



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS

**CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE RESISTINA EM CADELAS COM
CARCINOMA EM TUMOR MISTO DE MAMA E SUA CORRELAÇÃO
COM OBESIDADE E AGRESSIVIDADE TUMORAL**

BIANCA OLIVEIRA NICCHIO

SALVADOR – BA

2018

BIANCA OLIVEIRA NICCHIO

**CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE RESISTINA EM CADELAS COM
CARCINOMA EM TUMOR MISTO DE MAMA E SUA CORRELAÇÃO
COM OBESIDADE E AGRESSIVIDADE TUMORAL**

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal nos Trópicos, da Universidade Federal da
Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal nos Trópicos.

Orientadora: Prof. Dra Alessandra Estrela Lima

Co-orientadora: Profa. Dra. Stella Maria Barrouin

SALVADOR-BA

2018

**CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE RESISTINA EM CADELAS COM
CARCINOMA EM TUMOR MISTO DE MAMA E SUA CORRELAÇÃO
COM OBESIDADE E AGRESSIVIDADE TUMORAL**

BIANCA OLIVEIRA NICCHIO

Defesa defendida e aprovada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal nos
Trópicos.

Salvador, em 31 de outubro de 2018.

Comissão Examinadora:

Prof^ª. Dr. Alessandra Estrela Lima
ESCMEVZ/UFBA

Prof^ª. Dra. Lorena Gabriela Rocha Ribeiro
UFSE

Prof^ª. Dr. Stefanie Alvarenga
ESCMEVZ/UFBA

Prof^ª. Dr. Daniela Larangeira
ESCMEVZ/UFBA

“Apreciar os riscos e suposições, manifestar brandura e mansidão, assegurar acessibilidade e preservar coragem em transição. Desperta em nós nova aurora ao coração e ensina a perder o medo. Milagres acontecem quando a gente vai à luta”

Fernando Anitelli

Dedico este trabalho à minha mãe, Fabíola, que além de ser meu maior exemplo de ser humano, foi quem me ensinou a sempre persistir sorrindo, não importam as adversidades. Te amo!

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, meus agradecimentos vão especialmente para meu alicerce, os principais construtores de mim, meu avô Gedeon e minha avó Lireni. Obrigada por cuidarem de mim com tanto carinho e amor.

Mãe, “enquanto houver você do outro lado, aqui do outro eu consigo me orientar”. A única distância que nos separa é a física, obrigada por permanecer tão perto, mesmo estando a 1200km de mim. Nunca acharei palavras suficientes para lhe agradecer pela responsabilidade de eu ser quem sou hoje. Jorge é muito orgulhoso da “mulher de diamante” que você é, e espero que ele se orgulhe de mim na conclusão desse trabalho também, pois parte dessa conquista é dele e de todo incentivo que ele sempre me deu. Nosso pequeno gigante, Matheus, também é parte disso, com tão pouca idade já me ensinou tanto. Obrigada!

Aos anjos que Deus colocou na minha vida, que vieram para mostrar que família não necessariamente tem o mesmo sangue: Elisângela, Gustavo, Leonardo, Renata. Obrigada por me darem colo, por me fazerem sorrir e por caminharem juntos comigo.

Um parágrafo especial para minha tia Mariene, que apareceu na minha vida para me ensinar a viver o agora de uma forma maravilhosa. Amo a senhora.

Aos amigos que a UNIME me trouxe: Aline, Dyego, Levi, Sidney, Ticianna, funcionários e meus queridos residentes da clínica médica, obrigada pelo apoio e paciência nessa fase. Beijo especial para Carlos, dona Lúcia e Mario, que me acompanham de perto desde a primeira vez que cheguei em Lauro de Freitas.

A todos os colegas do Projeto Mama UFBA, especialmente Marília. Muito obrigada por toda ajuda, foi imprescindível! Um muito obrigada, também, para minhas estagiárias maravilhosas, Ana Carolyne, Helen e Ione, sem vocês eu não teria chegado até aqui.

À minha orientadora, Professora Alessandra Estrela, por todos ensinamentos, incentivo, disponibilidade, conselhos e paciência. Obrigada, mainha patológica!

Ao Professor Ricardo Wagner Dias Portela, por toda ajuda na realização do ELISA.

Ao Emanuel (Guga) pela grandiosa colaboração nas análises estatística dos resultados deste trabalho e por toda disponibilidade.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

NICCHIO, B. O. **Concentração sérica de resistina em cadelas com carcinoma em tumor misto de mama e sua correlação com obesidade e agressividade tumoral.** 2018. 75p. Defesa (Mestre em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal da Bahia, 2018.

A taxa de obesidade canina tem crescido significativamente nas últimas décadas, o que faz com que esta condição tenha destaque na veterinária. Sabe-se que, na medicina humana, o excesso de peso é apontado como fator predisponente de comorbidades, a exemplo do câncer de mama. O tecido adiposo possui função endócrina, sendo capaz de liberar adipocitocinas, como a resistina, relacionadas à carcinogênese e que tem sua concentração elevada em indivíduos com sobrepeso e, também, nos portadores de neoplasias. Sua dosagem tem sido utilizada como método prognóstico desses pacientes, mas pouco se sabe sobre essa correlação em cães. Neste contexto, objetivou-se avaliar valores séricos de resistina em cadelas com carcinomas em tumor misto de mama (CMT) com intuito de avaliar sua possível correlação com o potencial proliferativo tumoral, sobrepeso e sobrevida. 50 cães foram agrupados baseados na presença ou ausência de CMT, status reprodutivo e de acordo com a condição corporal, avaliada a partir da mensuração morfométrica, pesagem e índice de massa corporal canino (IMCc). Para avaliar o potencial proliferativo dos tumores, foi utilizado o anticorpo anti-Ki-67 e, posteriormente, foram feitas as análises morfológica e morfométrica do infiltrado inflamatório. O grupo controle de animais castrados com sobrepeso apresentou valores elevados de resistina, bem como o grupo de cadelas com sobrepeso/obeso portadoras de CMT. O Ki-67 foi proporcional à elevação de resistina, apresentando-se aumentado nas cadelas obesas portadoras de CMT. Assim, foi possível afirmar que as concentrações séricas de resistina em cadelas com CMT são maiores quanto maior IMCc e o Ki-67 segue o mesmo comportamento, apresentando-se elevado no grupo de animais obesos portadores de CMT. Desta forma, altos valores de resistina podem ser correlacionados a maior potencial proliferativo das neoplasias, o que também viabiliza sua utilização como fator prognóstico no CMT em cadelas.

Palavra-chave: cães, sobrepeso, câncer de mama, adipocitocina, potencial de malignidade

ABSTRACT

NICCHIO, B. O. **Serum concentration of resistin in female dogs with carcinoma in mixed mammary tumor and its correlation with obesity and tumor aggressiveness.** 2018. 75p. Defesa (Mestre em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal da Bahia, 2018.

The rate of canine obesity has grown significantly in recent decades, which makes this condition prominent in veterinary medicine. It is known that in human medicine, excess weight is indicated as a predisposing factor of comorbidities, such as mammary cancer. The adipose tissue has an endocrine function, being able to release adipocytokines, such as resistin, related to carcinogenesis and that its concentration is high in overweight people and also in carriers of neoplasias. Its dosage has been used as a prognostic method for these patients, but little is known about this correlation in dogs. In this context, the aim was to evaluate serum levels of resistin in female dogs with carcinomas in mixed mammary tumor (CMT) in order to evaluate its possible correlation with potential proliferative, overweight and survival. 50 dogs were grouped based on the presence or absence of CMT, reproductive status and according to body condition, evaluated from the morphometric measurement, weighing and canine body mass index (BMI). To evaluate the proliferative potential of tumors, anti-Ki-67 antibody was used and morphological and morphometric analyzes of the inflammatory infiltrate were subsequently performed. The control group of overweight castrated animals presented high values of resistin, as well as the group of overweight / obese dogs with CMT. Ki-67 was proportional to the increase of resistin, being present in obese dogs carrying CMT. Thus, it was possible to affirm that the serum concentrations of resistin in animals with CMT are higher when the higher BMI and Ki-67 follow the same behavior, being higher in the group of obese animals with CMT. In this way, high values of resistin can be correlated to the greater proliferative potential of the neoplasias, which also makes it possible to be used as a prognostic factor in mammary cancer in female dogs.

Keywords: cancer, overweight, breast cancer, adipocytokine, malignancy potential

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Organograma dos grupos experimentais participantes da pesquisa.....	30
Figura 2	Avaliação clínica, macroscopia tumoral e análise morfométrica corporal de cadelas com carcinoma em tumor misto	31
Figura 3	Medidas morfométricas obtidas utilizando fita métrica.....	33
Figura 4	Avaliação antropométrica em cadelas do grupo sobrepeso/obeso com neoplasia mamária atendidas no Hospital de Medicina Veterinária da UFBA	33
Figura 5	Fotomicrografia, Carcinoma em Tumor Misto de mama, Grupo dos animais obesos	38
Figura 6	Representação gráfica de análise comparativa em relação ao IMC _c e a condição corporal das cadelas portadoras de CMT e grupo controle, independentemente da condição reprodutiva.....	42
Figura 7	Representação gráfica de análise comparativa em relação ao peso e à condição reprodutiva das cadelas portadoras de CMT e grupo controle.....	43
Figura 8	Representação gráfica de análise comparativa em relação à %GC e à condição corporal das cadelas portadoras de CMT e grupo controle, independentemente da condição reprodutiva	43
Figura 9	Representação gráfica de análise comparativa em relação ao IMC _c das cadelas do grupo controle e as do grupo com CMT, independentemente da condição reprodutiva.....	44
Figura 10	Representação gráfica da faixa etária das cadelas do grupo controle e das portadoras de CMT.....	46
Figura 11	Representação gráfica da concentração sérica de resistina em cadelas com carcinoma mamário do grupo de condição corporal normal e obesas.....	47
Figura 12	Representação gráfica da concentração sérica de resistina em cadelas com carcinoma mamário e do grupo controle.....	48
Figura 13	Comparação do índice de proliferação por imuno-histoquímica (Ki-67) nos carcinomas mamários de cadelas atendidas no HOSPMEV, no período de março de 2016 a fevereiro de 2018, com relação ao status corporal.....	49
Figura 14	Série imunológica das cadelas portadoras de carcinoma atendidas no HOSPMEV-UFBA em relação ao status corporal.....	51
Figura 15	Comparação das curvas de sobrevida das cadelas de peso normal em relação ao grupo sobrepeso/obeso.....	52
Figura 16	Comparação das curvas de sobrevida das cadelas do grupo sobrepeso/obeso em relação ao status reprodutivo.....	53

Figura 17	Comparação das curvas de sobrevida das cadelas do grupo de peso ideal em relação ao status reprodutivo.....	53
Figura 18	Comparação entre as curvas de sobrevida das cadelas do grupo de peso ideal em relação ao grau histológico dos CMT (GI ou GII).....	54
Figura 19	Comparação entre as curvas de sobrevida das cadelas do grupo sobrepeso/obeso em relação ao grau histológico dos CMT (GI ou GII).....	54

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1	Estadiamento clínico (TNM) dos carcinomas mamários da cadela 35
Tabela 2	Critérios utilizados na graduação de tumores mamários de cadela..... 37
Tabela 3	Critérios utilizados na graduação de tumores mamários de cadela conforme o grau de malignidade..... 37
Tabela 4	Intervalo de intensidade dos tipos celulares nos carcinomas mamários 39
Tabela 5	Estadiamento clínico, graduação histológica e status reprodutivo das 30 cadelas portadoras de CMT, subdivididas em grupo sobrepeso/obeso e peso normal, atendidas no HOSPMEV-UFBA no período de março de 2016 a fevereiro de 2018..... 45
Tabela 6	Série imunológica das cadelas portadoras de carcinoma atendidas no HOSPMEV-UFBA em relação ao status corporal..... 51
Tabela 7	Análise univariada e multivariada de parâmetros associados à ocorrência de óbito em cadelas portadoras de carcinoma..... 55

LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo 1	Termo de esclarecimento/consentimento livre e esclarecido..... 70
Anexo 2	Protocolo do Comité de Ética em Experimentação Animal..... 73
Anexo 3	Protocolo para exame anatomopatológico de tumores mamários caninos..... 74

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Altura da cernelha
ALT	Alanina aminotransferase
CBM	Chinese Biomedical Literature
CC	Comprimento corporal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CMT	Carcinoma em Tumor Misto
DAB	Diaminobencidina
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FA	Fosfatase alcalina
FAPESB	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia
GC	Grupo controle
GCM	Grupo experimental
HE	Hematoxilina-eosina
HOSPMEV	Hospital de Medicina Veterinária
IGF	Insulin growth fator
IMC	Índice de massa corporal
IMCc	Índice de massa corporal canina
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
kg	Quilograma
Ki-67	Antígeno marcador de proliferação celular
LAPEX	Laboratório de Patologia Experimental
LLD	Latero-lateral direito
LLE	Latero-lateral esquerdo
LPC	Laboratório de Patologia Comparada
LPV	Laboratório de Patologia Veterinária
m ²	Metro quadrado
MP	Membro pélvico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Perímetro abdominal
PC	Perímetro da coxa
PROINTER	Programa de Apoio a Pesquisas Interdisciplinares

PT	Perímetro torácico
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFBA	Universidade Federal da Bahia
VD	Ventro-dorsal
μg	Micrograma

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Obesidade.....	18
2.2 Obesidade e câncer de mama.....	20
2.3 Carcinoma em tumor misto na cadela.....	22
2.4 Adipocitocinas.....	23
2.5 Resistina.....	25
3. HIPÓTESES	28
4. OBJETIVOS	28
4.1 Objetivo geral	28
4.2 Objetivos específicos	28
5. MATERIAL E MÉTODOS	29
5.1 Aspectos Éticos e financiamento.....	29
5.2 Infra-estrutura e equipe de trabalho.....	29
5.3 Delineamento experimental.....	29
5.4 Avaliação clínica de cadelas com neoplasia.....	31
5.5 Procedimento cirúrgico.....	35
5.6 Caracterização histopatológica da neoplasia.....	36
5.7 Avaliação do índice de proliferação por imuno-histoquímica (Ki-67)...	37
5.8 Acompanhamento e sobrevida.....	39
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6.1 Parâmetros corporais das cadelas com CMT.....	41
6.2 Resistina.....	46
6.3 Índice de proliferação (Ki-67).....	48
6.4 Inflamação.....	49
6.5 Comparação das curvas de sobrevida.....	51
7. CONCLUSÕES.....	56
8. REFERÊNCIAS.....	57

9. ANEXOS 70

1. INTRODUÇÃO

Na medicina veterinária, o índice de obesidade canina tem crescido significativamente nos últimos anos (GROSSELIN et al., 2007; ZORAN, 2010; LAFLAMME, 2012; HOOKEY et al., 2018). Estudos realizados em diversos países demonstram que a incidência da obesidade na população de animais de companhia apresenta-se entre 22% e 40% (BRUNETTO, 2011). O ganho de peso em excesso tem grande importância clínica na medicina humana, principalmente pela característica de predispor a diversos distúrbios clínicos (BYERS; SEDJO, 2015; LI; HAN, 2018). Em cães, esta condição clínica predispõe a doenças cardiorrespiratórias (HENEGAR; ZHANG; RAMA, 2014), locomotoras (discopatias e ruptura de ligamento cruzado), dermatopatias (piodermite e seborreia) (GERMAN, 2006; LAFLAMME, 2006), resistência à insulina e neoplasias (LOFTUS; WAKSHLAG, 2015).

Algumas adipocitocinas, substâncias sintetizadas principalmente pelo tecido adiposo, tendem a apresentar suas concentrações proporcionalmente aumentadas ao ganho de peso em seres humanos, embora o mecanismo exato ainda não seja documentado (VENDRELL et al., 2004; LAGO et al., 2009; LU et al., 2018). Em animais de companhia, o mesmo comportamento é observado (RADIN et al., 2009; ZORAN, 2010). Além disso, pessoas portadoras de processos neoplásicos com tendência à obesidade também propendem a ter maiores valores de determinadas adipocitocinas (ASSIRI et al., 2015; SARMENTO-CABRAL et al., 2017; WANG et al., 2017). Um exemplo dessas adipocitocinas é a resistina, conhecida por estar intimamente relacionada à obesidade humana (NAGAEV; SMITH, 2001; STEPPAN et al., 2001; KOMATSU et al., 2003; KUSMINSKI et al., 2005; SASSEK et al., 2013) e à propensão dos indivíduos com sobrepeso ao desenvolvimento de neoplasias (LU et al., 2018; MALVI et al., 2018; MORRIS; EDWARDS, 2018).

A referência padrão para esta correlação se baseia em mulheres pós-menopáusicas, obesas e portadoras de câncer de mama (LAUBY-SECRETAN et al., 2016; GUI et al., 2017). Dalamaga e colaboradores (2013) avaliaram a resistina como fator predisponente de neoplasia mamária nessas pacientes e obtiveram valores elevados nas análises das que apresentavam sobrepeso. Outra informação importante, segundo Akineymiju e colaboradores (2018), quanto à sua correlação com prognóstico, é a proporção direta entre a maior concentração resistínica e o aumento da malignidade, tamanho e estágio tumoral e presença

de metástase. Tal dado faz com que a resistina seja considerada fator significativo do prognóstico de tumor de mama para estes indivíduos (PATRICIO et al., 2018).

Mulheres com sobrepeso no período pós-menopausa tem maior conversão de progesterona pelo tecido adiposo, fator que pode favorecer o crescimento tumoral no parênquima mamário (ENGIN, 2017; MULLOLY et al., 2017; HETEMAKI et al., 2017). Em estudo realizado em ratos, as fêmeas com maiores concentrações de progesterona apresentaram, também, maior expressão de resistina pelo tecido adiposo (STELMANSKA, et al., 2012). Esta informação pode sugerir a causa da maior predisposição de neoplasia mamária nestas pessoas (VRIELING et al., 2010). Em cães, pouco se sabe sobre tal fenômeno (O'NEILL et al., 2012; MANKOWSKA et al., 2015), embora já seja documentada maior ocorrência de tumor de mama em cadelas sobrepeso (LIM et al., 2015), sendo os carcinomas em tumor misto o tipo mais frequentemente encontrado nessa espécie (ESTRELA-LIMA et al., 2010; SAAD et al., 2017; MACHADO et al., 2018).

Neste contexto, objetivou-se, com a realização deste estudo, avaliar as concentrações de resistina em cadelas portadoras de carcinomas mamários e sua correlação com status corporal, fatores prognósticos, sobrevida, índice proliferativo da neoplasia e graduação, tendo como base comparativa as pesquisas realizadas em mulheres, por considerar as semelhanças com a espécie canina no que condiz ao tumor de mama.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Obesidade

A obesidade é definida como um estado clínico de acúmulo excessivo de gordura corporal e é considerada uma enfermidade de grande relevância na medicina humana (KIL; SWANSON, 2010; LI; HAN, 2018; MORRIS; EDWARDS, 2018). Por contribuir com desenvolvimento de doenças secundárias, é uma condição capaz de interferir na patogênese de diversos distúrbios clínicos e de exacerbar outras afecções pré-existentes (MORA; PESSIN, 2002; ZIMMET; THOMAS, 2003; TILG; MOSCHEN, 2006; OLIVEIRA et al., 2010; LAFLAMME, 2012; MENDES et al., 2013; CODOÑER-FRANCH; ALONSO-IGLESIAS, 2015; KURYSZKO et al., 2016). É crescente o número de casos de animais

obesos na rotina clínica (GROSSELIN et al., 2007; HOOKEY et al., 2018), quase 50% dos cães e gatos entre cinco e 10 anos de idade são afetados (LAFLAMME, 2012), o que faz com que a identificação de fatores predisponentes à obesidade desempenhe papel significativo (RADIN et al., 2009; SCHWARTZ; LAZAR, 2011; MENDES et al., 2013; LOFTUS; WAKSHLAG, 2015).

