

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

WILLIAM TORRES BLANCA

**EXPRESSÃO DE LEPTINA E RECEPTOR DE LEPTINA (ObR) COMO
FATOR DE RISCO PARA NEOPLASIAS DE MAMA EM CADELAS E
CORRELAÇÃO COM OBESIDADE**

UBERLÂNDIA – MG

2017

WILLIAM TORRES BLANCA

**EXPRESSÃO DE LEPTINA E RECEPTOR DE LEPTINA (ObR) COMO
FATOR DE RISCO PARA NEOPLASIAS DE MAMA EM CADELAS E
CORRELAÇÃO COM OBESIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências Veterinárias
da Universidade Federal de Uberlândia,
como requisito parcial à obtenção do título
de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientador: Prof. Dra. Alessandra
Aparecida Medeiros-Ronchi.

UBERLÂNDIA-MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- B638e
2017 Blanca, William Torres, 1991
 Expressão de leptina e receptor de leptina (ObR) como fator de risco
 para neoplasias de mama em cadelas e correlação com obesidade /
 William Torres Blanca. - 2017.
 36 p. : il.
- Orientadora: Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.210>
 Inclui bibliografia.
1. Veterinária - Teses. 2. Obesidade - Teses. 3. Cão - Doenças -
 Teses. 4. Mamas - Câncer - Teses. I. Medeiros-Ronchi, Alessandra
 Aparecida. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
 Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Ata da defesa de Dissertação de MESTRADO ACADÊMICO junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de mestrado acadêmico nº PPGCV/027/2017

Data: 08/12/2017

Discente: *William Torres Blanca* – Matrícula – 11512MEV032

Título da Dissertação: **EXPRESSÃO DE LEPTINA E RECEPTOR DE LEPTINA (ObR) COMO FATOR DE RISCO PARA NEOPLASIAS DE MAMA EM CADELAS E CORRELAÇÃO COM OBESIDADE**

Área de concentração: SAÚDE ANIMAL

Linha de pesquisa: CLÍNICA MÉDICA E INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA

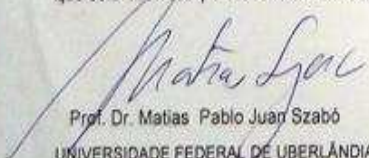
Projeto de Pesquisa de vinculação: PATOLOGIA ONCOLÓGICA E EPIDEMIOLOGIA DAS NEOPLASIAS DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS

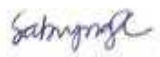
No dia 08 de dezembro do ano de 2017 às 14:00 horas na sala 2D07 – Bloco 2D – Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Comissão Julgadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, composta pelos Professores(as)/Doutores(as): **Matias Pablo Juan Szabó** – UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA; **Sabryna Gouveia Calazans** – UNIVERSIDADE DE FRANCA e **Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi** orientador(a) do(a) candidato(a).

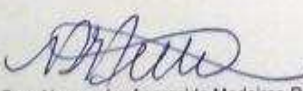
Iniciando os trabalhos o(a) presidente da comissão Dr./Dra. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi concedeu a palavra ao(a) candidato(a) para uma exposição do seu trabalho, contando com o tempo máximo de 50 minutos. A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o(a) candidato(a), durante o prazo máximo de (30) minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para resposta. Ultimeada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Comissão Julgadora, em sessão secreta, considerou o(a) candidato(a) APROVADO.

Esta defesa de dissertação de mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme Regulamento do Programa, Legislação e a Regulamentação Interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar o(a) Presidente encerrou os trabalhos às 16 horas e 45 minutos, lavrou esta ata que será assinada por todos os membros da Comissão Examinadora. Uberlândia, 08 de Dezembro de 2017


Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA


Profa. Dra. Sabryna Gouveia Calazans
UNIVERSIDADE DE FRANCA


Profa. Dra. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi
ORIENTADORA

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

WILLIAM TORRES BLANCA - Nascido em Franca, Estado de São Paulo, em 16 de dezembro de 1991, filho de Valdir Torres Blanca e Vera Lúcia Mendes Blanca. Médico Veterinário, graduado em de Janeiro de 2015 pela Faculdade Federal de Uberlândia, mestrando em saúde animal na Universidade federal de Uberlândia e residente em patologia clínica e animal na Universidade de Franca.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros votos de agradecimento,

Principalmente aos meus pais Valdir e Vera por sempre me apoiarem e acreditarem que o estudo é sempre o melhor caminho.

