioch.* 1999; 239(1):70-76.
19. Martinez-Moreno P, Nieto-Céron S, Torres-Lanzas J, Ruiz-Espejo F, Tovar-Zapata I, Martínez-Hernández P, et al. Cholinesterase activity of human lung tumours varies according to their histological classification. *Carcinogenesis.* 2006; 27(3):429-436.
20. Zanini D, Schmatz R, Pelinson LP, Pimentel VC, Costa P, Cardoso AM, et al. Ectoenzymes and cholinesterase activity and biomarkers of oxidative stress in patients with lung cancer. *Mol Cell Bioch.* 2013; 374(1):137-148.
21. Pohanka M. Inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase meet immunity. *Int J Mol Sci.* 2014; 15:9809-9825.
22. Pires I, Garcia A, Prada J, Queiroga FL. COX-1 and COX-2 expression in canine cutaneous, oral and ocular melanocytic tumours. *J Comp Pathol.* 2010; 143(2-3):142-149.
23. Lavallo GE, Campos CB, Bertagnolli AC, Cassali GD. Canine malignant mammary gland neoplasias with advance clinical staging treated with carboplatin and ciclooxigenase inhibitors. *In vivo* 2012; 26(3): 375-379.
24. Lavallo GE, Bertagnolli AC, Tavares WLF, Cassali GD. Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Vet Pathol.* 2009, 46(6):1275-1280.

25. Ferreira E, Gobbi H, Saraiva B S, Cassali G D. Histological and immunohistochemical identification of atypical ductal mammary hyperplasia as a preneoplastic marker in dogs. *Vet Pathol.* 2012; 49(2):322-329.
26. Serafini M, Jakszyn P, Luja ´n-Barroso L, Agudo A. Dietary total antioxidant capacity and gastric cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition study. *Int J Cancer.* 2012; 131(4):544-554.
27. Machado V, Da Silva AS, Schafer AS, Aires AR. Relationship between oxidative stress and pathological findings in abomasum of infected lambs by *Haemonchus contortus*. *Pathol Res Pract.* 2014; 210(12):812-817.
28. Evans M, Dizdaroglu D; Cooke M, Marcus S. Oxidative DNA damage: induction, repair and significance. *Mut Res.* 2004; 567(1):1-61.
29. Singh G, Maulik S K, Jaiswal A, Kumar P, Parshad R. Effect on antioxidant levels in patients of breast carcinoma during neoadjuvant chemotherapy and mastectomy. *Malaysian J Med Sci.* 2010; 17(2):24-28.
30. Da Silveira, R A, Hermes C L, Almeida T C, Bochi G V, De Bona KS, Moretto MB, Moresco RN. Ischemia-modified albumin and inflammatory biomarkers in patients with prostate cancer. *Clin Lab.* 2014; 60(10):1703-1708.