Segundo Osto e Lutz (2015), a obesidade resulta do desequilíbrio prolongado entre o aumento na ingestão de energia e diminuição de gasto da mesma, muitas vezes relacionado à pouca atividade física, o que faz com que este balanço energético positivo prolongado leve ao acúmulo anormal de gordura. Os hábitos alimentares da espécie canina passaram por algumas alterações nas últimas décadas devido à influência do homem, a exemplo da introdução de petiscos à dieta (APTEKMANN et al., 2014). As mudanças no estilo de vida dos animais também têm contribuído para o aumento dos índices da obesidade canina, visto que, atualmente, os cães vivem em apartamentos e casas, não possuem hábito de caça e não se exercitam como quando tinham vida livre (VEIGA, 2007).

Embora também seja considerada uma enfermidade essencialmente nutricional, outros fatores podem predispor o cão ao sobrepeso, como a genética, idade e castração (SILVA et al., 2017). Weeth e colaboradores (2007) observaram que cães não castrados apresentam frequência de obesidade (7,2%) ou sobrepeso (14,2%) menor quando comparado aos castrados (78,6%). Segundo German (2006), as fêmeas castradas apresentam maior predisposição ao ganho excessivo de peso do que os machos castrados. A hipótese de que a castração aumenta a incidência de obesidade deve-se às mudanças hormonais secundárias e à redução da taxa de metabolismo devido à perda de hormônios sexuais (GROSSELIN et al., 2007; ZORAN, 2010).

A composição nutricional da dieta possui menor importância que o consumo energético diário do animal, pois este, quando em excesso, independentemente do tipo de alimentação, induz ao ganho de peso (BRUNETTO et al., 2011; KURYSZCO et al., 2016). Algumas endocrinopatias são apontadas como fatores predisponentes ao ganho de peso, como hipotireoidismo e hiperadrenocorticismo (GERMAN, 2006). Zoran (2010) aponta as raças Labrador, Boxer, Cocker Spaniel, Bassethound, Dachshund e Beagle como predispostas à obesidade e afirma, ainda, que 40% dos cães, independentemente do sexo, acima de 12 anos são obesos.

O excesso de peso corporal predispõe o desenvolvimento de alterações como distúrbios articulares, diabetes mellitus, dermatopatias, dislipidemias, doenças cardiorrespiratórias,

desordens reprodutivas, doenças do trato urinário e neoplasias, fatores que, por sua vez, reduzem ainda mais a expectativa e qualidade de vida dos animais obesos (GERMAN, 2006). Segundo LaFlamme (2012), até mesmo cães com sobrepeso moderado apresentam maior risco de morbidade precoce quando comparados aos de peso normal. A identificação da obesidade e a compreensão de suas consequências podem ser apontadas como os estágios iniciais mais importantes para corrigir esta condição (SILVA et al., 2017).

O índice de massa corporal (IMC) é um método simples calculado pela divisão entre o peso corporal em quilogramas e o quadrado da altura em metros (kg/m^2) e é reconhecido pela OMS, usado para classificar baixo peso, peso ideal, excesso de peso e obesidade em indivíduos adultos (FAZENDA, 2009). Muller et al. (2008) propuseram uma adaptação do IMC utilizado em humanos para cães, com a mesma fórmula de cálculo (kg/m^2), com base na extensão entre a base da nuca (articulação atlanto-occipital) e o solo imediatamente atrás dos membros pélvicos, passando a fita métrica sobre a base da cauda. O índice de massa corporal canino (IMCc) ideal para cães de médio porte compreende valores entre 11,8 e 15 kg/m^2 . Outra maneira de avaliação corporal é a porcentagem de gordura corporal (%GC), proposta por Burkholder (2000) como método auxiliar à análise de condição corpórea.

2.2. Obesidade e câncer de mama

O excesso de peso corporal é correlacionado tanto ao risco de desenvolvimento, quanto à mortalidade por neoplasias (CALLE et al., 2003; RENEHAN et al., 2010; ASSIRI et al., 2015; MORRIS; EDWARDS, 2018). Estima-se que o número de casos de câncer causados por obesidade seja de 20% e que, ainda, o potencial maligno é influenciado pela mudança de peso e distribuição da gordura corporal (DE-PERGOLA; SILVESTRIS, 2013). Na medicina humana já pôde ser comprovada a maior incidência de tumor de próstata, ovário e de mama nos pacientes sobrepeso (PETO, 2001; CALLE et al., 2003; PICON-RUIZ et al., 2017). A obesidade em mulheres no período após a menopausa é descrita como fator potencializador do risco de desenvolvimento de tumor de mama (PICHARD et al., 2008; RENEHAN et al., 2010; JARDE et al., 2009; MACCIO et al., 2009; VRIELING et al., 2010; ASSIRI et al., 2015; LAUBY-SECRETAN et al., 2016; LI; HAN, 2018).

Em 2014, Tabak descreveu que para cada 5 kg/m^2 de aumento do Índice de Massa Corpórea (IMC) pode ocorrer aumento de 12% na incidência de câncer mamário no período

pós menopausa em mulheres, fator este pode estar correlacionado a uma maior síntese de estradiol, agente promotor de neoplasia mamária. Na medicina veterinária, cadelas obesas também têm demonstrado maior ocorrência de tumores mamários quando comparadas às fêmeas de peso corporal normal (SONNENSCHNEIN et al., 1991; ZUCCARI et al., 2008; LIM et al., 2015). Tanto na medicina humana quanto na veterinária, esses mecanismos não são totalmente compreendidos (MACCIO et al., 2009; LIM et al., 2015; ASSIRI et al., 2015; KURYSZKO et al., 2016).

Algumas hipóteses têm sido propostas para desvendar esta correlação (PICHARD et al., 2008; MACCIO et al., 2009; BYERS; SEDJO, 2015). Um dos mecanismos citados é a superprodução estrogênica que ocorre a partir do tecido adiposo (LORINCZ; SUCUMAR, 2006; PICHARD et al., 2008; TAUBES, 2012; ENGIN, 2017; HETEMAKI et al., 2017; MULLOLY et al., 2017). Maiores porcentagens de gordura corporal possibilitam conversão exacerbada de andrógenos em estrógenos, o que explica o hiperestrogenismo que pode estar presente nas mulheres obesas (PICHARD et al., 2008) e pode justificar a maior incidência de tumor de mama nestes indivíduos, pois o estrógeno é considerado um hormônio implicado na carcinogênese mamária (CLELAND et al., 1985; SILTERI et al., 1987; ENGIN, 2017; MULLOLY et al., 2017; HETEMAKI et al., 2017). Uma segunda hipótese é que a obesidade, associada à síndrome metabólica, resulta em aumento da insulina circulante e do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), que atuam como mitógenos (LORINCZ; SUCUMAR, 2006). Essa desregulação da sinalização da insulina que leva ao desequilíbrio na proliferação celular, diferenciação, apoptose e expressão alterada de adipocitocinas (DJURIC, 2017).

Uma outra hipótese menciona os adipócitos e suas funções endócrinas como principais causas (HAUSMAN et al., 2001; DIZDAR; ALYAMAC, 2004; MORRIS; EDWARDS, 2018). Os adipócitos mamários também são importantes fontes de fatores angiogênicos, incluindo fatores de crescimento e adipocitocinas (PERRIER et al., 2009). Algumas dessas adipocitocinas possuem características inflamatórias e são secretadas, também, a partir de macrófagos (XU et al., 2003), o que torna o parênquima mamário um microambiente favorável para o desenvolvimento de células neoplásicas (CATALAN et al., 2011). As concentrações séricas de diversas adipocitocinas e proteínas associadas à inflamação apresentam-se elevadas em pacientes obesos (PRADO et al., 2009). Essa característica faz com que a obesidade esteja associada a um estado de inflamação crônica

(SPIEGELMAN; ENERBÄCK, 2006), sendo a interação desses fatores considerada o alvo promissor para entender a relação do sobrepeso com a carcinogênese (HARVEY et al., 2011).

Protani et al. (2010) realizaram uma meta-análise de 43 estudos de mulheres diagnosticadas com tumor de mama entre 1963 e 2005 e estimaram um aumento de 33% na taxa de óbito das pacientes que eram obesas. Trabalhos experimentais realizados em roedores demonstraram que, nos animais obesos, o percentual de desenvolvimento de tumor de mama era mais alto (CLEARY, 2013). Lim e colaboradores (2015) realizaram um estudo que objetivou investigar a correlação da obesidade com carcinomas mamários na veterinária e observaram que as cadelas sobrepeso desenvolveram lesões neoplásicas de forma mais precoce e com grau histológico mais elevado quando comparado ao grupo de animais com peso corporal ideal ou magros.

2.3. Carcinoma em Tumor Misto em cadela

As neoplasias de mama constituem as lesões tumorais de maior ocorrência em cadelas (PENA et al., 2013; VISAN et al., 2016). Dentre elas, os carcinomas em tumor misto (CMT) representam os tumores mais frequentemente encontrados em oncologia mamária nessa espécie (MISDORP et al., 1973; RICHARDS et al., 2007; SAAD et al., 2017). Na medicina humana, estas neoplasias são mais encontradas em glândulas salivares e são consideradas um tipo incomum de lesão em mama (KUMAR et al., 2003). Os CMT são pouco frequentes em mulheres e são histologicamente similares ao carcinoma metaplásico da mama humana (GENELHU et al., 2007).

Anteriormente, os CMT eram considerados tumores malignos mistos similares aos carcinossarcomas (MOULTON; ROSENBLAT, 1970; MISDORP et al., 1973). Entretanto, em 1999, Misdorp e colaboradores os separaram em dois tipos histológicos distintos, pois observaram que os CMT apresentam malignidade em células epiteliais, enquanto os carcinossarcomas possuem nas epiteliais e, também, nas mesenquimais. A agressividade do CMT pode ocorrer pela malignização de seus componentes epiteliais, seja pela longa evolução da neoplasia, ou por sua recorrência (GENELHU et al., 2007). Entretanto, na maioria das vezes, sua apresentação em cães possui comportamento benigno (SAAD et al., 2017).

Microscopicamente, os carcinomas em tumor misto são compostos, além de um componente epitelial maligno, de um componente mesenquimal benigno, que pode ser

representado por tecido cartilaginoso, ósseo ou adiposo, assim como observado nos tumores mistos benignos (CASSALI et al., 2017). Focos de células epiteliais com pleomorfismo elevado e mitose atípica, que surgem a partir de tumores mistos benignos, são observados e sua proliferação pode invadir ou substituir completamente a lesão benigna pré-existente no momento do exame histopatológico (CASSALI et al., 2014). Os fatores que determinam a transformação maligna dos tumores mistos benignos ainda são pouco conhecidos e mais estudos são necessários para compreender o processo de progressão de malignidade dessas neoplasias em cães (RAMALHO et al., 2006; BERTAGNOLLI et al., 2011).

Em cadelas, o CMT apresenta prognóstico favorável em comparação a outros carcinomas e seu comportamento biológico varia de acordo com o tipo histológico de seu componente epitelial maligno. Como são tumores inseridos em uma lesão benigna, espera-se que essas neoplasias estejam associadas a um melhor prognóstico e que os animais afetados exibam taxas de sobrevida maiores (CASSALI et al., 2014).

2.4 Adipocitocinas

Os adipócitos são importantes no metabolismo por liberar muitas adipocitocinas, que são moléculas biológicas altamente ativas responsáveis por diversas funções fisiológicas no organismo (PAMUK et al., 2006; TILG; MOSCHEN, 2006; CONDE et al., 2011; LAFLAMME, 2012; CODOÑER-FRANCH; ALONSO-IGLESIAS, 2015; KURYSZKO et al., 2016; STERN et al., 2016). Adipocitocina é um termo universal utilizado para descrever as proteínas que são sintetizadas pelo tecido adiposo (FISHER-POSOVSZKY et al., 2007; PAN; KASTIN, 2007; PRADO et al., 2009), essenciais na regulação de processos biológicos como balanço energético, metabolismo de lipídios e glicose, mecanismos inflamatórios e imunes, hemostasia e angiogênese (RADIN et al., 2009).

Os efeitos das adipocitocinas variam de acordo com a espécie animal e sua fonte de origem (RADIN et al., 2009; WOZNIAK et al., 2009). Contudo, os mecanismos que interligam algumas adipocitocinas e a obesidade ainda não são bem esclarecidos (LAGO et al., 2009; LU et al., 2018). Sabe-se que, em animais de companhia, a proporção que a taxa de obesidade aumenta, algumas adipocitocinas também tendem a se elevar (RADIN et al., 2009). A mensuração desses compostos em cães, gatos e cavalos varia de acordo com o equilíbrio do armazenamento de triglicerídeos e mobilização de ácidos graxos (FISCHER-POSOVSZKI et

al., 2007). O excesso de tecido adiposo faz com que a produção e liberação de adipocitocinas fiquem desreguladas, o que poderia justificar sua correlação com o excesso de peso e desenvolvimento de algumas afecções (LAFLAMME, 2012; BADOER et al., 2015; MORRIS; EDWARDS, 2018).

A leptina e a adiponectina são as adipocitocinas mais estudadas (TRAYHURN; WOOD, 2005; TILG; MOSCHEN, 2006; RADIN et al., 2009), embora seja crescente o interesse de pesquisadores pela ação da resistina em diversas espécies, incluindo cães e gatos (ZORAN, 2010; O'NEILL et al., 2012). A adiponectina é um hormônio polipeptídico caracterizada pela atividade anti-inflamatória e anti-aterogênica, além de desempenhar um papel fundamental no metabolismo de carboidratos e gorduras (KURYSZCO et al., 2016). A leptina é um hormônio polipeptídeo de 167 aminoácidos codificado por um gene associado à obesidade (ZHANG et al., 1997; RADIN et al., 2009) e atua como sinalizador entre o tecido adiposo e o sistema nervoso central na regulação da ingestão alimentar, gasto energético e, conseqüentemente, massa corporal (CAMPFIELD et al., 1995). A leptina e a resistina possuem comportamento semelhante, se apresentam elevadas na obesidade (KMIEC et al., 2005).

Na década de 1990, a partir da descoberta da leptina, a extensa função secretora do tecido adiposo foi reconhecida e outras adipocitocinas foram identificadas (TRAYHURN; WOOD, 2005; CONDE et al., 2011), como a IL-6, TNF- α , lipocalina 2, IL-8, apelina e visfatina (RAUCCI et al., 2013; KURYSZKO et al., 2016). Alguns desses compostos secretados foram investigados e correlacionados com o desenvolvimento de obesidade e outras comorbidades, como o câncer de mama (CRISOSTOMO et al., 2016; GUI et al., 2017; WANG et al., 2017; LU et al., 2018). Apesar de serem complexos os mecanismos que explicam essa correlação, sabe-se que os adipócitos de pessoas obesas produzem adipocitocinas de características angiogênicas capazes de afetar células adjacentes aos tumores de mama (LI; HAN, 2018; MALVI et al., 2018).

Em 2017, Gui e colaboradores realizaram um estudo que objetivou avaliar a correlação entre as adipocitocinas com a obesidade e câncer de mama. Para isso, analisaram informações do banco de dados da PubMed, EMBASE, Web of Science e Chinese Biomedical Literature (CBM) que relatavam a associação de adipocitocinas relacionadas à obesidade com câncer de mama publicados antes de 15 de setembro de 2015. Inicialmente, foram identificadas 26783 publicações e, posteriormente, 119 artigos selecionados para posterior meta-análise. Destes 119 estudos, 26 compararam concentração de adipocitocinas entre indivíduos saudáveis obesos e não-obesos, e 93 compararam valores de adipocitocinas entre

pacientes com câncer de mama. Os indivíduos com sobrepeso apresentaram maiores resultados de leptina quando comparados aos que apresentavam peso ideal. Foi observado aumento significativo de leptina e resistina nos pacientes com neoplasia mamária.

2.5. Resistina

A resistina é um hormônio polipeptídico produzido principalmente pelos adipócitos (REA; DONNELLY, 2004; ASSIRI et al., 2015), possui capacidade de manter a glicemia em jejum (KURYSZKO et al., 2016) e está potencialmente correlacionada com a obesidade e também à resistência insulínica (NAGAEV; SMITH, 2001; STEPPAN et al., 2001; KOMATSU et al., 2003; KUSMINSKI et al., 2005; SASSEK et al., 2013). Ao contrário dos roedores, que apresentam secreção resistínica predominantemente a partir do tecido adiposo, os humanos possuem maior expressão da resistina por meio de macrófagos (PATEL et al., 2002; KASER et al., 2003; SCHWARTZ; LAZAR, 2011). Em bovinos, a síntese resistínica ocorre no parênquima mamário e adiposo (KOMATSU et al., 2003), enquanto em suínos é produzida predominantemente pelos leucócitos (DAI et al., 2005). Em caninos, a origem de sua produção ainda não foi documentada (RADIN et al., 2009).

Pouco se sabe sobre a patofisiologia da resistina em cães devido à escassez de estudos realizados (RADIN et al., 2009; ZORAN, 2010; GRAVES, 2011; O'NEILL et al., 2012; MANKOWSKA et al., 2015). Em humanos, sabe-se que sua concentração sérica se eleva proporcionalmente ao ganho de tecido adiposo (COURTEN et al., 2004; ZORAN, 2010; MALVI et al., 2018; LU et al., 2018), mas seus mecanismos de ação ainda são controversos (NAGAEV; SMITH, 2001; VENDRELL et al., 2004; KUSMINSKI et al., 2005; TILG; MOSCHEN, 2006; BADOER et al., 2015; WANG et al., 2017; MALVI et al., 2018). Em roedores com obesidade induzida experimentalmente por meio de dieta, foi observado aumento significativo da resistina plasmática (STEPPAN et al., 2001). Valores elevados de resistina ocasionados por fatores genéticos ou externos, como obesidade e dieta, podem desempenhar papel importante na patogênese de algumas neoplasias, como o câncer mamário, por exemplo (SCHWARTZ; LAZAR, 2011). Autores como Gui et al. (2017) e Malvi et al. (2018), afirmam, também, que a resistinemia apresenta-se significativamente elevada em humanos acometidos por processos neoplásicos.

Desde sua descoberta em 2001, sua fisiologia tem demonstrado ser bastante complexa e tem sido apontada como parte do processo de desenvolvimento do câncer e de metástases (STEPPAN et al., 2001; SCHWARTZ; LAZAR, 2011). Neoplasias de estômago, fígado, pâncreas, pulmão e mama são associados à patogênese da resistina (CODOÑER-FRANCH; ALONSO-IGLESIAS, 2015). Segundo estudo realizado em ratos por Stelmanska et al. (2012), as fêmeas com maiores concentrações de progesterona apresentaram, também, maior expressão de resistina no tecido adiposo. Essa informação pode sugerir a maior predisposição de neoplasia mamária em mulheres sobrepeso no período pós-menopausa (VRIELING et al., 2010). Apesar de essa correlação não ser bem esclarecida, sabe-se que a resistina promove a multiplicação epitelial e mesenquimal no parênquima mamário, mecanismos críticos para o desenvolvimento tumoral e para a formação de metástase (WANG et al., 2017).