Infinitamente à minha orientadora Prof. Dra. Alessandra Aparecida Medeiros Ronchi por ser uma excelente profissional e pessoa, por ter paciência e dedicação direcionadas aos meus planos e realizações.

Aos meus amigos do laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal de Uberlândia por estarem sempre ao meu lado e me apoiarem.

A Taís Wilson pelo grande apoio, que sem seu companheirismo e conhecimento não seriam possíveis os resultados obtidos neste trabalho.

Em especial a Lígia Gundim, Breno Luiz e Amanda Lima por estarem comigo nesta fase, me escutarem e fornecerem suporte emocional para a conclusão deste projeto.

Quando novas informações surgem e as circunstâncias mudam já não é possível resolver os problemas com as soluções de ontem (Roger Von Oech).

LISTAS DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Características tumorais distribuídas de acordo com a classificação do IMCC (Índice de massa corporal canino), Uberlândia MG. p. 36.

Tabela 2. Características tumorais distribuídas de acordo com a expressão de Leptina e seu receptor ObR, Uberlândia MG. p. 36

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1. Carcinomas mamários de cadelas. Marcação Imunohistoquímica para leptina (A e B) e seu receptor Obr (C e D) A. Carcinoma simples negativo <5% de células positivas para Leptina (complexo streptavidina-biotina-peroxidase, policlonal anticorpo anti Leptina, contracorado com hematoxilina, aumento 40x) B. Carcinoma simples positivo >5% de células positivas para Leptina (complexo streptavidina-biotina-peroxidase, policlonal anticorpo anti Leptina, contracorado com hematoxilina, aumento 40x) C. Carcinoma simples negativo <5% de células positivas para Obr (complexo streptavidina-biotina-peroxidase, policlonal anticorpo antiObr, contracorado com hematoxilina, aumento 40x) D. Carcinoma simples positivo >5% de células positivas para Obr (complexo streptavidina-biotina-peroxidase, policlonal anticorpo antiObr, contracorado com hematoxilina, aumento 40x). p. 35.

Figura 2. Curva de Idade e Tamanho tumoral de acordo com o IMCC. (A) Animais com neoplasia mamária distribuídos de acordo com a Idade (anos), observa-se uma tendência decrescente de acordo com o aumento dos valores de IMCC. (B) Animais com neoplasia mamária distribuídos de acordo com o IMCC, observa-se a tendência crescente dos valores de acordo com o aumento do tamanho tumoral. p. 35.

LISTA DE ABREVIATURAS

α -MSH- α -melanócito

CRH-corticotropina

FNT- Fator de Necrose Tumoral

IGF-1-Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 ou somatomedina C

IL-1- Interleucina1

IL-6- Interleucina6

IMC- Índice de Massa Corporal

IMCC-Índice de Massa Corporal Canino

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

OMS-Organização Mundial de Saúde

Resumo

Na espécie humana e em cadelas a obesidade é considerada fator de risco no desenvolvimento de neoplasias mamárias e a leptina é um hormônio liberado por adipócitos que estimula a proliferação de células cancerosas. Dado a alta prevalência da obesidade e de tumores mamários em cadelas, estudos que visem um melhor entendimento do papel da leptina na obesidade canina, assim como sua correlação com tumores de mama tornam-se de extrema importância. Foi realizada uma revisão de literatura abordando a obesidade canina, a relação da obesidade com carcinomas mamários e relação da obesidade com a marcação imunohistoquímica de leptina e seu receptor. Objetivou-se verificar a expressão da leptina e seu receptor em carcinomas mamários de cadelas, por meio da técnica de imunohistoquímica e correlacionar esta expressão com a obesidade, tamanho do tumor, idade, tipo e grau histológico. Relacionou-se ainda obesidade com tamanho do tumor, idade e grau histológico. Foram utilizadas 84 cadelas, submetidas à exérese cirúrgica de carcinomas mamários, totalizando 95 amostras de carcinomas simples e complexo que foram submetidas à avaliação imunohistoquímica para a expressão de leptina e seu receptor. Carcinomas complexos corresponderam a 41% das amostras (39/95) e 59% carcinomas simples (56/95). Quanto ao índice de massa corporal dos cães (IMCC) 9,52% estavam abaixo do peso (8/84), 29,76% estavam dentro do peso ideal (25/84), 33,33% se encontravam acima do peso (28/84) e 27,39% estavam obesas (23/84) no momento da mastectomia. Observou-se que a idade dos animais obesos com carcinomas mamários era menor e que animais obesos eram portadores de tumores com maiores tamanhos quando comparados à aqueles com outras condições corporais. A expressão de leptina não está diretamente relacionada ao IMCC, porém a expressão de ObR foi maior ($p < 0.05$) em cadelas com maiores valores de IMCC. Houve correlação entre idade e expressão de leptina indicando que animais mais velhos são portadores de tumores que expressam leptina com maior frequência. A obesidade pode ser considerada fator de risco para carcinomas mamários em cadelas uma vez que cadelas obesas apresentam carcinomas mamários mais precocemente e massas tumorais de maior tamanho. Ainda, a expressão de ObR é maior em carcinomas de cadelas obesas.

Palavras chaves: Leptina, ObR, Neoplasia mamária, Obesidade, Fator de risco, Canino.

Abstract

In humans and bitches obesity is considered a risk factor in the development of breast cancer. Leptin is a hormone synthesized by adipocytes that stimulates the proliferation of cancer cells.

The high prevalence of obesity and breast tumors in bitches, studies aiming at a better understanding of the role of leptin in canine obesity, as well as its correlation with breast tumors, are of the utmost importance. A review of the literature on canine obesity, the relationship between obesity and mammary carcinomas, and the relation between obesity and the immunohistochemical marking of leptin and its receptor were carried out. The objective of this study was to verify the expression of leptin and its receptor in mammary carcinomas of bitches by means of the immunohistochemical technique and to correlate this expression with obesity, tumor size, age, type and histological grade. Obesity was also related to tumor size, age and histological grade. We used 84 bitches, submitted to surgical excision of mammary carcinomas, totaling 95 samples of simple and complex carcinomas that were submitted to immunohistochemical evaluation for the expression of leptin and its receptor. Complex carcinomas corresponded to 41% of the samples (39/95) and 59% simple carcinomas (56/95). The body mass index of dogs (BMI), 9.52% were underweight (8/84), 29.76% were within ideal weight (25/84), 33.33% were overweight (28/84) and 27.39% were obese (23/84) at the time of mastectomy. It was observed that the age of the obese animals with mammary carcinomas was smaller and that obese animals were carriers of tumors with larger sizes when compared to those with other classifications of body conditions. The expression of leptin was not directly related to the BMI, but the expression of ObR was higher ($p < 0.05$) in bitches with higher BMI values. There was a correlation between age and leptin expression indicating that older animals express leptin more frequently. Obesity may be considered a risk factor for breast carcinomas in bitches, once with obese female dogs present early breast carcinomas and tumor masses of larger size. Moreover, the expression of ObR is greater in carcinomas of obese bitches.

Key words: Leptin, ObR, Breast carcinomas, Obesity, Risk factor, Bitches.

SUMÁRIO

CAPITULO1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	11
2.REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	12
2.1 Tecido adiposo.....	12
2.2 Obesidade canina.....	12
2.3 Leptina e a obesidade.....	13
2.4 Neoplasias mamárias em cadela.....	15
2.5 Obesidade e neoplasias mamárias.....	16
2.6 Leptina e neoplasias mamárias.....	17
3. REFERÊNCIAS.....	19

CAPITULO 2 - EXPRESSÃO DE LEPTINA E RECEPTOR DE LEPTINA EM CARCINOMAS MAMÁRIOS DE CADELAS OBESAS

RESUMO.....	26
ABSTRACT.....	26
INTRODUÇÃO.....	27
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
Animais.....	28
Classificação e análise dos tumores.....	29
Imunohistoquímica.....	29
Análise estatística.....	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

A obesidade em humanos é uma doença crônica multifatorial que envolve aspectos bioquímicos, alimentares e genéticos (ADES e KERBAUY, 2002). Nos últimos anos, o percentual de mulheres com excesso de peso no mundo aumentou de 29,8% em 1980, para 38 % em 2013 (FLEMING et al., 2014). Na população canina estima-se que 22% a 44% dos cães são obesos (ZORAN et al., 2010). Muller e colaboradores em 2008, estudando a população canina submetida à vacinação anti-rábica em Porto Alegre, verificaram que 53,4% dos cães apresentavam peso ideal e 39,5% possuíam sobrepeso ou eram obesos.

A obesidade na espécie canina, assim como em humanos, é considerada uma doença nutricional que prejudica as funções fisiológicas, levando ao aumento do risco a doenças cardiovasculares e *diabetes mellitus* (BURKHOLDER e TOLL 2000).