Sun et al. (2010) e Li e Han (2018) relatam maior concentração sérica de resistina em mulheres com neoplasia mamária quando comparado a pacientes saudáveis e, ainda, correlacionam os resultados elevados com as pacientes sobrepeso. Dalamaga et al. (2013) realizaram uma análise epidemiológica com mulheres que apresentaram câncer de mama, correlacionaram o padrão histológico do tumor, prognóstico e resistinemia e observaram concentrações resistínicas séricas significativamente maiores em pacientes que apresentavam neoplasia mamária mais agressiva no período pós-menopausa, quando comparado com pacientes do grupo controle e portadores de neoplasias benignas. Além disso, quanto maior a concentração de resistina, pior malignidade, estágio tumoral, tamanho e presença de metástase (WANG et al., 2017; AKINEYMIJU et al., 2018).

A resistina já tem sido citada como biomarcador para prognóstico de tumor de mama (DALAMAGA et al., 2013; PATRICIO et al., 2018). Segundo Goodson et al. (2000), o marcador de proliferação por imunohistoquímica mais eficaz na detecção de câncer mamário é o Ki-67, proteína regulada pelo ciclo celular muito utilizada para avaliar potencial proliferativo das neoplasias (YERUSHALMI et al., 2010). Sarmiento-Cabral e colaboradores (2017) observaram que roedores com maiores valores de resistina possuíam maior expressão de diferentes marcadores associados à agressividade neoplásica, como o Ki-67. Devido a isso, sua utilização como indicador clínico para o câncer de mama também está em ascensão na medicina humana (PATHMANATHAN; BALLEINE, 2013). Em cães, altos índices de proliferação celular são associados à progressão tumoral, prognóstico ruim e menor tempo de sobrevida nos pacientes com carcinomas mamários, fator que, do mesmo modo, tem feito com

que o Ki-67 também seja reconhecido como fator prognóstico nesses pacientes (SANTOS et al., 2013; ARAUJO et al., 2016).

A resistina é a adipocitocina menos estudada na medicina humana, bem como sua possível correlação entre a obesidade com o desenvolvimento de tumores mamários (GEORGIU et al., 2016; WANG et al., 2017). Para compreender melhor seus efeitos, mecanismos de ação, sua relação com a obesidade e desenvolvimento neoplásico, muitas pesquisas ainda serão necessárias (TILG; MOSCHEN, 2006; SUN et al., 2010; LU et al., 2018; MALVI et al., 2018; MORRIS; EDWARDS, 2018). Contudo, sua relevância tem crescido por se caracterizar como fator importante na fisiopatologia do excesso de peso e suas condições relacionadas (SETHI; VIDAL-PUIG, 2007; RADIN et al., 2009; BALISTRERI et al., 2010; LU et al., 2018; MORRIS; EDWARDS, 2018; PATRICIO et al., 2018).

3. HIPÓTESES

Cadelas com sobrepeso/obesas portadoras de carcinoma em tumor misto apresentam maior concentração sérica de resistina e tumores com maior potencial proliferativo;

Os macrófagos representam a população celular predominante no infiltrado inflamatório associado aos carcinomas em tumores mistos da mama de cadelas obesas e apresentam correlação positiva com a concentração sérica de resistina;

4. OBJETIVO

4.1. Objetivo geral

Avaliar as concentrações de resistina em cadelas obesas portadoras de carcinomas em tumor misto e verificar sua possível correlação com fatores prognósticos (estadiamento, graduação, inflamação e potencial proliferativo) e sobrevida.

4.2. Objetivo específico

✓ Avaliar as concentrações séricas de resistina em cadelas portadoras de carcinomas em tumor misto de mama independente do escore corporal;

✓ Verificar possível correlação entre a maior concentração de resistina, estadiamento clínico, graduação histopatológica, inflamação, potencial proliferativo dos tumores e a condição de sobrepeso/obesidade;

✓ Avaliar a morfologia e morfometria do infiltrado inflamatório associado ao carcinoma mamário de cadelas obesas, identificando o tipo celular predominante;

✓ Identificar a sobrevida das cadelas a partir de acompanhamentos bimestrais.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Aspectos Éticos e financiamento

Todos os tutores legais foram previamente informados sobre a realização do projeto de pesquisa, mediante assinatura em Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) com número de protocolo 05/2015 (Anexo 2). O projeto obteve financiamento da FAPESB por meio do edital 23/2014, Programa de Apoio a Pesquisas Interdisciplinares – PROINTER.

5.2. Infra-estrutura e equipe de trabalho

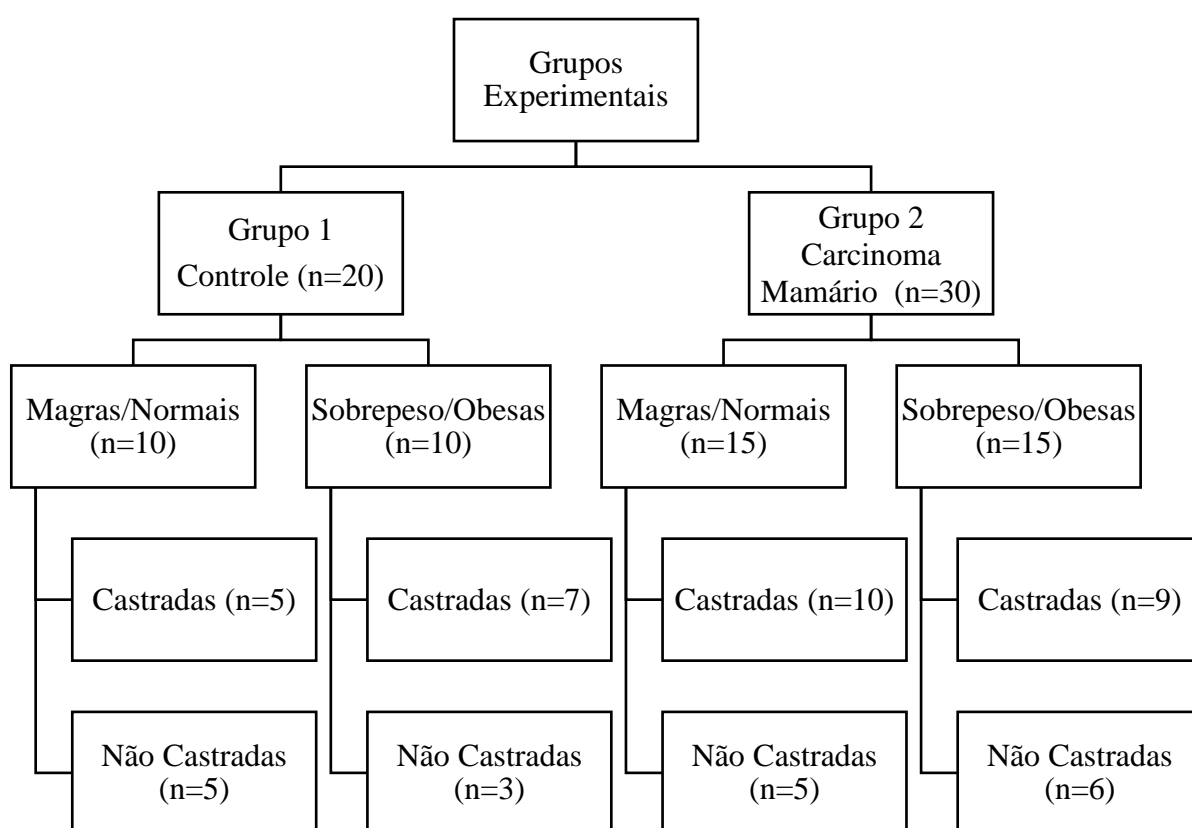
Foi utilizada a infraestrutura do Hospital de Medicina Veterinária Professor Renato Rodenburg de Medeiros Netto (HOSPMEV/UFBA), envolvendo os setores de Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais, Laboratório de Análises Clínicas e Laboratório de Patologia Veterinária. Como unidades parceiras cita-se o Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciência da Saúde/UFBA; Laboratório de Patologia Comparada (LPC) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e o Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX) do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz - Fundação Oswaldo Cruz (Salvador, Bahia), A pesquisa foi desenvolvida com o apoio Núcleo de Pesquisa em Oncologia Mamária (NPqOM) composta por professores, pós-graduandos (mestrandos, doutorandos, residentes e pós doutorandos) e estudantes de graduação.

5.3 Delineamento experimental

Foram selecionadas 50 cadelas de diferentes raças e condição corporal, com idade variando de quatro a 13 anos, atendidas no Hospital Veterinário da UFBA (Bahia-Brasil) no período de março 2016 a fevereiro de 2018. Deste total, 30 cadelas eram portadoras de neoplasia mamária, com diagnóstico histopatológico de CMT, e constituíram o grupo experimental (GCM). O grupo controle (GC) foi constituído por 20 cadelas híginas, sem

histórico de neoplasia. Os animais foram classificados, dentro de cada grupo, de acordo com a condição corpórea, em cadelas com condição corpórea normal e cadelas obesas (Figura 1) e posteriormente subclassificadas em castradas e não castradas.

Figura 1: Organograma dos grupos experimentais participantes da pesquisa. Grupo 1 correspondente ao grupo controle, constituído por cadelas sem carcinoma mamário, subdivididos em pacientes magras/de peso normal e sobrepeso/obesas. Grupo 2 composto por cadelas com carcinoma mamário, subdivididas magras/de peso normal e sobrepeso/obesas.



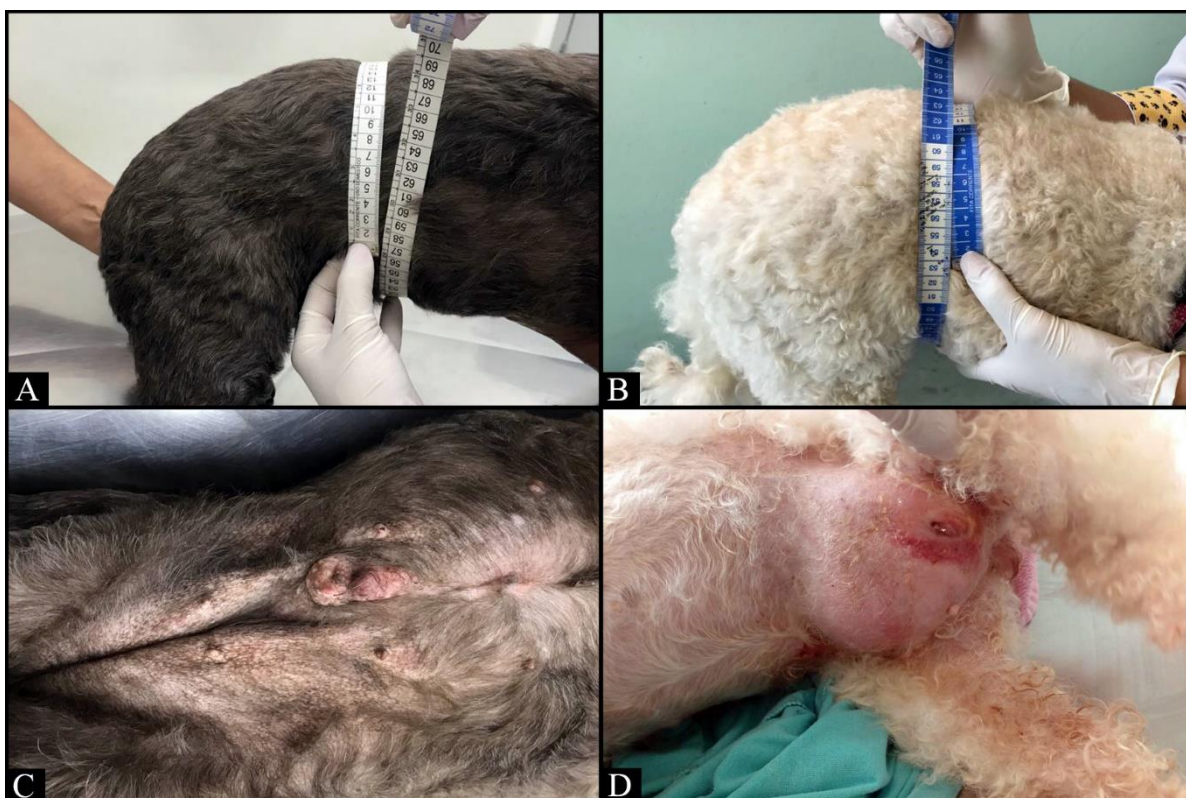
Critérios de exclusão

Nenhum dos animais apresentava histórico de endocrinopatia ou utilização de anti-inflamatório 30 dias antes de realizarem a mastectomia, sendo estes aspectos critérios de exclusão dos animais na pesquisa.

5.4. Avaliação clínica de cadelas com neoplasia

As cadelas com neoplasia mamária passaram por exame físico geral e específico (Figura 2). Foram avaliados a condição clínica geral, histórico clínico, ciclo reprodutivo (castrada, não castrada, ciclo estral regular, histórico de pseudociese e utilização de progestágenos) e hábitos alimentares. Essas informações foram transcritas para uma ficha oncológica específica segundo o protocolo modificado de Ferreira et al., (2003) (Anexo 3).

Figura 2: Avaliação clínica, macroscopia tumoral e análise morfométrica corporal de cadelas com carcinoma em tumor misto. A) Medida de circunferência abdominal em cadela do grupo de peso normal portadora de CMT, atendida no Hospital de Medicina Veterinária da UFBA. B) Medida de circunferência abdominal em cadela do grupo sobrepeso/obeso portadora de CMT, atendida no Hospital de Medicina Veterinária da UFBA. C) Carcinoma mamário do paciente da figura A. D) Carcinoma mamário do paciente da figura B.



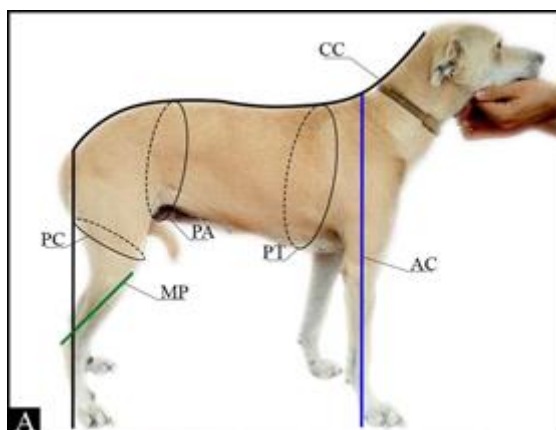
Determinação antropométrica

Visando agrupar os animais segundo a sua condição corporal, foi realizada mensuração morfométrica (MM) (Figura 3 e 4), pesagem dos pacientes, índice de massa corporal canino (IMCc) e percentual de gordura corporal (%GC). O IMCc seguiu recomendações de Muller et al., (2008) pela fórmula $IMCc = \text{peso (kg)} / (\text{estatura em m})^2$, sendo que o IMCc ideal para cães de médio porte compreende valores entre 11,8 e 15 kg/m². Para o exame de composição corporal, foi realizada a medição morfométrica proposta por Burkholder (2000) e em seguida a porcentagem de gordura corporal (%GC) que, em animais com peso ideal se apresenta entre 16 e 25%. Segundo Burkholder (2000), os valores da medição são inseridos na equação a seguir para determinação da % de gordura corporal:

$$\% \text{ GC em cadelas} = - 1,7 (\text{MP cm}) + 0,93 (\text{PA cm}) + 5$$

Na qual MP indica o comprimento do membro posterior direito, mensurado desde a tuberosidade calcânea até a metade do ligamento patelar e PA significa perímetro do abdome.

Figura 3: As medidas morfométricas foram obtidas utilizando fita métrica. Para a estatura, a medida foi desde a articulação atlanto-occipital até a região posterior aos membros posteriores, passando e apoiando a fita sobre a última vértebra sacral. (CC - comprimento da coluna; PA - Perímetro do abdome; PT - Perímetro do tórax; PC - Perímetro da coxa; MP - Comprimento do membro posterior e AC - Altura da cernelha).



Fonte: Adaptado de Burkholder, 2000; Santos, 2017

Figura 4: Avaliação antropométrica em cadelas do grupo sobrepeso/obeso com neoplasia mamária atendidas no Hospital de Medicina Veterinária da UFBA. **A e C)** Medida morfométrica da altura da cernelha. **B)** Medida morfométrica do comprimento da coluna. **D)** Medida morfométrica do perímetro torácico.



Obtenção do sangue periférico

Para a avaliação da resistina, o sangue foi colhido em seringas descartáveis estéreis por meio da venopunção jugular, depositado em tubos estéreis bioquímicos e mantido a temperatura ambiente. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 3000 rotações por minuto durante 10 minutos para obtenção do soro, que foi congelado e analisado posteriormente. A quantificação da concentração sérica de resistina foi realizada através de kit comercial canino baseado na metodologia de ELISA sanduíche (Biomatik[®]). Os procedimentos foram realizados de acordo com o descrito pelo fabricante.

Estadiamento clínico

O estadiamento clínico foi realizado com base no sistema TNM para carcinomas de mama em cadelas, a partir do critério avaliativo do tamanho do tumor (T), envolvimento neoplásico de linfonodos regionais (N) e presença de metástases à distância (M) (CASSALI et al., 2014, modificado de OWEN, 1980) (Tabela 1). Nos casos em que o paciente apresentava mais de um nódulo, cada um deles foi medido separadamente e o estadiamento foi realizado baseado na medida do maior tumor invasivo, de acordo com os critérios adotados pelo sistema TNM. A avaliação macroscópica dos linfonodos inguinais e axilares foi realizada por palpação e a presença ou não de envolvimento neoplásico determinada pelo exame histopatológico, após a exérese cirúrgica da cadeia mamária envolvida.

Tabela 1: Estadiamento clínico (TNM) dos carcinomas mamários da cadela

Tumor Primário (T)	Linfonodos Regionais (N)
T0 Tumor não detectável	N0 Sem evidência de linfonodo regional (axilares ou inguinais)
T1 Tumor < 3 cm a: não fixo b: fixo à pele c: fixo ao músculo	N1 Linfonodo Ipsilateral envolvido a: não fixo b: fixo
T2 Tumor de 3 – 5 cm a: não fixo b: fixo à pele c: fixo ao músculo	N2 Linfonodos bilaterais envolvidos a: não fixo b: fixo
T3 Tumor > 5 cm a: não fixo b: fixo à pele c: fixo ao músculo	Metástases à distância (M) M0 Sem evidência de metástase distante M1 Metástase distante incluindo linfonodos não-regionais
T4 Tumor de qualquer tamanho Carcinoma inflamatório	

Fonte: modificado de ELSTON; ELLIS, 1993; CASSALI et al., 2014.

Exames pré-cirúrgicos

A fim de avaliar se o paciente apresentava condições clínicas de ser submetido ao procedimento cirúrgico, realizaram-se hemograma e exames de bioquímica sérica por meio de kits de bioquímica clínica comerciais [alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), creatinina, uréia, glicose e cálcio], exames de imagem [radiografia torácica em três incidências: latero-lateral direita (LLD), latero-lateral esquerda (LLV) e ventro-dorsal (VD) para pesquisa de metástase pulmonar, ultrassonografia de abdômen total, eletrocardiograma e ecocardiograma.