Em mulheres, a obesidade já é tida como um fator de risco no desenvolvimento de neoplasias mamárias. Estudo realizado na França demonstrou que mulheres com alto IMC (Índice de Massa Corporal) possuíam 1,9 vezes mais chance de serem acometidas por uma neoplasia mamária (BESSAOUD et al., 2008). Entretanto, esta predisposição não está muito bem caracterizada em animais (CLEARY et al., 2010).

Na última década, estudos têm demonstrado a relação entre obesidade e aumento da expressão de leptina em neoplasias mamárias na mulher (JARDÉ et al., 2009, 2011; CLEARY et al., 2010; BENITEZ et al., 2012). Em cadelas, estudo pioneiro realizado por Ressel e col. (2012) revelou que a expressão de leptina e seu receptor (ObR) varia entre mamas saudáveis ou com alguma alteração, sendo maior a expressão do receptor em tecidos hiperplásicos quando comparada a lesões neoplásicas malignas. Outros dois estudos demonstraram que, em cadelas, a expressão de leptina é maior nos carcinomas e que neoplasias mamárias com maior graduação histológica (Grau III) possuíam maior expressão de leptina (LIM et al., 2015a; LIM et al., 2015b).

Dado a alta prevalência da obesidade e de tumores mamários em cadelas, estudos que visem um melhor entendimento do papel da leptina na obesidade canina, assim como sua correlação com tumores de mama tornam-se de extrema importância.

Até o momento, somente três estudos foram conduzidos em cadelas verificando a relação entre a expressão de leptina e neoplasias mamárias. Ainda, nenhum dos estudos foi capaz de elucidar a verdadeira correlação entre obesidade, expressão de leptina e neoplasias mamárias. Assim, tornam-se imprescindíveis estudos para definir claramente a associação

entre estes fatores, pela alta frequência de neoplasias mamárias em cadelas e também pelo fato da incidência de obesidade e neoplasias ser maior em cães idosos, grupo etário cada vez mais numeroso na população canina no Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido Adiposo

O tecido adiposo é um tipo de tecido conjuntivo frouxo, sendo composto principalmente por adipócitos, além de células-tronco mesênquimais, células endoteliais nervosas e de defesa (ZORAN et al., 2010)

O tecido adiposo possui função de reserva energética, mas também funciona como um órgão endócrino que controla o consumo alimentar, atuando de forma complexa, onde é capaz de regular o metabolismo energético (RADIN et al., 2009).

Os adipócitos são responsáveis pela produção de várias substâncias, tais como leptina, adiponectina, fator de necrose tumoral (FNT), interleucina6 (IL6), quimiocinas, proteínas de fase aguda, fatores hemostáticos e hemodinâmicos, além de neurotrofinas (GERMAN, 2010).

O aumento do número de estudos sobre obesidade propiciou maiores informações sobre o papel do tecido adiposo e suas funções, sendo que as principais descobertas estão relacionadas à produção de substâncias endócrinas (ZORAN et al., 2010). O tecido adiposo produz adipocinas, moléculas que estão relacionadas com sensibilidade insulínica (GERMAN et al., 2009), desordens lipídicas, respiratórias, reprodutoras, cardiopatias, além de afetar a homeostase energética, angiogênese (GERMAN, 2006).

2.2 Obesidade canina

A obesidade pode ser definida como armazenamento excessivo de gordura corporal que leva a diversas alterações no metabolismo, sendo esta o distúrbio nutricional mais frequentemente observado em cães na última década (GERMAN et al. 2009).

A obesidade é tida como uma desordem multifatorial que está principalmente ligada a fatores genéticos, densidade energética da dieta e frequência de exercícios físicos (GERMAN, 2006). A maioria dos proprietários não reconhece que seu animal está acima do

peso, e assim não toma medidas para promover a redução de peso no animal, tornando-se necessário o esclarecimento nesses casos pelo médico veterinário (KIENZLE et al., 1998).

O fato de uma parcela dos proprietários acreditar que a melhor forma de interagir com seu animal seja através do fornecimento de alimento ocasiona sobrecarga energética, seja pelo fornecimento de alimentos que não fazem parte da dieta comum de um cão ou por um aumento na ingestão de alimentos rotineiros. Este fato tem contribuído para o fenômeno ascendente da obesidade nos cães (KIENZLE et al., 1998).

Animais de meia idade a idosos são mais predispostos a obesidade (NGUYEN, 2006; LAFLAMME, 2006), pois com a maturidade e senilidade o animal tende a ganhar peso devido a alterações na composição corpórea pela redução no metabolismo basal (BURKHOLDER et al., 2000). A faixa etária de maior prevalência situa-se entre 5 e 10 anos (NGUYEN, 2006; LAFLAMME, 2006). Enquanto a taxa de obesidade em filhotes é de 6% em adultos esse valor pode chegar a 40% (NGUYEN, 2006).

A obesidade acomete principalmente fêmeas, que representam 60 % da população de cães obesos (JERICÓ; SCHEFFER, 2002). A castração é considerada um importante fator de risco no desenvolvimento da obesidade em cães, devido principalmente à diminuição do metabolismo basal, aumento da ingestão de alimentos e sedentarismo após o procedimento, sendo as fêmeas castradas mais predispostas ao ganho excessivo de peso (GERMAN, 2006).

Recomenda-se a redução na ingestão calórica em até 30% em fêmeas castradas a fim de prevenir a obesidade. Ainda, animais que vivem em apartamento possuem 31% de chance de se tornarem obesos, enquanto que a chance de se tornarem obesos cai para 23% no caso de animais que vivem em casa com espaço livre (NGUYEN, 2006).

2.3 Leptina e a Obesidade

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a condição corporal é determinada pelo Índice de Massa Corporal (IMC). Este é um método no qual uma pessoa adulta pode obter uma indicação se está abaixo do peso, no peso ideal, acima do peso ou obeso. É obtido pela razão entre o peso e a altura ao quadrado ($IMC = \text{peso} / \text{altura}^2$) (MONTILLA et al., 2003). Segundo Muller et al. (2008) a medida da coluna vertebral adicionada ao comprimento do membro pélvico é um parâmetro viável em cães para substituir a altura, utilizada em humanos, tornando possível obter e classificar os animais de acordo com o Índice de Massa Corporal Canino (IMCC).

A leptina, também chamada de adipocitoquinina, é uma proteína secretada principalmente pelo tecido adiposo e, em menor proporção, por outros tecidos como células da mucosa gástrica, placenta, epitélio mamário, músculo esquelético e ovários. Sua principal função é hormonal, atuando na manutenção do equilíbrio energético do corpo, através do controle da quantidade de tecido adiposo (BENÍTEZ, 2012; RACHIGLIO, 2008).

A produção de leptina pelos adipócitos ocorre logo após a ingestão de alimentos, momento em que os níveis de insulina sérica tendem a se elevar. Neste período pós-prandial a leptina tem funções metabólicas importantes, como o aumento na produção de calor corpóreo e ativação dos mecanismos de saciedade, com objetivo, ao final, de manutenção e controle do estado corpóreo do indivíduo (MARTIN, 2001; RICCI, 2012).

A leptina reduz o apetite a partir da inibição da formação de neuropeptídeos relacionados ao apetite, como o neuropeptídeo Y, e também do aumento da expressão de neuropeptídeos anorexígenos (hormônio estimulante de α -melanócito - α -MSH, hormônio liberador de corticotropina - CRH) com ação semelhante a outras substâncias como a anfetamina e cocaína (FRIEDMANN; HALAAS, 1998). Assim, altos níveis de leptina reduzem a ingestão alimentar enquanto que baixos níveis induzem hiperfagia (FRIEDMANN; HALAAS, 1998).

Em situações de obesidade, há excesso de produção de leptina, na tentativa de reduzir o consumo. Ocorre a hiperleptinemia, que é atribuída a alterações no receptor de leptina ou a uma deficiência em seu sistema de transporte na barreira hematoencefálica, fenômeno denominado resistência à leptina, semelhante ao que ocorre no diabetes, sendo que mesmo que o indivíduo tenha a leptina para inibir o consumo alimentar este fato não ocorre (CONSIDINI, 1996).

Em humanos, existe uma correlação positiva entre os níveis séricos de leptina e o IMC (HANEL, 1996; SCHWARTZ, 1997). Alguns fatores estão associados ao aumento da concentração de leptina sanguínea, tais como: obesidade, hiperalimentação, resistência à insulina, presença de citocinas como FNT, IL6 e IL1, glicocorticoides, hormônios da reprodução, prostaglandinas, infecções e inflamação crônica.

A leptina atua através de seu receptor específico de membrana. Estes são receptores de citocinas classe I e são expressos em tecidos como placenta, pâncreas, estômago, glândulas adrenais, tecido mamário, células hematopoiéticas, fígado, pulmão e coração (HU, 2002; EUGENIA, 2006; CIRILLO, 2008).