5.5. Procedimento cirúrgico

O tipo de abordagem cirúrgica realizada foi a mastectomia radical unilateral com a retirada dos linfonodos inguinais em todos os casos. As cadelas foram monitoradas durante o período pós-cirúrgico com utilização de bandagem compressiva e no décimo quinto dia foi realizada a retirada de pontos.

5.6. Caracterização histopatológica da neoplasia

Biópsia excisional e exame histopatológico

A cadeia mamária acometida, incluindo pele, tecido subcutâneo e linfonodos regionais, foi encaminhada ao Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) logo após o término da cirurgia. Os fragmentos foram fixados em formol neutro, tamponados com fosfato a 10% e processados pela técnica de inclusão em parafina (PROPHET; MILLS; ARRINGTON, 1992). Secções histológicas de 4µm foram coradas pelas técnicas da Hematoxilina-Eosina (HE) (LUNA, 1968) para posterior classificação e graduação histopatológica.

Classificação Histopatológica

Os exames histopatológicos foram processados no Laboratório de Patologia Veterinária HOSPMEV/UFBA. Todos os casos foram confeccionados em duplicatas das lâminas, visando à análise independente por dois patologistas veterinários (LPV/UFBA e IGM/Fiocruz). A identificação do tipo histológico seguiu a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) (MISDORP et al., 1999) e padronização do *Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors: benign mixed tumors, carcinomas in mixed tumors and carcinosarcomas* (CASSALI et al., 2017). O grupo de estudo foi composto apenas por cadelas que apresentavam tumor com diagnóstico histológico de Carcinoma em Tumor Misto.

Graduação histopatológica

Foi utilizado o grau histológico de Nottingham que inclui: percentual de diferenciação tubular; avaliação do pleomorfismo nuclear e índice mitótico (ELSTON; ELLIS, 1993; CASSALI et al., 2014) (Tabela 2).

Tabela 2: Critérios utilizados na graduação de tumores mamários de cadela conforme grau de malignidade

Características	Pontuação
Formação tubular	
75% do tumor	1
10 a 75% do tumor	2
< 10% do tumor	3
Pleomorfismo nuclear	
Tamanho nuclear semelhante á célula normal	1
Moderado aumento e variabilidade	2
Grande variação	3
Índice mitótico	
0 a 8 mitoses	1
9 a 16 mitoses	2
17 ou mais mitoses	3

Fonte: modificado de ELSTON; ELLIS, 1993; CASSALI et al., 2014.

Alocação do grau tumoral

Foram utilizadas as áreas de invasividade dos CMT para classificá-los em Grau I, Grau II e Grau III (Tabela 3).

Tabela 3: Critérios utilizados na graduação de tumores mamários de cadela conforme o grau de malignidade.

Total de escore	Grau de malignidade	
3 – 5	I	Baixo Grau
6 – 7	II	Moderado
8 – 9	III	Alto Grau

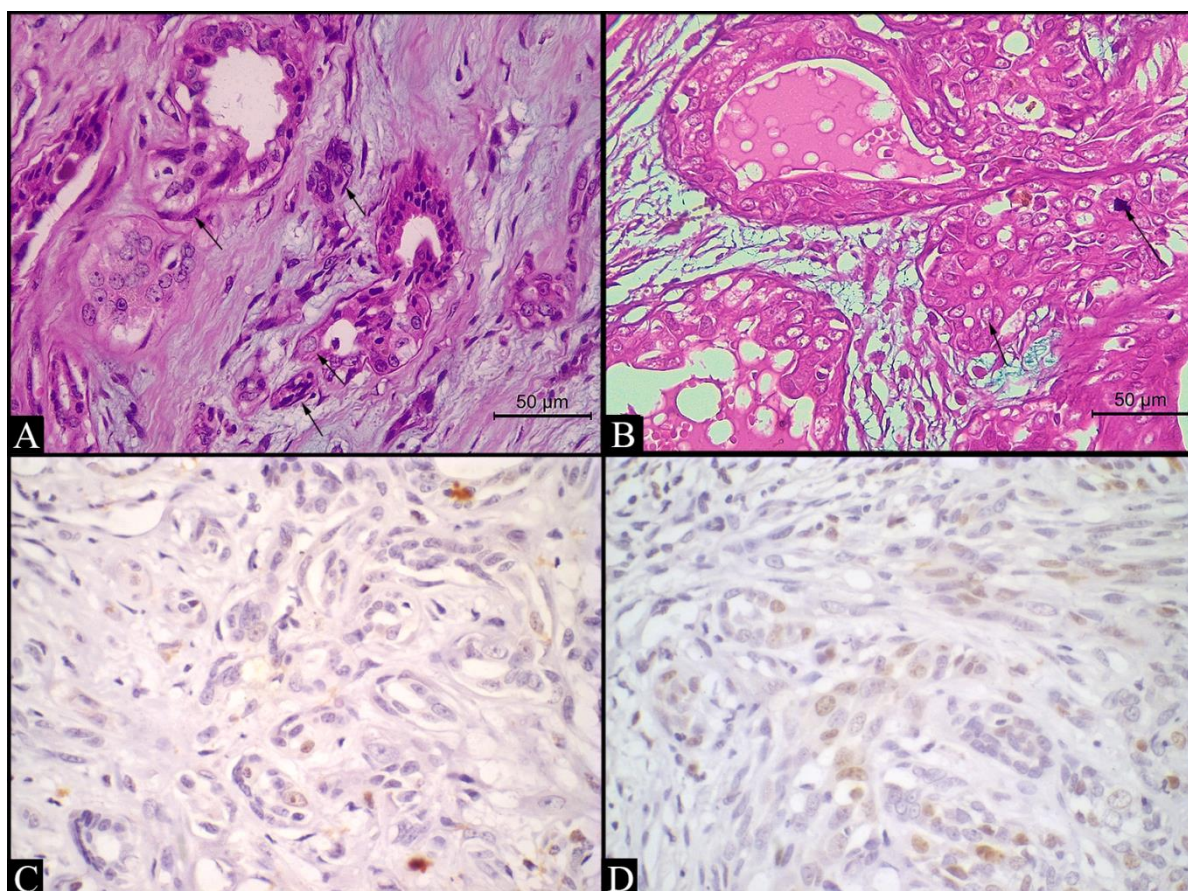
Fonte: modificado de ELSTON; ELLIS, 1993; CASSALI et al., 2014.

5.7. Avaliação do índice de proliferação por imuno-histoquímica (Ki-67)

Para avaliação do potencial proliferativo dos tumores foi utilizado o anticorpo anti-Ki-67 (Clone MIB-1, Immunotech/França, diluição 1:50, recuperação citrato, pH 6) em secções histológicas com 4µm, contendo fragmentos do tumor mamário. Foi utilizado kit comercial com sistema de amplificação polimérica (NovoL ink Max Polymer Detection System, LEICA®). Os reagentes foram aplicados pela técnica manual, com incubação overnight. Para os demais reagentes, o tempo foi de 30 minutos, com exceção do cromógeno DAB, que foi de dois minutos. Como controles positivos foram utilizadas amostras de mama previamente

testadas para avaliação do anticorpo e os controles negativos foram obtidos por substituição do anticorpo primário pelo soro normal (Figura 5).

Figura 5: Fotomicrografia, Carcinoma em Tumor Misto de mama, Grupo dos animais obesos:
A) Carcinoma em Tumor Misto Grau I, formação tubular e aglomerados de células epiteliais focais (setas) discretamente pleomórficas invadindo o estroma adjacente. 400x, HE. **B)** Carcinoma em Tumor Misto Grau II, formações de cordões e aglomerados de células epiteliais (setas), moderadamente pleomórficas invadindo o estroma adjacente com presença de mitose atípica (seta maior), 400x, HE. **C)** Carcinoma em Tumor Misto Grau I, imunomarcação nuclear de Ki-67, proliferação discreta; 400x, Hematoxilina de Harris. **D)** Carcinoma em Tumor Misto Grau II, imunomarcação nuclear de Ki-67, proliferação moderada, 400x, Hematoxilina de Harris.



Análise Morfológica e Morfométrica do Infiltrado Inflamatório Tumoral

A análise morfológica da rea o inflamatória associada ao tumor, quanto a sua distribui o e intensidade, foi realizada nos oito campos mais representativos (*“hotspots”*), com auxílio de um microscópio Olympus BX-41 (ocular 10X e objetiva de 40X), nas sec es histológicas de 4 m coradas pelo HE, segundo protocolo estabelecido por Estrela-Lima et al. (2010). A distribui o do infiltrado inflamatório foi classificada em: i) focal: presença de 1-3

focos inflamatórios; ii) multifocal: presença de mais de três focos inflamatórios e iii) difusa: presença de células inflamatórias uniformemente distribuídas na secção de tumor. A intensidade da reação inflamatória foi categorizada em três subgrupos (discreta, moderada ou intensa) com base na análise morfométrica do infiltrado inflamatório total.

Para a análise morfométrica após a identificação e marcação dos oito campos, foi realizada a captura de imagens em câmara digital Zeiss Axiocam/cc5 adaptada a um Microscópio Carl Zeiss Scope.A1, utilizando-se o software de captura Versão Zen 2012 (Blue Edition – Service Pack 1)[®] e o software Corel DRAW[®] versão X7 para análise das imagens. Linfócitos, macrófagos, plasmócitos, neutrófilos e eosinófilos foram identificados com base nas suas características morfológicas e quantificados nas imagens capturadas de secções coradas pela HE. O número total de células foi obtido pela soma dos oito campos analisados, sendo a média utilizada para determinar os intervalos de intensidade. O infiltrado inflamatório foi classificado em: i) discreto; ii) moderado e iii) intenso (Tabela 4).

Tabela 4. Intervalo de intensidade dos tipos celulares nos carcinomas mamários

Tipo celular	Intensidade		
	Discreta	Moderada	Intensa
Linfócito	$X < 300$	$300 \leq X < 600$	$x \geq 600$
Macrófago	$X < 200$	$200 \leq X < 400$	$x \geq 400$
Plasmócito	$X < 200$	$200 \leq X < 400$	$x \geq 400$
Neutrófilo	$X < 200$	$200 \leq X < 400$	$x \geq 400$
Eosinófilo	$X < 50$	$50 \leq X < 100$	$x \geq 100$
Total	$X < 500$	$500 \leq X < 1000$	$x \geq 1000$

Fonte: ESTRELA-LIMA, 2011.

5.8. Acompanhamento e sobrevida

Recomendou-se a realização de exames radiológicos, laboratoriais (hemograma, bioquímico – ureia, creatinina, ALT e FA) e clínicos. Os animais foram avaliados bimestralmente, até a finalização do estudo ou óbito pela doença. O tempo de sobrevida global foi definida como sendo o período em dias entre a exérese cirúrgica do tumor primário e a data de óbito pela doença.

Os animais que evoluíram para o óbito foram necropsiados no Laboratório de Patologia Veterinária/HOSPMEV-UFBA para determinação da *causa mortis* e detecção de possíveis metástases. Este procedimento foi realizado após autorização dos proprietários por escrito em formulário específico (Anexo 3).

5.9 Análise Estatística

Os dados foram agrupados da seguinte forma: metástase para linfonodos (sim ou não); estadiamento clínico (II, III, IV ou V); graduação histológica (I, II ou III); distribuição inflamatória (focal, multifocal ou difusa), intensidade inflamatória (discreta, moderada ou intensa), intensidade do infiltrado macrofágico (<400 ou ≥ 400), concentração de resistina (x/y) e índice proliferativo (Ki-67).

Para verificar a influência do status corpóreo e status reprodutivo em cadelas portadoras de carcinoma foram realizadas em duas fases. Na primeira fase as análises foram realizadas utilizando o procedimento GLINMIX do SAS (versão 9.2), sendo as variáveis categóricas utilizadas com efeito fixo no modelo estatístico representada por duas classificações, assim representadas por : status corporal (magra / sobrepeso e obesidade); carcinoma (presente / ausente) e status reprodutivo (castrada / não castrada) e a suas interação entre estes. Foram testadas as seguintes distribuições de probabilidade contínua em cada variável: exponencial, log-normal, Gamma, Weibull, distribuição t, inversa gaussiana e normal. Os critérios para obtenção do melhor ajuste relativo à estas distribuições foram o critério de máxima verossimilhança e a relação entre Chi-quadrado e graus liberdade, que foram melhores quanto maior a proximidade de 1. Para comparação entre as médias de máxima verossimilhança o p-valor de cada comparação foi conclusivo. Todas as análises foram conduzidas utilizando 0,05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I.

Na segunda fase foi avaliado perfil inflamatório, apenas em cadelas portadoras de carcinoma, por meio do procedimento GLINMIX do SAS (versão 9.2), sendo as variáveis status corpóreo (maga / sobrepeso e obesidade) e status reprodutivo (castrada / não castrada) e a interação entre estes considerados fixos no modelo estatístico.

Para Resistina foram avaliadas as relações das concentrações séricas desta adipocitocina (variável dependente) com peso corporal (variável independente). Estimou-se o coeficiente de determinação parcial da variável independente no modelo e se adotou o procedimento de seleção de equações ajustadas denominado stepwise (DRAPER; SMITH, 1981), utilizando o procedimento REG do SAS (versão 9.1). Apenas as variáveis significativas ($p < 0,05$) foram mantidas na composição do modelo matemático final.

As curvas de sobrevivência foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox) ou Cox na análise univariada ou multivariada, respectivamente e utilizando o software Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Em todos os casos, valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Parâmetros corporais das cadelas com CMT

Os métodos utilizados para aferição da condição corporal dos cães foram o peso, IMC_c (MULLER, 2008), medidas morfométricas e %GC (BURKHOLDER, 2000). Ao analisar o índice de massa corporal canina entre os animais magros e obesos, independentemente da condição reprodutiva e da presença ou não de CMT, houve diferença significativa ($p < 0,0001$) que demonstrou que os cães obesos apresentavam maior índice de massa corporal (Figura 6). Já ao correlacionar o status reprodutivo com o status corpóreo, foi possível observar diferenças significativas no peso ($p = 0,024$) (Figura 7) dos animais portadores de CMT castrados em relação aos inteiros. Tais dados ratificam os achados de literatura, que afirmam que cadelas castradas possuem maior predisposição à obesidade quando comparadas às não castradas (LAFLAMME, 2006; BLAND et al., 2010; MAO et al., 2013). A obesidade em cães castrados ocorre secundária à redução da taxa metabólica (GROSSELIN et al. 2007), principalmente em fêmeas, que naturalmente já apresentam menor metabolismo basal do que os machos (KIL, SWANSON, 2010), e é associada a várias neoplasias, inclusive o câncer de mama (TEOH; DAS, 2016).

Em mulheres, alguns mecanismos podem sugerir a correlação entre câncer de mama e obesidade: a baixa concentração de andrógenos observada em mulheres obesas (SHI et al. 2013); a produção de estrógeno, hormônio associado à carcinogênese mamária, secundário à

aromatização da androstenediona no tecido adiposo de mulheres após a menopausa (ENGIN, 2017; MULLOLY et al. 2017; HETEMAKI et al. 2017); a desregulação da sinalização da insulina, que ocasiona o desequilíbrio na proliferação celular, diferenciação, apoptose e expressão alterada de adipocinas (DJURIC, 2016) e o aumento de produção de radicais livres pelo tecido adiposo que induz estresse oxidativo e eleva a produção de marcadores pró-inflamatórios, mantendo um estado de inflamação crônica no organismo (FURUKAWA et al. 2004).

A associação direta dos hormônios sexuais femininos, especialmente o estrógeno, no desenvolvimento dos tumores mamários em cadelas, sugere a supressão hormonal pela realização de ovariossalpingohisterectomia (OSH) como tratamento adjuvante das neoplasias de mama (DALECK, 2000). Além disso, a realização da OSH após o primeiro estro é recomendada com o intuito de permitir completo desenvolvimento musculoesquelético, imunológico e endócrino, reduzindo riscos de comorbidades secundárias à privação dos hormônios ovarianos (CASSALI et al., 2014). Visto que a obesidade é um fator de risco para promoção e progressão de nódulos mamários, principalmente em cadelas castradas, faz-se necessário o controle de peso corporal nessas pacientes com eficaz manejo alimentar. Desta forma, conforme descrito por German (2006), o número de refeições diárias, a quantidade de alimento oferecido por refeição e o fornecimento de petiscos, por exemplo, são práticas alimentares envolvidas no ganho de peso que precisam ser monitoradas.

Figura 6: Representação gráfica de análise comparativa em relação ao IMC e a condição corporal das cadelas portadoras de CMT e grupo controle, independentemente da condição reprodutiva.

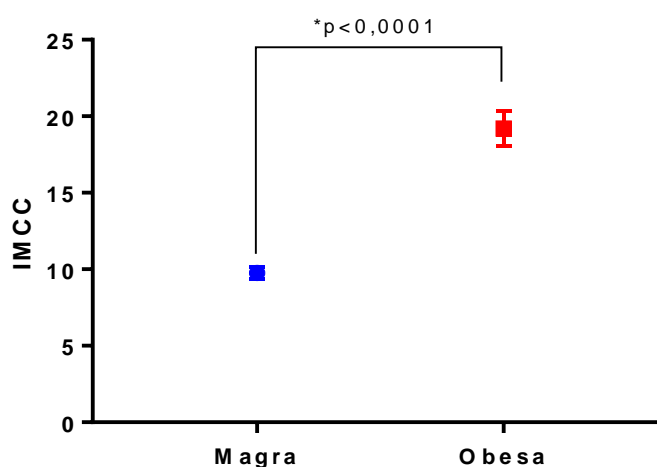
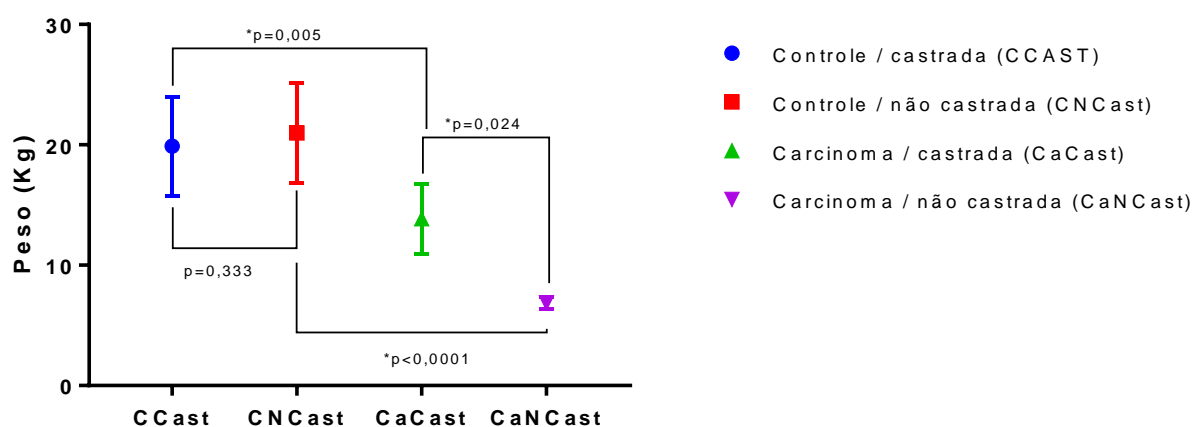


Figura 7: Representação gráfica de análise comparativa em relação ao peso e à condição reprodutiva das cadelas portadoras de CMT e grupo controle.