Foram identificadas seis isoformas destes receptores podendo apresentar estrutura molecular na forma longa, curta e solúvel. Receptores de forma curta estão presentes nos mais diversos tecidos, enquanto os de forma longa estão presentes no hipotálamo, e são os únicos capazes de ativar a cascata de reação intracelular, e por fim, os solúveis estão presentes na corrente sanguínea (CIRILLO, 2008; MANTZOROS, 2011).

Em humanos, a expressão de leptina e seu receptor foi observada no epitélio mamário em linhagens celulares de neoplasias e superexpressão no epitélio de neoplasias mamárias em comparação ao tecido normal, havendo ainda uma correlação positiva entre a expressão de Obr e estrógeno (ISHIKAWA et al., 2004).

Estudos utilizando PCR, imunoblotting e imunofluorescência revelaram um aumento no RNAm e proteínas de expressão do receptor Obr, tanto das formas de cadeia curta quando das de cadeia longa, na linhagem tumoral K303. Esta linhagem expressa receptores de estrógeno, mostrando que a maior expressão de leptina está associada ao aumento de RNAm e proteínas de expressão de PCR, através da maior sensibilização e consequente ativação da cascata de sinalização, estimulando as células a maior crescimento, mobilidade e invasão (BATTAGLIA et al., 2012).

A leptina é considerada um potente modulador da sinalização de estrógeno (CUI et al., 2004). Enquanto o estradiol é capaz de modular, aumentando e diminuindo a expressão do receptor Obr em cérebros de ratos (CATALANO et al., 2003) entretanto outros estudos mostram que o estradiol induz a expressão de leptina e Obr em linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 (GAROFALO, 2006).

2.4 Neoplasias mamárias em cadelas

O câncer é a principal causa de óbito de cães adultos e sua maior incidência na última década é devido a maior longevidade desses animais aliada ao crescente aumento (DALECK et al., 2009). Sendo a esterilização cirúrgica precoce em cães demonstram uma redução no risco de desenvolvimento de alguns tipos de câncer (mama, ovário e próstata) (DALECK et al., 2009).

O tumor de mama é o tipo de neoplasia mais frequente em mulheres, respondendo por 22% dos casos novos de tumores a cada ano. Os tumores mamários também são a neoplasia mais frequentemente observada em cães, no Brasil, sendo a maioria malignos (BIONDI, 2014). As neoplasias mamárias acometem com maior frequência em fêmeas com

idade entre sete a 12 anos (BIONDI, 2014). No Brasil, há relatos de incidência de tumores mamários malignos de 60% (Daleck et al. (2009), 89,4% (TORÍBIO et al., 2012) e 91,7% (BIONDI et al., 2014). Segundo Daleck et al. (2009) em 25% dos casos os animais apresentam metástases nos linfonodos regionais no momento do diagnóstico, e em alguns casos no parênquima pulmonar.

A primeira abordagem de paciente canino com nódulos mamários deve consistir em exame físico minucioso, não apenas das glândulas mamárias, mas também de características gerais que possibilitem avaliar o estado geral do animal. Ao exame físico da cadeia mamária, recomenda-se o registro dos seguintes aspectos das lesões: localização, consistência e tamanho, assim como eventuais sinais de aderência aos tecidos adjacentes, deformações das mamas e ulceração na pele (LANA et al., 2007).

Cerca de 50% dos casos de neoplasias mamárias em cadelas são detectados durante avaliação clínica e apresentam lesões múltiplas, não apenas devido à rapidez de progressão do tumor, mas também pela demora do proprietário em buscar auxílio médico veterinário para seu cão (LANA et al., 2007).

A excisão cirúrgica é o tratamento mais indicado e o tipo de procedimento adotado (mastectomia parcial ou total) pode variar de acordo com o tipo e localização do tumor, podendo ser associado ou não a outros tipos de terapia (CASSALLI et al., 2014).

O prognóstico para cadelas portadoras de tumor de mama depende de vários fatores, como classificação histológica do tumor, tamanho do tumor, grau de invasividade, grau de diferenciação nuclear, presença de metástases, tempo de diagnóstico, presença de ulceração ou não e presença de receptores hormonais (YAMAGAMI et al, 1996).