Ao comparar a porcentagem de gordura corporal entre os grupos controle e portadores de CMT, baseado na condição corpórea, foi observada diferença significativa entre as cadelas de peso normal e as obesas portadoras de carcinoma, sendo as obesas com maior %GC ($p < 0,001$) (Figura 8). Houve diferença significativa ($p = 0,003$), também, entre as cadelas magras do grupo controle em comparação às magras com CMT, na qual os animais do grupo controle apresentavam maior %GC. Um comportamento similar foi observado ao correlacionar o IMC das cadelas do grupo controle e as do grupo com CMT, sendo estas as com menor índice de massa corporal (Figura 9). O menor peso, menor %GC e IMC observados nos animais portadores de CMT, independentemente da condição reprodutiva, quando comparados ao grupo controle, pode ser justificado pelo catabolismo promovido pelas células neoplásicas nesses pacientes.

Figura 8: Representação gráfica de análise comparativa em relação à %GC e à condição corporal das cadelas portadoras de CMT e grupo controle, independentemente da condição reprodutiva.

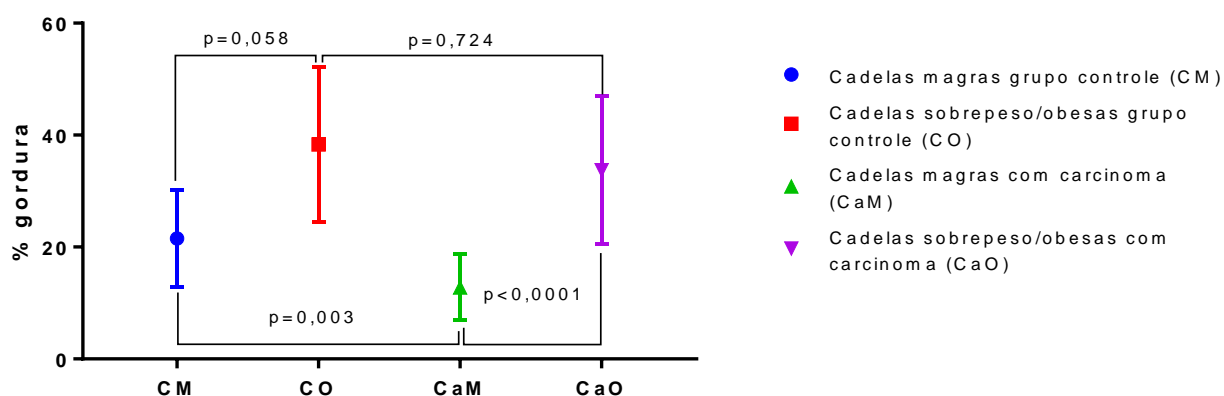
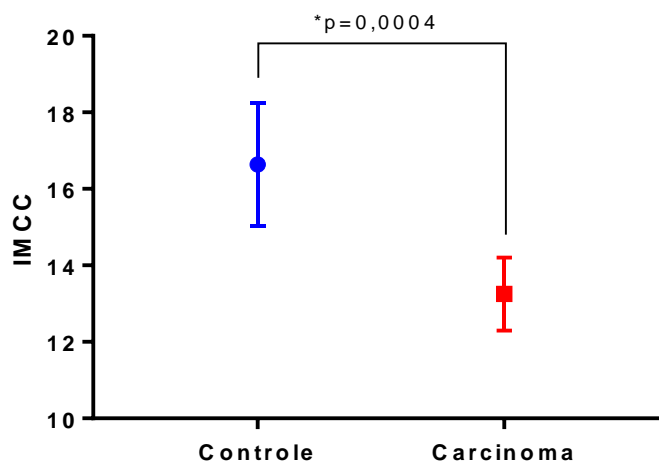


Figura 9: Representação gráfica de análise comparativa em relação ao IMC das cadelas do grupo controle e as do grupo com CMT, independentemente da condição reprodutiva.



Ao contrário do observado ao avaliar a influência do peso nas cadelas castradas, observou-se fraca correlação entre as variáveis IMC e as condições reprodutivas. Uma possível razão aventada para justificar este resultado é a conformação anatômica das cadelas. A estatura é o parâmetro para avaliação do índice de massa corporal canino. Em raças curvilíneas, por exemplo, a altura e comprimento são as medidas morfométricas que predominam. Portanto, essa medida em função do tamanho do animal não é fidedigna. É importante ressaltar, ainda, que não existe uma avaliação universal padrão para mensurar sobrepeso e obesidade canina.

Na tabela 5, as cadelas portadoras de CMT foram subdivididas em dois grupos de acordo com o status corpóreo das mesmas, correlacionados com o estadiamento clínico (TNM), graduação histológica tumoral e status reprodutivo. Ao avaliar o estadiamento clínico desses animais, foi possível observar que o grupo sobrepeso/obeso apresentava maior número de indivíduos com neoplasia de tamanho maior que cinco centímetros quando comparado com o grupo de peso normal. Este dado observado reforça o relatado por alguns autores, que correlacionam positivamente o excesso de peso com o desenvolvimento tumoral em cadelas (PELETEIRO, 1994; SORENMO et al., 2000; SIRIVAIDYAPONG, 2003), bem como relatado em mulheres obesas com tumores de mama, que tendem a apresentar maior crescimento tumoral (STEWART; HEPPNER, 1997). Quanto à graduação histológica das neoplasias, o grau de ambos os grupos foi similar.

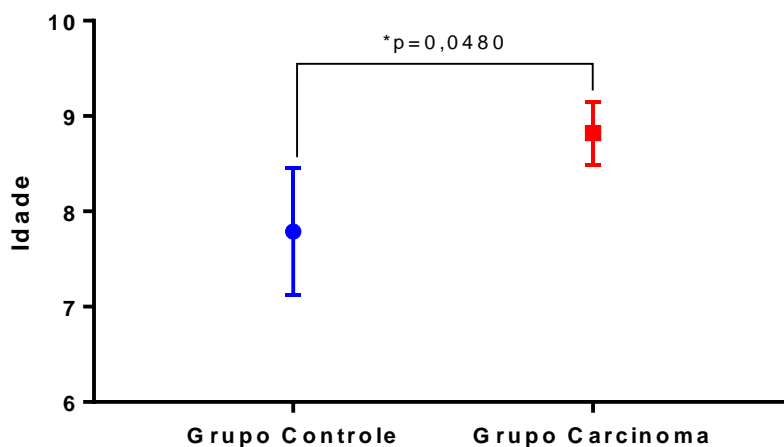
A análise do status reprodutivo revelou, dentro do grupo controle de animais obesos/sobrepeso, nove cadelas castradas e seis não castradas, enquanto no grupo controle de peso normal, 10 cadelas castradas e cinco não castradas.

Tabela 5: Estadiamento clínico, graduação histológica e status reprodutivo das 30 cadelas portadoras de CMT, subdivididas em grupo Sobrepeso/obeso e Peso normal, atendidas no HOSPMEV-UFBA no período de março de 2016 a fevereiro de 2018.

Grupo	Estadiamento	Graduação	Status Reprodutivo
Sobrepeso/obeso (n=15)	I (n=2)	I (n=7)	Castradas (n=9)
	II (n=3)		
	III (n=7)	II (n=8)	Não castradas (n=6)
	IV (n=3)		
Peso normal (n=15)	I (n=4)	I (n=8)	Castradas (n=10)
	II (n=5)		
	III (n=3)	II (n=7)	Não castradas (n=5)
	IV (n=3)		

Com relação à idade de todas as subcategorias, foi observada diferença significativa entre o grupo de cadelas com carcinoma e o grupo controle, na qual os animais portadores de CMT possuíam idade maior ($p=0,0480$) (Figura 10). Os resultados do presente estudo, assim como a maioria dos relatos anteriores, indicam maior acometimento de cadelas adultas próximo à senilidade (RIBEIRO et al., 2009; CASSALI et al., 2014; KIM et al., 2017), embora ainda não existam estudos na medicina veterinária que demonstrem diferenças consistentes no prognóstico de animais com base na idade (PHILIBERT et al., 2003). Entretanto, na medicina humana, mulheres mais jovens portadoras de neoplasias possuem pior prognóstico (PAMAR, 2018).

Figura 10: Representação gráfica da faixa etária das cadelas do grupo controle e das portadoras de CMT



6.2 RESISTINA

Foram observadas diferenças significativas nos valores de resistina entre os subgrupos ($p < 0,0001$), independentemente do status reprodutivo. Valores superiores de resistina são encontrados no grupo de cadelas com sobrepeso/obesas portadoras de CMT (Figura 11). Este resultado corrobora os descritos na literatura, que indicam hiperresistinemia em mulheres acima do peso que apresentem neoformação mamária (KURYSZKO et al., 2016; LAUBY-SECRETAN et al., 2016; GUI et al., 2017; WANG et al., 2017; MALVI et al., 2018). Pouco se sabe sobre essa correlação em cães (O'NEILL et al., 2012; MANKOWSKA et al., 2015), mas acredita-se que os mecanismos envolvidos sejam os mesmos observados em humanos (WAKSHLAG et al., 2011).

Resultados interessantes e significativos com relação ao aumento nas concentrações de resistina também são observados no grupo de cadelas portadoras de CMT, independentemente da condição corporal, em relação ao grupo controle ($p = 0,0002$) (Figura 12). O mesmo é observado em humanos acometidos por processos neoplásicos, os quais apresentam aumento importante de resistina sérica (Gui et al., 2017; Malvi et al., 2018). Sun et al. (2010) e Li e Han (2018) relatam maior resistinemia em mulheres com tumor de mama quando comparadas a pacientes saudáveis, bem como constatado no presente estudo. Dalamaga et al. (2013) realizaram uma análise epidemiológica com mulheres que apresentaram câncer de mama e também observaram concentrações resistínicas séricas

significativamente maiores em pacientes que apresentavam neoplasia quando comparado com pacientes do grupo controle. Desta forma, as referidas informações fundamentam os resultados de resistina encontrados nas cadelas obesas com CMT.

Cerca 20% dos cães obesos não portadores de neoplasias desenvolvem distúrbios semelhantes a síndrome metabólica observada nos humanos (TVARIJONAVICIUTE et al., 2016), grupo de desordens que cria um ambiente com alta concentração de estrógeno, citocinas inflamatórias, a exemplo da IL-6 e TNF α e algumas adipocitocinas envolvidas na carcinogênese (TROPF et al., 2017). Esta condição justifica a correlação do grau de malignidade, tamanho tumoral e presença de metástase frente a valores elevados de resistina nos pacientes com sobrepeso (WANG et al., 2017; AKINEYMIJU et al., 2018; PATRICIO et al., 2018).

Figura 11: Representação gráfica da concentração sérica de resistina em cadelas com carcinoma mamário do grupo de condição corporal normal e obesas.

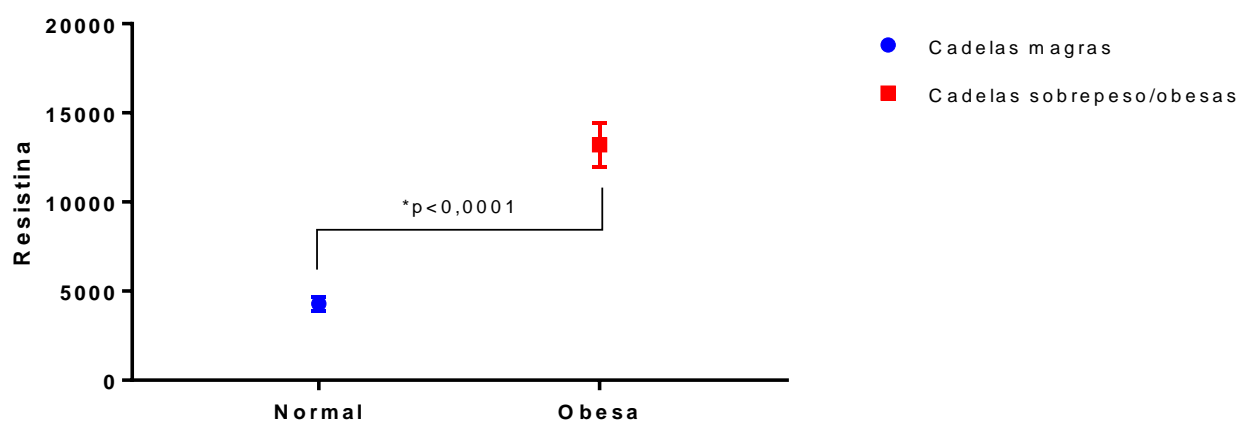
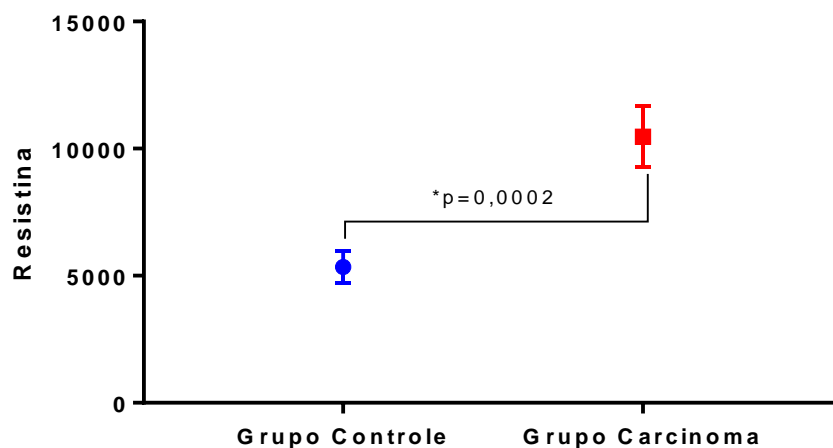


Figura 12: Representação gráfica da concentração sérica de resistina em cadelas com carcinoma mamário e do grupo controle.



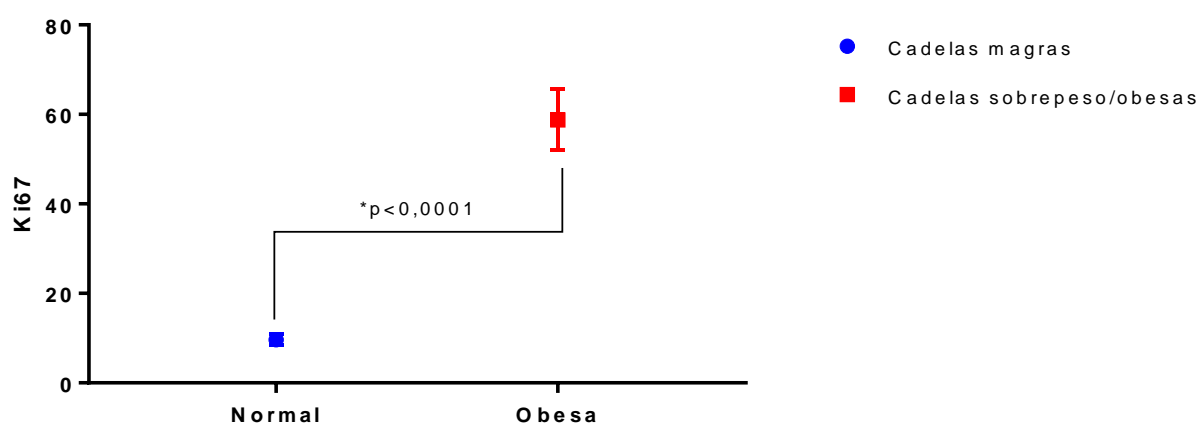
6.3 ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO (KI-67)

Ao comparar o índice de proliferação dos tumores, por imuno-histoquímica (Ki-67) nas cadelas portadoras de CMT, foi observada diferença significativa entre os grupos de acordo com o status corporal ($p < 0,0001$). Foi observado maior número de células marcadas no grupo de animais obesos (Figura 13), de forma interessante, trata-se do mesmo grupo que obteve maiores concentrações de resistina. Assim como observado por Nattenmuller e colaboradores (2018), em análise do potencial infiltrativo em mulheres obesas pós-menopáusicas com neoplasia mamária, os dados obtidos no presente estudo sugerem que a obesidade em cadelas também atue no potencial de malignidade via Ki-67.

O potencial proliferativo se apresenta significativamente aumentado em lesões malignas em comparação às benignas (VERMA et al., 2018) e, em pesquisa realizada por Saad et al. (2017), 85% dos cães com CMT apresentavam alto índice de Ki-67. O fator obesidade, por si só, é apontado como condição desencadeante de neoplasias de maior malignidade em humanos (ASSIRI et al., 2015; MORRIS; EDWARDS, 2018). Além disso, é precursor da liberação de adipocitocinas de características angiogênicas a partir dos adipócitos (LI; HAN, 2018; MALVI et al., 2018), como a resistina (WANG et al., 2017). Por conseguinte, embora o mecanismo exato pelo qual a obesidade pode levar ao aumento do índice proliferativo seja pouco compreendido, acredita-se que a própria desregulação de síntese de adipocitocinas angiogênicas possa estar associada (BELARDI et al., 2013). Frente

a esses dados, sugere-se que a hiperresistinemia, além de estar correlacionada a maiores IMC, eleva consigo de forma proporcional a taxa de proliferação celular, o que justifica o pior prognóstico encontrado nesses casos.

Figura 13: Comparação do índice de proliferação por imuno-histoquímica (Ki-67) nos carcinomas mamários de cadelas atendidas no HOSPMEV, no período de março de 2016 a fevereiro de 2018, com relação ao status corporal.



6.4 INFLAMAÇÃO

A análise morfológica do infiltrado inflamatório associado ao tumor, independentemente do grupo, revelou predominância de resposta linfo-histiocitária com distribuição multifocal e intensidade variando de moderada a intensa. A avaliação do infiltrado inflamatório presente no microambiente tumoral, em especial nos tumores mamários, tem despertado grande interesse na oncologia humana e, atualmente, também na veterinária. Acredita-se que, a depender dos tipos e subtipos celulares envolvidos e da intensidade da inflamação, observam-se diferentes funções na progressão ou regressão tumoral, na resposta ao tratamento, bem como, nas taxas de sobrevida (ESTRELA-LIMA et al., 2010; HEYS et al., 2012; KIM et al., 2012; SAEKI et al., 2012).

Por seu turno, a análise morfométrica revelou, no grupo de cadelas com status corpóreo normal, intenso infiltrado linfocítico seguido por macrófagos, enquanto no grupo com sobrepeso/obeso o inverso foi observado. Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Figura 14/Tabela 6). Os macrófagos representam um componente importante da população geral de leucócitos associados a vários tipos neoplásicos em humanos e possuem capacidade de promover invasão e migração de células tumorais

(RAPOSO et al., 2015). Em cadelas, os macrófagos são as primeiras células a responderem ao estímulo neoplásico e representam o segundo tipo celular mais frequente nos infiltrados inflamatórios associados aos carcinomas mamários, superados apenas pelos linfócitos (ESTRELA-LIMA et al., 2010).

Monteiro et al. (2018), descreveram maior contagem de macrófagos em tumores mais agressivos e sugerem maior concentração no CMT apenas quando relacionada à sua progressão para malignidade, a exemplo dos tumores observados no grupo sobrepeso/obeso, cuja graduação histológica predominante foi II. Soma-se o fato deste grupo possuir concentração de resistina significativamente maior, situação que, segundo Zuniga et al. (2017), exacerba a resposta inflamatória dos macrófagos.

Contudo, a função dos macrófagos infiltrantes nos carcinomas mamários caninos ainda não está totalmente estabelecida, pois transcende a presença de correlação numérica e depende diretamente do seu status de ativação (M1 ou M2). Vieira-Filho (2015) demonstrou, a partir da imunomarcagem dos macrófagos infiltrantes no tumor, maior porcentagem de macrófagos pró-inflamatórios (M1) no grupo de animais sem metástase, sugerindo o efeito antitumoral destas células, enquanto os macrófagos anti-inflamatórios (M2) foram predominantes nos animais portadores de metástase, contribuindo, assim, para a progressão tumoral e o desenvolvimento metastático. Da mesma forma, nos carcinomas mamários das mulheres o infiltrado inflamatório relacionado a uma melhor resposta à quimioterapia apresentava infiltrado macrofágico do tipo pró-inflamatório. Enquanto que a pior sobrevida esteve relacionada ao infiltrado de macrófagos anti-inflamatórios (MANTOVANI et al., 2002; HEYS et al., 2012; SHAN DENG et al., 2012).

Figura 14: Série imunológica das cadelas portadoras de carcinoma atendidas no HOSPMEV-UFBA em relação ao status corporal.

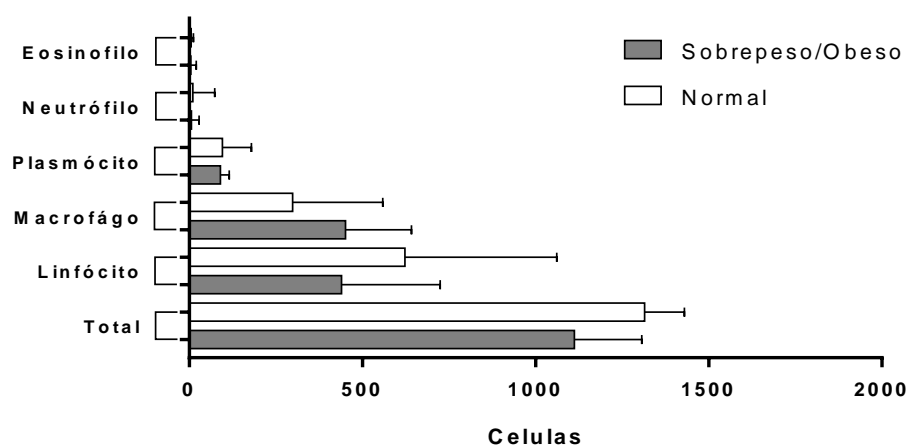


Tabela 6. Série imunológica das cadelas portadoras de carcinoma atendidas no HOSPMEV-UFBA em relação ao status corporal

	Obesa	Intensidade	Normal	Intensidade	p-value
Eosinófilo	4,50 ± 9,87	Discreta	5,00 ± 5,75	Discreta	0,8533
Neutrófilo	6,50 ± 13,75	Discreta	10,50 ± 36,62	Discreta	0,5844
Plasmócito	89,50 ± 26,40	Discreta	95,50 ± 70,40	Discreta	0,7330
Macrófago	451,00 ± 130,75	Intensa	298,50 ± 167,25	Moderada	0,1007
Linfócito	439,50 ± 296,15	Moderada	622,50 ± 385,10	Intensa	0,0715
Total	1112,00 ± 264,00		1315,00 ± 291,25		0,1963

Teste estatístico de Mann Whitney

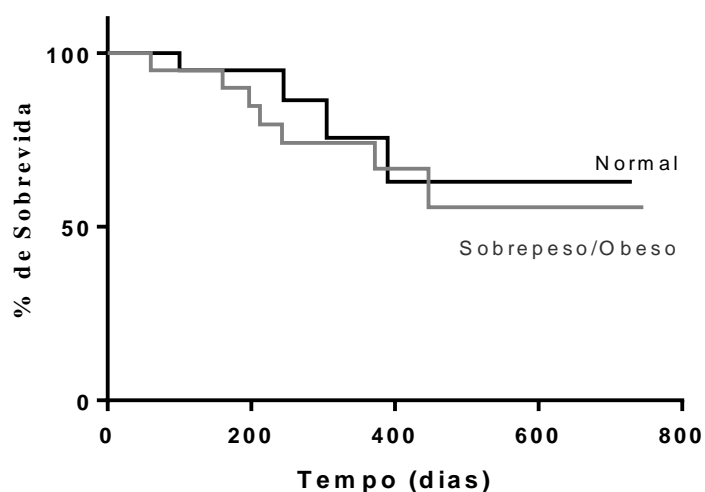
*Diferenças significativas ao nível de 5%

6.5 COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE SOBREVIDA

A sobrevida mínima após a cirurgia foi de 60 dias, atribuído ao animal do grupo sobrepeso/obeso que evoluiu para o óbito devido à embolia gordurosa. O período máximo de sobrevida foi de 746 dias, após mastectomia, atribuído ao animal do grupo das cadelas com peso normal. Com base nas curvas de sobrevida dos grupos avaliados, não foram constatadas diferenças ao comparar cadelas de peso normal em relação aos animais do grupo sobrepeso/obeso ($p=0,5822$) (Figura 15). Nenhum dos dois grupos atingiu a mediana, ou seja, mais de 50% dos animais vivos em ambos os grupos. Este resultado difere dos achados de Maliniak et al. (2018), que avaliaram mulheres com neoplasias mamárias e observaram menor

taxa de sobrevida, além de pior fator prognóstico, nas que possuíam maior peso corporal. Liu e colaboradores (2017) também fizeram a mesma comparação entre pacientes portadoras de tumor de mama e constataram menor tempo de sobrevida no grupo de mulheres sobrepeso. Desta forma, aparentemente o fato de todas as pacientes possuírem carcinoma em tumor misto, neoplasia com potencial de malignidade variável, mas considerada de evolução frequentemente lenta e, neste estudo, com muitos tumores alocados no Grau I, influenciou positivamente na taxa de sobrevida.

Figura 15: Comparação das curvas de sobrevida das cadelas de peso normal em relação ao grupo sobrepeso/obeso.



Ao comparar dentro do grupo de cadelas com sobrepeso baseado no status reprodutivo, não houve diferença entre as curvas de sobrevida ($p=0,0622$) (Figura 16). A mediana de sobrevida das cadelas castradas foi de 447 dias, não foi possível definir a sobrevida mediana do grupo dos animais não castrados. Quanto à comparação entre as cadelas de peso normal, não foi observada diferença entre as curvas de sobrevida em relação ao status reprodutivo (Figura 17) ($p=0,8630$).

Figura 16: Comparação das curvas de sobrevida das cadelas do grupo sobrepeso/obeso em relação ao status reprodutivo.

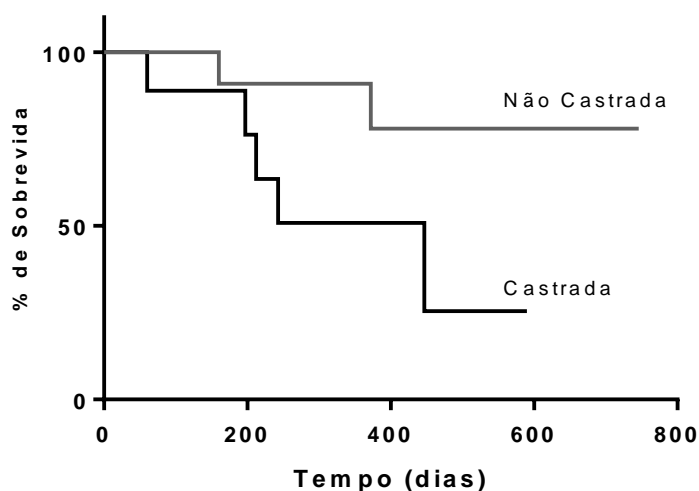
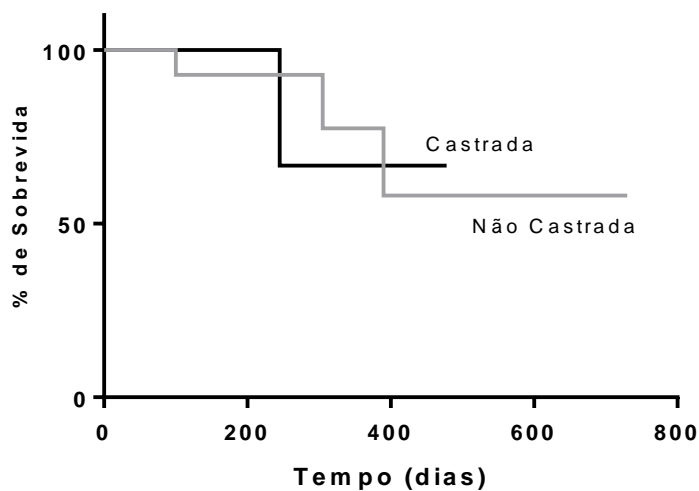


Figura 17: Comparação das curvas de sobrevida das cadelas do grupo de peso ideal em relação ao status reprodutivo.



A comparação entre as curvas de sobrevida das cadelas magras em relação ao grau histológico dos CMT (GI ou GII) não evidenciou diferença ($p=0,1543$) (Figura 18). Quanto à avaliação entre as curvas de sobrevida das cadelas sobrepeso/obesas portadoras de CMT baseado no grau (grau I [G1] e grau II [GII]), também não foi observada diferença ($p=1,949$) (Figura 19), entretanto o grupo de GII alcançou a mediana. A graduação tumoral observada nestas cadelas utilizadas no presente estudo (GI e GII) difere dos resultados obtidos por Lim et al. (2015), que observaram a proporção de tumores pouco diferenciados (grau III) significativamente maior em cadelas obesas.

Análise univariada e multivariada

Analisando a influência dos parâmetros, com relação ao desfecho óbitos ou sobrevivência, de forma uni e multivariada, observa-se que os níveis de Ki-67 ($p=0,024$), estadiamento ($p=0,004$) e grau ($p=0,016$) influenciam de forma isolada na sobrevivência das cadelas. Multifatorialmente, os parâmetros índice de proliferação (Ki-67) ($p=0,044$) e estadiamento ($p=0,036$) influenciam na sobrevida (Tabela 7).

Tabela 7. Análise univariada e multivariada de parâmetros associados a ocorrência de óbito em cadelas portadoras de carcinoma atendidas no HOSPMEV no período de março de 2016 a fevereiro de 2018.

Parâmetros	Univariada ^a	Multivariada
IMCC	0,267	0,458
Níveis de Ki-67	0,024*	0,044*
Idade	0,816	0,792
Níveis de resistina	0,28	0,747
% de gordura	0,154	0,166
Status corporal	0,254	0,586
Tamanho do tumor	0,063	0,127
Status reprodutivo	0,206	0,659
Estadiamento	0,004*	0,036*
Grau	0,016*	0,213
Linfócito	0,339	0,402

a Correlação de Spearman

b Regressão logística binária

* Diferenças significativas a 5%

Os resultados observados nas cadelas portadoras de CMT sugerem a ação direta do status corporal nas concentrações de resistina, na progressão tumoral, pior prognóstico e menor sobrevida.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo, nas condições metodológicas empregadas, permitiram concluir:

- ✓ As concentrações séricas de resistina em cadelas portadoras de carcinomas em tumor misto de mama foram significativamente maiores nas de maior peso corporal;
- ✓ Maiores concentrações de resistina foram encontradas no grupo portador de CMT em comparação ao grupo controle;
- ✓ A resistinemia demonstrou ser diretamente proporcional ao potencial proliferativo (Ki-67) dos tumores no grupo de animais obesos portadores de CMT;
- ✓ O macrófago é o tipo celular mais frequente em cadelas obesas portadoras de CMT e possivelmente colabora para elevar as concentrações de resistina, a exemplo do observado em mulheres.

8. REFERÊNCIAS

AKINYEMIJU, T.; MOORE, J. X.; JUDD, S. E.; PISU, M.; GOODMAN, M.; HOWARD, V. J.; LONG, L.; SAFFORD, M.; GILCHRIST, S. C.; CUSHMAN, M. Pre-diagnostic biomarkers of metabolic dysregulation and cancer mortality. **Oncotarget**, v. 23, n. 9, p. 16099-16109, 2018.

APTEKMANN, K. P.; SUHETT, W. G.; JUNIOR, A. F. M.; SOUZA, G. B.; TRISTÃO, A. P. P. A.; ADAMS, F. K.; AOKI, C. G.; JUNIOR, R. J. G. P.; CARCIOFI, A. C.; TINUCCI-COSTA, M.; Nutritional and environment aspects of canine obesity. **Ciência Rural**, v. 44, n. 11, p. 2039-2044, 2014.

ARAUJO, M. R.; CAMPOS, L. C.; DAMASCENO, K. A.; GAMBA, C. O.; FERREIRA, E.; CASSALI, G. D. HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 expression in lymph node metastasis of canine mammary carcinomas: Association with clinical-pathological parameters and overall survival. **Research Veterinary Science**, v. 106, p. 121-130, 2016.

ASSIRI, A. M.; KAMEL, H. F.; HASSANIEN, M. F. Resistin, visfatin, adiponectin, and leptin: risk of breast cancer in pre- and postmenopausal Saudi females and their possible diagnostic and predictive implications as novel biomarkers. **Disease Markers**, v. 2015, p. 9, 2015.

BADOER, E.; KOSARI, S.; STEBBING, M. J. Resistin, an Adipokine with Non-Generalized Actions on Sympathetic Nerve Activity. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. 321, p. 1-9, 2015.

BALISTERI, C. R.; CARUSO, C.; CANDORE, G. The Role of Adipose Tissue and Adipokines in Obesity-Related Inflammatory Diseases. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, 2010.

BARBOSA, A. R.; SANTARÉM, J. M.; JACOB-FILHO, W.; MEIRELES, E. S.; MARUCCI, M. F. N. Comparação da gordura corporal de mulheres idosas segundo antropometria, bioimpedância e DEXA. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 51, n. 1, p. 49-56, 2001.

BELARDI, V.; GALLAGHER, E. J.; NOVOSYADLYY, R. et al. Insulin and IGFs in obesity-related breast cancer. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 18, p. 277-89, 2013.

BERTAGNOLLI, A. C.; FERREIRA, E.; DIAS, E. J.; CASSALI, G. D. Canine mammary mixed tumours: immunohistochemical expressions of EGFR and HER-2. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. 8, p. 312-317, 2011.

BLAND, I. M.; GUTHRIE-JONES, A.; TAYLOR, R. D.; HILL, J. Dog obesity: veterinary practices and owners opinions on cause and management. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 94, p. 310-315, 2010.

BRUNETTO, M. A.; NOGUEIRA, S.; SÁ, F. C.; PEIXOTO, M.; VASCONCELLOS, R. S.; FERRAUDO, A. J.; CARCIOFI, A. C. Correspondência entre obesidade e hiperlipidemia em cães. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.41, n.2, p.266-271, 2011.

BURKHOLDER, W. J.; TOLL, P.W. Obesity. In: Hand MS. et al. Small animal of clinical nutrition. 4.ed. Kansas: Mark Morres Institute. p.401-430, 2000.

BYERS, T.; SEDJO, R. L. Body fatness as a cause of cancer: epidemiologic clues to biologic mechanisms. **Endocrine Related Cancer**, v. 22, n. 3, p. 25–34, 2015.

CALLE, E. E.; RODRIGUEZ, C.; WALKER-THURMOND, K.; THUN, M. J. Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 17, p. 1625-1628, 2003.

CAMPFIELD, L. A.; SMITH, F. J.; GUISEZ, Y.; DEVOS, R.; BURN, P. Recombinant Mouse OB Protein: Evidence for a Peripheral Signal Linking Adiposity and Central Neural Networks. **Science**, v. 269, p. 546-549, 1995.

CASSALI, G. D.; DAMASCENO, K. A.; BERTAGNOLLI, A. C.; et al. Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors: benign mixed tumors, carcinomas in mixed tumors and carcinosarcomas. **Brazil Journal of Veterinary Pathology**, v. 10, n. 3, p. 87-99, 2017.

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; FERREIRA, E.; et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine mammary Tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 7, n. 2, 2014.

CATALAN, V.; GOMEZ-AMBROSI, J.; RODRIGUEZ, A.; RAMIREZ, B.; SILVA, C.; ROTELLAR, F. Up-regulation of the novel proinflammatory adipokines lipocalin-2, chitinase-3 like-1 and osteopontin as well as angiogenic-related factors in visceral adipose tissue of patients with colon cancer. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, p. 634–641, 2011.

CLEARY, M. P. Impact of obesity on development and progression of mammary tumors in preclinical models of breast cancer. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 18, p. 330-343, 2013.

CLELAND, W. H.; MENDELSON, C. R.; SIMPSON, E. R. Effects of aging and obesity on aromatase activity of human adipose cells. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.60, n.1, p. 174-177, 1985.

CODOÑER-FRANCH, P.; ALONSO-IGLESIAS, E. Resistin: insulin resistance to malignancy. **Clinica Chimica Acta**, v. 438, p. 46 –54, 2015.

CONDE, J.; SCOTECE, M.; GOMEZ, R.; LOPEZ, V.; GOMEZ-REINO, J. J.; LAGO, F.; GUALILLO, O. Adipokines: biofactors from white adipose tissue. A complex hub among inflammation, metabolism, and immunity. **Biofactors**, v. 37, p. 413–420, 2011.

COURTEN, B. V.; DEGAWA-YAMAUCHI, M.; CONSIDINE, R. V.; TATARANNI, P. A. High Serum Resistin Is Associated With an Increase in Adiposity But Not a Worsening of Insulin Resistance in Pima Indians. **Diabetes**, v. 53, p. 1279-1284, 2004.

CRISOSTOMO, J.; MATAFOME, P.; SANTOS-SILVA, D.; GOMES, A. L.; GOMES, M.; PATRICIO, M.; LETRA, L.; SARMENTO-RIBEIRO, A. B.; SANTOS, L.; SEIÇA, R. Hyperresistinemia and metabolic dysregulation: the close crosstalk in obese breast cancer. **Endocrine**, v. 53, n. 2, p. 433-42, 2016.

DAI, M. H.; XIA, T.; CHEN, X. D.; GAN, L.; FENG, S. Q.; QIU, H.; PENG, Y.; YANG, Z. Q. Cloning and characterization of porcine resistin gene. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 30, p. 88-97, 2006.

DALAMAGA, M.; SOTIROPOULOS, G.; KARMANIOULAS, K.; PELEKANOS, N.; PAPADAVID, E.; LEKKA, A. Serum resistin: a biomarker of breast cancer in postmenopausal women? Association with clinicopathological characteristics, tumor markers, inflammatory and metabolic parameters. **Clinical Biochemistry**, v. 46, p. 584 – 590, 2013.

DE-PERGOLA, G.; SILVESTRIS, F. Obesity as a major risk factor for cancer. **Journal of Obesity**, v. 2013, 2013.

DJURIC, Z. Obesity-associated cancer risk: the role of intestinal microbiota in the etiology of the host pro-inflammatory state. **Translational Research**, v. 179, p. 155-167, 2017.