2.5 Obesidade e Neoplasias mamárias

Atualmente, animais de companhia e, em especial cães, apresentam maior tempo de vida e tal fato pode ser explicado devido ao consumo de dietas de melhor qualidade, evolução dos mecanismos diagnósticos e terapêuticos e prevenção de doenças (vacinas) que possibilitam maior sobrevivência destes animais (DE NARDI, 2002; OLIVEIRA FILHO, 2010). Com o aumento da longevidade, aumentou-se também a prevalência e incidência de neoplasias na espécie canina (DE NARDI, 2002; GOSMIDE, 2009; OLIVEIRA FILHO, 2010).

Em um estudo realizado nos estados Unidos, 14,5% da mortalidade de pacientes com câncer ocorreu em indivíduos obesos, sendo os rins, trato gastrointestinal e glândula mamária os principais órgãos acometidos pelas neoplasias (CALLE, 2004).

Perez et al. (1998) relataram que a obesidade em idade jovem e um ano antes do diagnóstico do tumor, assim como a ingestão de comida caseira (em comparação com a de alimentos comerciais), têm sido relacionada a uma maior incidência de tumores de glândula mamária.

A dieta é tida como um dos fatores que influenciam o desenvolvimento de neoplasias mamárias em cadelas, principalmente em relação à alimentação caseira com alta ingestão de carnes bovina e suína (ZUCCARI et al., 2001). Uma elevada ingestão de carne bovina e suína e uma baixa ingestão de frango parecem influenciar no aparecimento de neoplasias mamárias. No entanto, a proporção de macronutrientes (gorduras, proteínas e carboidratos) não parece ser significativa (PEREZ, 1998).

Em outro estudo realizado na França, pesquisadores observaram que o risco do desenvolvimento de tumores mamários foi relativamente maior em cadelas jovens obesas (SONNENSCHNEIN et al. 1991). Já Willet (2000) comprovou que em camundongos uma dieta com restrição calórica pode ser associada a uma redução nos casos de desenvolvimento de tumores mamários, em contrapartida uma ingestão rica em gorduras, principalmente as poliinsaturadas, possuiu um efeito promotor na tumorigênese.

Acredita-se que a obesidade nas cadelas jovens esteja relacionada com a ocorrência dos tumores, afinal é nessa época onde ocorre uma série de modificações celulares e o crescimento da glândula mamária. Porém, o real efeito da obesidade sobre o desenvolvimento de tumores precisa ser devidamente elucidado (PEREZ, 1998).

Mesmo não estando completamente clara a correlação entre obesidade e neoplasias mamárias, acredita-se que a obesidade promova aumento da aromatase, da insulina e da IGF-1, ou seja, acredita-se que de alguma forma estes compostos possam influenciar no processo de carcinogênese (CLEARY, 2010). Contudo, a gordura do animal parece atuar mais como um promotor do que iniciador da carcinogênese (COTRAN et al., 2000).

2.6 Leptina e Neoplasias mamárias

Na célula neoplásica a leptina tem papel na inibição da apoptose e na promoção da multiplicação celular (ARTWOHL, 2002; FUJITA et al., 2002). Estudos em tumores

mamários humanos evidenciaram que a expressão de receptores para leptina no citoplasma de células tumorais possui correlação positiva correlação com o maior tamanho da massa tumoral (ISHIKAWA, 2004; GROSSMANN, 2008).

Estudo em camundongos demonstrou que animais com tumores com maiores dimensões apresentavam maiores níveis de leptina sérica, formulando a hipótese que esta substância estimula a proliferação das células neoplásicas e inibem a sua apoptose (CLEARY, 2010). Outro estudo em camundongos demonstrou maior crescimento em neoplasias tratadas com leptina (BARONE et al., 2012).

É proposto, portanto, que há uma correlação positiva entre a expressão de leptina, o aumento da expressão de receptores estrogênicos e o tamanho da neoplasia uma vez que a progressão tumoral é acentuada com a presença de hormônios estrogênicos, sendo a leptina para humanos uma possibilidade de prever a produção de hormônios sexuais, servindo como um marcador de prognóstico negativo (JARDÉ, 2011).

Em cultura de células de tumor de mama a leptina estimulou a síntese de DNA, ativando múltiplas cascatas como a Janus-activated kinase 2 traduzindo o sinal e ativando a transcrição de RNA para a produção de proteínas. (Yin et al. 2004). OKUMURA et al. (2002) relataram que a leptina induz a progressão do ciclo celular acompanhada pela regulação da ciclina dependente e ciclina D1. Em linhagens celulares T47D de tumores mamários a leptina estimulou não somente o crescimento celular mas também sua transformação (HU et al., 2002).