DIZDAR, O.; ALYAMAC, E. 2004 Obesity: an endocrine tumor? **Medical Hypotheses**, v. 63, p. 790–792, 2004.

DRAPER, N. R.; SMITH, H. Applied regression analysis. 2.ed. New York: John Wiley, 1981, 709p.

ELSTON, E. W.; ELLIS, I. O. Method for grading breast cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 46, n. 2, p. 189-190, 1993.

ENGIN, A. Obesity-associated Breast Cancer: Analysis of risk factors. **Advance in Experimental Medicine and Biology**, v. 960, p. 571-606, 2017.

ESTRELA-LIMA, A.; ARAÚJO, M. S.; COSTA-NETO, J. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; BARROUIN-MELO, S. M.; CARDOSO, S. V.; MARTINS-FILHO, O. A.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. **BMC Cancer**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2010.

ESTRELA LIMA, A.; ARAUJO, M. S. S.; COSTA-NETO, J. M.; et al. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. **BMC Cancer**, v. 10, p. 256, 2011.

FAZENDA, M. I. N. **Estudo da relação entre a obesidade e a hipertensão em cães**. 2009, 119p. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Portugal.

FERREIRA, E.; BREGUNCI, G. C.; SCHMITT, F. C.; CASSALI, G. D. Protocol for the anatomopathological examination of canine mammary tumors. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria Zootecnia**, v. 55, p. 105-109, 2003.

FISCHER-POSOVSZKY, P.; WABITSCH, M.; HOCHBERG, Z. Endocrinology of Adipose Tissue - An Update. **Endocrinology of Adipose Tissue...Horm Metab Res**, v. 39, p. 314-321, 2007.

FURUKAWA, S.; FUJITA, T.; SHIMABUKURO, M. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752-1761, 2004.

GENELHU, M. C. L. S.; CARDOSO, S. V.; GOBBI, H.; CASSALI, G. D. A comparative study between mixed-type tumours from human salivary and canine mammary glands. **BMC Cancer**, v. 7, p. 218, 2007.

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

GEORGIU, G. P.; PROVATOPOULOU, X.; KALOGERA, E.; SIASOS, G.; MENENAKOS, E.; ZOGRAFOS, G. C.; GOUNARIS, A. Serum resistin is inversely related to breast cancer risk in premenopausal women. **Breast**, v. 29, p. 163-169, 2016.

GOODSON, W. H.; MOORE, D. H.; LJUNG, B-M.; CHEW, K.; MAYALL, B. The prognostic value of proliferation indices: a study with in vivo bromodeoxyuridine and Ki-67. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 59, p. 113-123, 2000.

GRAVES, T. K. The endocrinology of obesity. In: International SCIVAC Congress, 2010, **Proceedings...**, Rimini, Italy.

GROSSELIN, J.; WREN, J. A.; SUNDERLAND, S. L. Canine obesity: An overview. **Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 30, p. 1-10, 2007.

GUI, Y.; PAN, Q.; CHEN, X.; XU, S.; LUO, X.; CHEN, L. The association between obesity related adipokines and risk of breast cancer: a meta-analysis. **Oncotarget**, v. 13, n. 43, p. 75389-75399, 2017.

GUIMARÃES, P. L. S. N. **Conformação corporal e bioquímica sanguínea de cadelas adultas castradas alimentadas ad libitum**, 2009. 71p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia

HARVEY, A. E.; LASHINGER, L. M.; HURSTING, S. D. The growing challenge of obesity and cancer: an inflammatory issue. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 2011, p. 45–52, 2011.

HAUSMAN, D.B.; DIGIROLAMO, M.; BARTNESS, T. J.; HAUSMAN, G. J.; MARTIN, R. J. The biology of white adipocyte proliferation. **Obesity Reviews**, v. 2, p. 239–54, 2001.

HENEGAR, J. R.; ZHANG, Y.; DE-RAMA, R.; HATA, C.; HALL, M. E.; HALL, J. E. Catheter-based radiofrequency renal denervation lowers blood pressure in obese hypertensive dogs. **American Journal of Hypertension**, v.27, n.10, p. 285-92, 2014

HETEMÄKI, N.; SAVOLAINEN-PELTONEN, H.; TIKKANEN, M.J. Estrogen Metabolism in Abdominal Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue in Postmenopausal Women. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 102, p. 4588–4595, 2017.

HEYS, S. D.; STEWART, K. N.; MCKENZIE, E. J. et al. Characterisation of tumourinfiltrating macrophages: impact on response and survival in patients receiving primary chemotherapy for breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, 2012. 10p.

HOOKEY, T. J.; BACKUS, R. C.; WARA, A. M. Effects of body fat mass and therapeutic weight loss on vitamin D status in privately owned adult dogs. **Journal of Nutritional Science**, v. 7, n. 17, p. 1-10, 2018.

JARDE, T.; CALDEFIE-CHEZET, F.; GONCALVES-MENDES, N.; MISHHELLANY, F.; BUECHLER, C.; PENAULT-LLORCA, F.; VASSON, M. P. Involvement of adiponectin and leptin in breast cancer: clinical and in vitro studies. **Endocrine-Related Cancer**, v. 16, p. 1197–1210, 2009.

KASER, S.; KASER, A.; SANDHOFER, A.; EBENBICHLER, C. F.; TILG, H.; PATSCH, J. R. Resistin messenger RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 309, p. 286–290, 2003.

KIL, D. Y.; SWANSON, K. S. Endocrinology of Obesity. **Veterinary Clinical Small Animals**, v. 40, p. 205–219, 2010.

KIM, W-H.; JU, J-H.; SHIN, J-I.; SEUNG, B-J.; SUR, J-H. Differential and correlated expressions of p16/p21/p27/p38 in mammary gland tumors of aged dogs. **Journal of Veterinary Science**, v. 18, n. 4, p. 479-485, 2017.

KMIEC, Z.; POKRYWKA, L.; KOTLARZ, G.; KUBASIK, J.; SZUTOWICZ, A.; MYSLIWSKI, A. Effects of Fasting and Refeeding on Serum Leptin, Adiponectin and Free Fatty Acid Concentrations in Young and Old Male Rats. **Gerontology**, v. 51, n. 6, p. 357-362, 2005.

KOMATSU, T.; ITOH, F.; MIKAWA, S.; HODATE, K. Gene expression of resistin in adipose tissue and mammary gland of lactating and non-lactating cows. **Journal of Endocrinology**, v. 178, p. R1–R5, 2003.

KUMAR, P. V.; SOBHANI, S. A.; MONABATI, A.; TALEI, A. R.; SHIRAZI, B. Cytologic Findings of a Pleomorphic Adenoma of the Breast: A Case Report. **Acta Cytologica**, v. 48, n. 6, p. 849-852, 2004.

KURYSZKO, J.; SŁAWUTA, P.; SAPIKOWSKI, G. Secretory function of adipose tissue. **Polish Journal of Veterinary Science**, v. 19, p. 441-446, 2016.

KUSMINSKI, C. M.; MCTERNAN, P. G.; KUMAR, S. Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. **Clinical Science**, v. 109, p. 243–256, 2005.

LAGO, F.; GOMEZ, R.; GOMEZ-REINO, J. J.; DIEGUEZ, C.; GUALILLO, O. Adipokines as novel modulators of lipid metabolism. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 34, n. 10, p. 500-510, 2009.

LAFLAMME, D. P. Companion animal's symposium: Obesity in dogs and cats: What is wrong with being fat? **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 1653-1662, 2012.

LAFLAMME, D. P. Understanding and managing obesity in dogs and cats. **Veterinary Clinics of the North America**, v. 36, p. 1283-1295, 2006.

LAUBY-SECRETAN, B.; SCOCCIANI, C.; LOOMIS, D.; GROSSE, Y.; BIANCHINI, F.; STRAIF, K. Body fatness and cancer: viewpoint of the IARC Working Group. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 8, p. 794-798, 2016.

LI, J.; HAN, X. Adipocytokines and Breast Cancer. **Current Problems in Cancer**, v. 42, n. 2, p. 208-214, 2018.

LIM, H. I.; IM, K. S.; KIM, N. H.; KIM, H. W.; SHIN, J. I.; YHEE, J. Y.; SUR, J. H. Effects of Obesity and Obesity-Related Molecules on Canine Mammary Gland Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 6, p. 1045-1051, 2015.

LIU, Y. L.; SARAF, A.; CATANESE, B.; LEE, S. M.; ZHANG, Y.; CONNOLL, E. P.; KALINSKY, K. Obesity and survival in the neoadjuvant breast cancer setting: role of tumor subtype in an ethnically diverse population. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 167, n. 1, p. 277-288, 2018.

LOFTUS, J. P.; WAKSHLAG, J. J. Canine and feline obesity: a review of pathophysiology, epidemiology, and clinical management. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, v. 6, p. 49-60, 2005.

LORINCZ, A. M.; SUKUMAR, S. Molecular links between obesity and breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 13, p. 279–292, 2006.

LU, Y.; FAN, C.; LIANG, A.; FAN, X.; WANG, R.; LI, P.; QI, K. Effects of SCFA on the DNA methylation pattern of adiponectin and resistin in high-fat-diet-induced obese male mice. **British Journal of Nutrition**, v. 21, p. 1-8, 2018.

LUNA, L. G.; 1968. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd ed. New York. McGraw Hill.

MACCIO, A.; MADEDDU, C.; MANTOVANI, G. Adipose tissue as target organ in the treatment of hormone-dependent breast cancer: new therapeutic perspectives. **Obesity Reviews**, v. 10, n. 6, p. 660-670, 2009.

MACHADO, M. C.; COSTA-NETO, J. M.; PORTELA, R. D.; D'ASSIS, M. J. M. H.; MARTINS-FILHO, O. A.; BARROUIN-MELO, S. M.; BORGES, N. F.; SILVA, F. L.; ESTRELA-LIMA, A. The effect of naltrexone as a carboplatin chemotherapy-associated drug on the immune response, quality of life and survival of dogs with mammary carcinoma. **Plos One**, p. 1-16, 2018.

MALINIAK, M. L.; PATEL, A. V.; MCCULLOUGH, M. L.; CAMPBELL, P. T.; LEACH, C. R.; GAPSTUR, S. M.; GAUDET, M. M. Obesity, physical activity, and breast cancer survival among older breast cancer survivors in the Cancer Prevention Study-II Nutrition Cohort. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 167, n. 1, p. 133-145, 2018.

MALVI, P.; CHAUBE, B.; SINGH, S. V.; MOHAMMAD, N.; VIJAYAKUMAR, M. V.; SINGH, S.; CHOUHAN, S.; BHAT, M. K. Elevated circulatory levels of leptina and resistin impair therapeutic efficacy of dacarbazine in melanoma under obese state. **Cancer and Metabolism**, v. 20, n. 6, p. 1-14, 2018.

MANKOWSKA, M.; STACHOWIAK, M.; GRACZYK, A.; CIAZYNSKA, P.; GOGULSKI, M.; NIZANSKI, W.; SWITONSKI, M. Sequence analysis of three canine adipokine genes revealed an association between TNF polymorphisms and obesity in Labrador dogs. **Stichting International Foundation for Animal Genetics**, v. 47, p. 245-249, 2015.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M. et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Immunology**, v.23, p. 549-555, 2002.

MAO, J.; XIA, Z.; CHEN, J.; YU, J. Prevalence and risk factors for canine obesity surveyed in veterinary practices in Beijing, China. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 1, n. 112, p. 438-442, 2013.

MENDES, F. F.; RODRIGUES, D. F. R.; PRADO, Y. C. L.; ARAUJO, E. G. Obesidade felina. **Enciclopédia biosfera**, v. 9, n.16; p. 1602-1625, 2013.

MISDORP, W.; COTCHIN, E.; HAMPE, J. F.; JABARA, A. G.; VON-SANDERSLEBEN, J. Canine malignant mammary tumors III: Special types of carcinomas, malignant mixed tumors. **Veterinary Pathology**, v.10, p.241-256, 1973.

MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, E. Definitions and explanatory notes. In: _____. *Who Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat*. Washington: **Armed Forces Institute of Pathology**, p.18-27, 1999.

MONTEIRO, L. N.; RODRIGUES, M. A.; GOMES, D. A.; SALGADO, B. S.; CASSALI, G. D. Tumour-associated macrophages: Relation with progression and invasiveness, and assessment of M1/M2 macrophages in canine mammary tumours. **The Veterinary Journal**, v. 234, p. 119-125, 2018.

MORA, S.; PESSIN, J. E. An adipocentric view of signaling and intracellular trafficking. **Diabetes Metabolism Research and Reviews**, v. 18, p. 345-356, 2002.

- MORRIS, E. V.; EDWARDS, C. M. Adipokines, adiposity, and bone marrow adipocytes: Dangerous accomplices in multiple myeloma. **Journal of Cellular Physiology**, p. 1–8, 2018.
- MOULTON J.E., ROSENBLAT L.S. Canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 7, p. 289-320, 1970.
- MULLER, D. C. M.; SCHOSSLER, J. E.; PINHEIRO, M. Adaptação do índice massa corporal humano para cães. **Revista Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 1038-1043, 2008.
- MULLOOLY, M.; YANG, H.P.; FALK, R.T; NYANTE, S.J. Relationship between crownlike structures and sex-steroid hormones in breast adipose tissue and serum among postmenopausal breast cancer patients. **Breast Cancer Research**, v. 19, n. 8, 2017.
- NAGAEV, I.; SMITH, U. Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Are Not Related to Resistin Expression in Human Fat Cells or Skeletal Muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, p. 561–564, 2001.
- NATTENMULLER, C. J.; KRIEGSMANN, M.; SOOKTHAI, D. Obesity as risk factor for subtypes of breast cancer: results from a prospective cohort study. **BMC Cancer**, v. 18, n. 616, p. 1-8, 2018.
- OLIVEIRA, M.C., NASCIMENTO, B.C.L.; AMARAL, R.W.C. Obesidade em cães e seus efeitos em biomarcadores sanguíneos - revisão de literatura. **Pubvet**, v. 4, n. 13, 2010.
- O'NEILL, S.; DROBATZ, K.; SATYARAJ, E.; HESS, R. Evaluation of cytokines and hormones in dogs before and after treatment of diabetic ketoacidosis and in uncomplicated diabetes mellitus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 15, n. 148, p. 276-283, 2012.
- OSTO, M; LUTZ, T. A. Translational value of animal models of obesity - Focus on dogs and cats. **European Journal of Pharmacology**, v. 3, n. 36, 2015.
- OWEN, L. M. TNM Classification of tumors in domestic animals. **World Health Organization**, Geneva, p. 26-32, 1980.
- PAMUK, G. E.; DEMIR, M.; HARMANDAR, F.; YESIL, Y.; TURGUT, B.; VURAL, O. Leptin and resistin levels in serum of patients with hematologic malignancies correlation with clinical characteristics. **Experimental Oncology**, v. 28, n. 3, p. 241–244, 2006.
- PAN, W.; KASTIN, A. J. Adipokines and the blood-brain barrier. **Peptides**, v. 28, n. 6, p. 1317-1330, 2007.
- PARK, J.; MORLEY, T. S.; KIM, M. et al. Obesity and cancer-mechanisms underlying tumor progression and recurrence. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, p. 455–465, 2014.
- PATEL, L.; BUCKELS, A. C.; KINGHORN, I. J.; MURDOCK, P. R.; HOLBROOK, C. J. D.; PLUMPTON, C.; MACPHEE, C. H.; SMITH, S. A. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPARc activators. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 300, p. 472–476, 2003.

PATHMANATHAN, N.; BALLEINE, R. L. Ki67 and proliferation in breast cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 66, p. 512-516, 2013.

PATRICIO, M.; PEREIRA, J.; CRISOSTOMO, J.; MATAFOME, P.; GOMES, M.; SEIÇA, R.; CAMELO, F. Using Resistin, glucose, age and BMI to predict the presence of breast cancer. **BMC Cancer**, v. 18, n. 29, p. 1-8, 2018.

PELETEIRO, M.C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 89, n. 509, p. 10-29, 1994.

PENA, L.; GAMA, A.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ABADIE4, M. J.; BENAZZI5, C.; CASTAGNARO, M.; DIEZI, L.; GARTNER, F.; HELLMEN, E.; KIUPEL, M.; MILLA, Y.; MILLER, N. M. A.; NGUYEN, F.; POLI, A.; SARLI, G.; ZAPPULLI, V.; LAS-MULAS, J. M. Canine Mammary Tumors: A Review and Consensus of Standard Guidelines on Epithelial and Myoepithelial Phenotype Markers, HER2, and Hormone Receptor Assessment Using Immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 1, p. 127-145, 2014.

PERRIER, S.; CALDEFIE-CHÉZET, F.; VASSON, M-P. IL-1 family in breast cancer: potential interplay with leptin and other adipocytokines. **FEBS Letters**, v. 583, p. 259–265, 2009.

PETO, J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. **Nature**, v. 17, n. 411, p. 390-395, 2001.

PHILIBERT, J. C.; SNYDER, P. W.; GLICKMAN, N.; GLICKMAN, L. T.; KNAPP, D. W. E.; WATERS, D. J. Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. **The Journal of Veterinary Internal Medicine**, n. 17, p. 102-106, 2003.

PICHARD, C.; PLU-BUREAU, G.; CASTRO, M. N.; GOMPEL, A. Insulin resistance, obesity and breast cancer risk. **Maturitas**, v. 60, p. 19–30, 2008.

PICON-RUIZ, M.; MORATA-TARIFA, C.; VALLE-GOFFIN, J. J.; FRIEDMAN, E. R.; SLINGERLAND, J. M. Obesity and Adverse Breast Cancer Risk and Outcome: Mechanistic Insights and Strategies for Intervention. **Ca: Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, p. 378–397, 2017.

PRADO, W. L.; LOFRANO, M. C.; OYAMA, L. M.; DAMASO, A. R. Obesity and Inflammatory Adipokines: Practical Implications for Exercise Prescription. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 5, p. 378-383, 2009.

PROTANI, M.; COORY, M.; MARTIN, JH. Effect of obesity on survival of women with breast cancer: systematic review and meta-analysis. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 123, p. 627-635, 2010.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. Laboratory methods in Histotechnology. **American Registry of Pathology**, p. 98–100, 1992.

- RADIN, M. J.; SHARKEY, L. C.; HOLICROSS, B. J. Adipokines: a review of biological and analytical principles and an update in dogs, cats, and horses. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 2, p. 136–156, 2009.
- RAMALHO, L. N. Z.; RIBEIRO-SILVA, A.; CASSALI, G. D.; ZUCOLOTO, S. The Expression of p63 and Cytokeratin 5 in Mixed Tumors of the Canine Mammary Gland Provides New Insights into the Histogenesis of These Neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 43, p. 424-429, 2006.
- RAPOSO, T.; GREGORIO, H.; PIRES, I.; PRADA, J.; QUEIROGA, F.L. Prognostic value of tumour associated macrophages in canine mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 12, p. 10-19, 2015.
- RAUCCI R, RUSOLO F, SHARMA A, COLONNA G, CASTELLO G, COSTANTINI S. Functional and structural features of adipokine family. **Cytokine**. v. 61, p. 1-14, 2013.
- REA, R.; DONNELLY, R. Resistin: an adipocyte-derived hormone. Has it a role in diabetes and obesity? **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 6, p. 163-170, 2004.
- RENEHAN, A. G.; SOERJOMATARAM, I.; TYSON, M.; EGGER, M.; ZWAHLEN, M.; COEBERGH, J. W.; BUCHAN, I. Incident cancer burden attributable to excess body mass index in 30 European countries. **International Journal of Cancer**, v. 126, p. 692-702, 2010.
- RIBEIRO, L. G. R.; DAMASCENO, K. A.; COSTA-NETO, J. M. Expressão da Cox-2 nos carcinomas mamários de cadela. **Veterinária em Foco**, v.6, p.134-139, 2009.
- RICHARDS, H. G.; MCNEIL, P. E.; THOMPSON, H.; REID, S. W. J. An epidemiological analysis of a canine-biopsies database compiled by a diagnostic histopathology service. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 51, p. 125–136, 2007.
- SAAD, E. S.; MILLEY, K. M.; AL-KHAN, A. A.; NIMMO, J. S.; BACCI, B.; TAYEBIX, M.; DAY, M. J.; RICHARDSON, S. J.; DANKS, J. A. Canine Mixed Mammary Tumour as a Model for Human Breast Cancer with Osseous Metaplasia. **Journal of Comparative Pathology**, v. 156, n. 4, p. 352-365, 2017.
- SAEKI, K.; ENDO, Y.; UCHIDA, K. et al. Significance of tumor-infiltrating immune cells in spontaneous canine mammary gland tumors: 140 cases. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.74, n.2, p.227-230, 2012.
- SANTOS, A. A.; LOPES, C. C.; RIBEIRO, J. R.; MARTINS, L. R.; SANTOS, J. C.; AMORIN, I. F.; GÄRTNER, F.; MATOS, A. J. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p. 1-11, 2013.
- SARMENTO-CABRAL, A.; L-OPEZ, F.; LUQUE, R. M. Adipokines and their receptor are widely expressed and distinctly regulated by the metabolic environment in the prostate of male mice: direct role under normal and tumoral conditions. **Endocrinology**, 2017.

SASSEK M., PRUSZYNSKA-OSZMALEK E., NOWACKA-WOSZUK J., SZCZERBAL I., SZCZEPANKIEWICZ D., KACZMAREK P., KOLODZIEJSKI P.A., SWITONSKI M. & MACKOWIAK P. Resistin – from gene expression to development of diabetes. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 27, p. 647–654, 2013

SCHWARTZ, D. R.; LAZAR M. A. Human Resistin: Found in Translation From Mouse to Man. **Trends Endocrinology and Metabolism**, v, 22, n. 7, p. 259–265, 2011.

SETHI, J. K.; VIDAL-PUIG, A. J. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. **Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 6, p. 1253-1262, 2007.

SHAN DENG; HU, B.; SHEN, K. P.; XU, L. Inflammation, macrophage in cancer progression and Chinese herbal treatment. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v.3, p. 269-272, 2012.

SILTERI, P. K. Adipose tissue as a source of hormones. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 45, p. 277–282, 1987.

SILVA, S. F.; BRITO, A. K. F.; FREIRE, B. A. A.; SOUSA, L. M.; PEREIRA, I. M. Obesidade canina: Revisão. **Pubvet**, v. 11, n. 4, p. 371-380, 2017.

SIRIVAIDYAPONG, S. Dogs with mammary gland tumors and the feeding dietary types. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION WORLD CONGRESS, 2003, **Proceedings...**, Bangkok, Thailand.

SONNENSCHNEIN, E. G.; GLICKMAN, L. T.; GOLDSCHMIDT, M. H.; MCKEE, L. J. Body Conformation, Diet, and Risk of Breast Cancer in Pet Dogs: A Case-Control Study. **American Journal of Epidemiology**, v. 133, n. 7, 1991.

SORENMO, K.; SHOFER, F.; GOLDSCHMIDT, M. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.14, n.3, p.266-270, 2000.

SPIEGELMAN, B. M.; ENERBA, S. The Adipocyte: A Multifunctional Cell. **Cell Metabolism**, v. 4, p. 425–427, 2006.

STELMANSKA, E.; KMIEC, Z.; SWIERCZYNSKI, J. The gender and fat depot-specific regulation of leptin, resistin and adiponectin genes expression by progesterone in rat. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 132, p. 160–167, 2012.

STEPPAN, C. M.; BAILEY, S. T.; BHAT, S.; BROWN, E. J.; BANERJEE, R. R.; WRIGHT, C. M.; PATEL, H. R.; AHIMA, R. S.; LAZAR, M. A. The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**, v. 409, p. 307–312, 2001.

STERN, J. H.; RUTKOWSKI, J. M.; SCHERER, P. E. Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 5, p. 770-784, 2016.

STEWART, T. H. M.; HEPPNER, G. H. Immunological enhancement of breast cancer. **Parasitology**, v. 115, p. 141-153, 1997.

SUN, C. A.; WU, M. H.; CHU, C. H.; CHOU, Y. C.; HSU, G. C.; YANG, T.; CHOU, W. Y.; YU, C. P.; YU, J. C. Adipocytokine resistin and breast cancer risk. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 123, p. 869-876, 2010.

TABAK, D. Obesidade e câncer. **Onco. Sn**, p. 22- 25, 2014.

TAUBES, G. Unraveling the obesity-cancer connection. **Science**, v. 335, p. 28-22, 2012.

TEOH, S. L.; DAS, S. Tumour biology of obesity-related cancers: understanding the molecular concept for better diagnosis and treatment. **Tumor Biology**, v. 37, n. 11, p. 14363–14380, 2016.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature**, v. 6, p. 772-783, 2006.

TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, n. 5, p. 1078-1081, 2005.

TROPF, M.; NELSON, O. L.; LEE, P. M.; WENG, H. Y. Cardiac and Metabolic Variables in Obese Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 31, p. 1000–1007, 2017.

TVARIJONAVICIUTE, A.; CERON, J. J.; TORRE, C. et al. Obese dogs with and without obesity-related metabolic dysfunction – a proteomic approach. **BMC Veterinary Research**, v. 12, p. 1-9, 2016.

VEIGA, A. P. M. **Suscetibilidade a diabetes mellitus em cães obesos**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007, 90p. Tese de doutorado em ciência animal.

VENDRELL, J.; BOCH, M.; VILARRASA, N.; MOLINA, A.; GOMEZ, J. M.; GUTIERREZ, C.; SIMON, I.; SOLER, J.; RICHART, C. Resistin, Adiponectin, Ghrelin, Leptin, and Proinflammatory Cytokines: Relationships in Obesity. **Obesity research**, v. 12, n. 6, 2004.

VERMA, R.; GUPTA, V.; SINGH, J.; VERMA², M.; GUPTA, G.; GUPTA, S.; SEN, R.; RALLI, M. Significance of p53 and ki-67 expression in prostate cancer. **Urology Annals**, v. 7, n. 4, p. 488-493, 2018.

VIEIRA-FILHO, C. H. C.; BARROUIN-MELO, S. M.; DAMASCENO, K. A.; ARAUJO, M. S. S.; BORGES, N. F.; SILVA, F. L.; CASSALI, G. D.; ESTRELA-LIMA, A.. Tumor-associated macrophage is correlated with survival and SOCS protein expression in canine mammary carcinoma. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 2018.

VISAN, S.; BALACESCU, O.; BERINDAN-NEAGOE, I.; CATOI, C. In vitro comparative models for canine and human breast cancers. **Clujul Medical.**, v. 89, n. 1, p.38-49, 2016.

VRIELING, A.; BUCK, K.; KAAKS, R.; CHANG-CLAUDE, J. Adult weight gain in relation to breast cancer risk by estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 123, n. 3, p. 641-649, 2010.

WANG, H. Y.; YIN, B. B.; JIA, D. Y.; HOU, Y. L. Association between obesity and trastuzumab-related cardiac toxicity in elderly patients with breast cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 45, p. 79289-79297, 2017.

WEETH, L. P.; FASCETTI, A. J.; KASS, P. H.; SUTER, S. E.; SANTOS, A. M.; DELANEY, S. J. Prevalence of obese dogs in a population of dogs with cancer. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 4, p. 389-398, 2007.

WOZNIAK, S. E.; GEE, L. L.; WACHTEL, M. S.; FREZZA, E. E. ADIPOSE tissue: the new endocrine organ? a review article. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 54, n. 9, p. 1847–1856, 2009.

XU, H.; BARNES, G. T.; YANG, Q.; TAN, G.; YANG, D.; CHOU, C. J. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, p. 1821-1830, 2003.

YERUSHALMI, R.; WOODS, R.; RAVDIN, P. M. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. **Lancet Oncology**, v. 11, p. 174–83, 2010.

ZHANG, F.; BASINSKI, M. B.; BEALS, J. M.; BRIGGS, S. L.; CHURGAY, L. M.; CLAWSON, D. K.; DIMARCHI, R. D.; FURMAN, T. C.; HALE, J. E.; HSIUNG, H. M.; SCHONER, B. E.; SMITH, D. P.; ZHANG, X. Y.; WERY, J. P.; SCHEVITZ, R. W. Crystal structure of the obese protein leptin-E 100. **Nature**, v. 387, p. 206-209, 1997.

ZIMMET, P.; THOMAS, C. R. Genotype, obesity and cardiovascular disease – has technical and social advancement outstripped evolution? **Journal of Internal Medicine**, v. 254, p. 114–125, 2003.

ZORAN, D. L. Obesity in Dogs and Cats: A Metabolic and Endocrine Disorder. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 40, n. 2, p. 221-239, 2010.

ZUCCARI, D. A. P. C.; BERTON, C. R.; TERZIAN, A. C. B.; RUIZ, C. M. Prognostic and predictive factors in mammary neoplasias – immunohistochemical markers importance in human and canine species – comparative study. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 4, p. 189-198, 2008.

ZUNIGA, M. C.; RAGHURAMAN, G.; HITCHNER, E.; WEYAND, C.; ROBINSON, W.; ZHOU, W. PKC-epsilon and TLR4 synergistically regulate resistin-mediated inflammation in human macrophages. **Atherosclerosis**, v. 259, p. 51–59, 2017.

9. ANEXOS

Anexo 1: Termo de esclarecimento/consentimento livre e esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Hospital de Medicina Veterinária Prof. Renato Medeiros Neto

Termo de esclarecimento/consentimento livre e esclarecido

O presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido tem o objetivo de informar ao responsável pelo paciente, quanto aos principais aspectos relacionados ao projeto ao qual o animal será submetido, complementando as informações prestadas pelo seu médico veterinário e pela equipe de profissionais do Projeto Mama do Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia.

Propósito e objetivo do projeto

Tumores de mama em cadelas são os principais tumores observados na clínica de pequenos animais, sendo a taxa de malignidade extremamente variável, podendo alcançar mais de 90% dos casos, muitos dos quais já apresentam metástase linfática no momento do diagnóstico. A partir deste estudo clínico, objetivamos determinar os principais achados clínicos e conduta cirúrgica adequada; estabelecer o diagnóstico e graduação histopatológica das neoplasias, correlacionando com os fatores prognósticos; avaliar o potencial proliferativo dos tumores e a eficácia da cirurgia e quimioterapia (convencional e metronômica) no aumento da sobrevida global.

Como eu faço para participar do projeto?

Todos os pacientes deverão ser avaliados previamente pelos médicos veterinários responsáveis pelo estudo e esta avaliação deverá ser realizada no Hospital de Medicina Veterinária da UFBA. Para participação do projeto o proprietário deve ser comprometer em realizar todo o tratamento recomendado, além de estar ciente dos custos que terão com o tratamento.

Quais são os exames necessários para inclusão do paciente no estudo?

Após a avaliação inicial, o paciente será encaminhado para radiografia de tórax em 3 incidências, USG, eletrocardiograma e ecocardiograma a serem realizadas em clínica indicada pelos médicos veterinários responsáveis pelo projeto. Após este procedimento, serão coletadas amostras de sangue destes pacientes para realização de função hepática (ALT, FA), função renal (ureia e creatinina), hemograma completo, cálcio e glicose.

Após os exames pré-operatórios será realizada a cirurgia (mastectomia unilateral total com castração), a paciente ficará com bandagem compressiva durante 15 dias no pós-operatório. Após este período será realizada a retirada dos pontos. É de caráter obrigatório para a permanência no projeto a realização da análise histopatológica (biópsia) da cadeia mamária retirada. O resultado do histopatológico será avaliado por um dos médicos veterinários do projeto, o qual irá avaliar critérios de malignidade e este então irá indicar ou não o tratamento quimioterápico para a paciente. A quimioterapia convencional será realizada no total de 6 sessões, com intervalo de 21 dias, sendo necessário exames de sangue entre as sessões e o acompanhamento do paciente. Em casos de tumores de alto grau ou pacientes com metástase a distância estes farão também a quimioterapia metronômica, que é uma medicação administrada por via oral todos os dias.

Quais são os efeitos colaterais que meu animal poderá apresentar durante o tratamento?

O seu animal pode apresentar efeitos colaterais devido a quimioterapia convencional, podendo ser leves a sérios. Os efeitos colaterais mais comumente esperados são alterações gastrointestinais (vômito, diarreia e diminuição de apetite), trombocitopenia, leucopenia e anemia, que serão avaliados e então analisada a necessidade da interrupção do tratamento. Com relação a quimioterapia metronômica o efeito colateral mais comum é a cistite hemorrágica estéril, a qual é prevenida com o uso da medicação sempre pela manhã, aumento da ingestão de água e aumento da micção.

Qual será o custo do tratamento?

Exames de imagem (radiografia de tórax, USG, ECG E ECO)

Hemograma e bioquímica sérica

Cirurgia = de acordo com o tipo e peso do animal

Medicações pós-operatórias e quimioterápicas

O que acontecerá em caso de desistência de participação?

Você tem todo o direito de não autorizar e em qualquer momento da pesquisa interromper sua participação, devendo avisar o pesquisador com antecedência da sua desistência.

Nome dos Médicos Veterinários responsáveis pelo estudo:

Prof. Dra. Alessandra Estrela da Silva Lima (Coordenadora), MV. Msc. Laís Pereira Silva, MV. Msc. Marília Carneiro de Araújo Machado, MV. Msc. Carlos Humberto da Costa Vieira Filho, MV. Msc. Aline Conceição dos Santos, MV. Msc. Bianca Oliveira Nicchio, MV. Msc. Sheila Cristina Amorim, MV. Dra. Karine Araújo Damasceno e MV. Maria Carolina Souza

Em caso de dúvidas entrar em contato com:

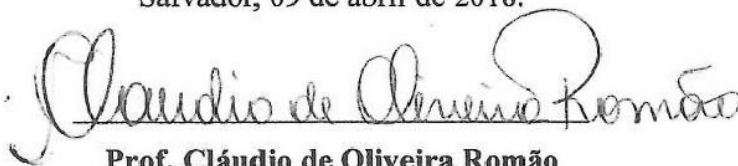
Celular: (71) 99171-0841 / E-mail: aestrela@ufba.br – Profa. Alessandra Estrela Lima

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Avaliação dos níveis de androstenediona e estrona no tecido subcutâneo de cadelas com carcinoma em tumor misto benigno e a influência de suplementação com ômega 3 na taxa de sobrevida, registrada com o nº 05/2015, sob a responsabilidade da Professora Alessandra Estrela da Silva Lima, e que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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 pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia, em reunião ordinária do dia 09/04/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	09/04/2018 a 09/04/2020
Espécie/linhagem/raça	Cão
Nº de animais	90
Peso/Idade	3 a 40 kg / 6 a 15 anos
Sexo	Fêmeas
Origem	Animais da cidade de Salvador

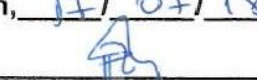
Salvador, 09 de abril de 2018.



Prof. Cláudio de Oliveira Romão
Coordenador CEUA/EMEVZ-UFBA

CONFERE COM O ORIGINAL

Em, 17/07/18


Assinatura Servidor

Roseane Pascoal Neves
Assinatura

Anexo 3: Protocolo para exame anatomopatológico de tumores mamários caninos.

FICHA CLÍNICA DE ACOMPANHAMENTO DE CADELAS COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS

RG: _____ RG projeto: _____ Data: _____

Histo: _____ Cito: _____ Raio-X: _____

Proprietário: _____ Telefone: _____

Endereço: _____

Nome: _____ Espécie: _____ Raça: _____

Sexo: Macho Fêmea Pelagem: _____ Cor: _____

Idade: _____ Porte: Pequeno (até 35cm) Peso: _____

FC: _____ FR: _____ Médio (36-46cm) Condição corporal: Magro

Mucosas: _____ TPC: _____ Grande (acima 46cm) Normal

Alimentação: Ração Comida caseira Ração + Comida caseira Obeso

Ambiente: _____

Antecedentes genéticos: _____

Vacinação: Anti-rábica Sim Não Quando/Qual: _____

Outras Sim Não Quando/Qual: _____

Vermifugação: Sim Não Quando/Qual: _____

Doenças anteriores e atuais: _____

Tomando medicamento: Sim Não Qual/Tempo: _____

Anticoncepcional: Sim Não Quanto/Qual: _____ Última data: _____

Cio Regular: Sim Não Último (data): _____

Castrada: Sim Não Idade: _____

Pseudo-gestação: Regulares Intermitentes Não

Partos: Sim Não Quantos: _____ Último: _____

Aborto: Sim Não Quantos: _____ Último: _____

Já cruzou e não emprenhou: Sim Não

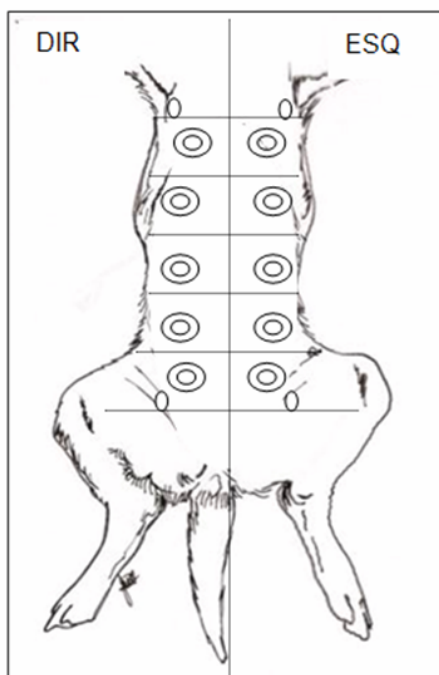
Secreção vaginal: Sim Não Quando/Intensidade: _____

Características do(s) tumor(s):

Integra Ulcerada Cística

Mamas acometidas: (Esquema)

Exames solicitados:.....



Marcar com um X o tamanho correspondente:

M1D - <= 3cm ; >3-5cm ; >5cm M2D - <= 3cm ; >3-5cm ; >5cm M3D - <= 3cm ; >3-5cm ; >5cm M4D - <= 3cm ; >3-5cm ; >5cm M5D - <= 3cm ; >3-5cm ; >5cm M1E - <= 3cm ; >3-5cm ; >5cm M2E - <= 3cm ; >3-5cm ; >5cm M3E - <= 3cm ; >3-5cm ; >5cm M4E - <= 3cm ; >3-5cm ; >5cm M5E - <= 3cm ; >3-5cm ; >5cm

Outro local:

Consistência:

Secreção: Sim Não Edema de membros: Sim Qual(is)? Não Linfonodos infartados: Sim Qual(is)? Não

Veterinário resp: Data:/...../.....