O papel da leptina no desenvolvimento do câncer de mama pode estar associado ao fato do hormônio potencializar a sinalização estrogênica. Especificamente em linhagens de células cancerígenas mamárias MCF-7, a leptina induziu a expressão do gene aromatase elevando a atividade da aromatase e, consequentemente, aumentando a síntese de estrógeno. Altos níveis de leptina podem inibir a degradação de receptores podendo interferir negativamente nos efeitos de algumas terapias para o câncer (CATALANO et al., 2003).

Resselet et al. (2012) realizaram estudo pioneiro verificando a expressão de leptina e seu receptor (ObR) em neoplasia mamária de cadelas. Estes autores demonstraram expressão de leptina na glândula mamária normal, nas adenoses, nos tumores benignos e uma menor expressão em neoplasias mais agressivas, com moderada ou alta diferenciação. A expressão do ObR foi inexistente no tecido normal, baixa em hiperplasias e tumores malignos e alta em adenoses, tumores benignos e carcinomas complexos. Neste mesmo trabalho o autor relata

correlação negativa entre a expressão de leptina e Obr com a invasão linfática a taxa de mitose e a distancia da metástase.

Recentemente, Limet al. (2015) demonstraram que em cadelas a expressão de leptina é maior nos carcinomas, o que contrapõe o estudo preliminar realizado. Verificaram ainda que os animais que apresentavam neoplasias mamárias com maior graduação histológica (Grau III) possuíam maior expressão de leptina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADES, L.; KERBAUY, R.R. Obesidade: realidades e indagações. Psicologia USP vol.13, n.1, São Paulo, 2002.

ARTWOHL, M.; RODEN, M.; HÖLZENBEIN, T.; FREUDENTHALER, A.; WALDHÄUSL, W.; BAUMGARTNER-PARZER, S. Modulation by leptin of proliferation and apoptosis in vascular endothelial cells. International journal of obesity, v. 26, n. 4, p. 577, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801947>

BATTAGLIA, L.; DESTEFANO, M. A.; HOFFMAN, A.; ABALI, E.E. Dysregulation of energy metabolism in obesity and its implications for cancer. Journal of Pediatric Biochemistry, v. 2, n. 03, p. 133-142, 2012.

BARONE, I.; CATALANO, S.; GELSOMINO, L.; MARSICO, S.; GIORDANO, C.; PANZA, et al. Leptin mediates tumor–stromal interactions that promote the invasive growth of breast cancer cells. Cancer research, v. 72, n. 6, p. 1416-1427, 2012.

BENÍTEZ, J.G.S.; QUIROZ, A.O.; ZERÓN, H.M.; MANUEL, L.; OLIVÁN, G. La leptina enlacarcinogénesis mamaria: vías de señalización. Química Viva, v. 11, n. 2, p. 91-111, 2012.

BESSAOUD, F.; DAURÈS, J. P.; GERBER, M. Dietary factors and breast cancer risk: a case control study among a population in Southern France. Nutrition and cancer, n.60 cap.2, pag.177-187, 2008.

BIONDI, L. R.; GENTILE, L. B.; DA SILVA REGO, A. A. M.; NORONHA, N. P.; DAGLI, M. L. Z. Canine mammary tumors in Santos, Brazil: clinicopathological and survival profile. BrazilianJournalofVeterinaryResearchand Animal Science, 2014.

BURKHOLDER, W.J.; TOLL, P.W. Obesity. In: HAND, M.S. et al. Small animal clinical nutrition. Topeka: Mark Morris Institute 4.ed., p.401-430, 2000.

CALLE, EUGENIA E.; KAKS, RUDOLF. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. NatureReviewsCancer, v. 4, n. 8, p. 579-591, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc1408>

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

CATALANO, S.; MARSICO, S.; GIORDANO, C.; MAURO, L.; RIZZA, P.; PANNO, M. L.; ANDÒ, S. Leptin enhances, via AP-1, expression of aromatase in the MCF-7 cell line. JournalofBiologicalChemistry, v. 278, n. 31, p. 28668-28676, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M301695200>

- CIRILLO, D.; RACHIGLIO, A. M.; LA MONTAGNA, R.; GIORDANO, A.; NORMANNO, N. (2008). Leptin signaling in breast cancer: an overview. *Journal of cellular biochemistry*, v. 105, n. 4, p. 956-964, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcb.21911>
- COTRAN R.S. et al. T. Neoplasia, Robbins'. *Patologia Estrutural e Funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.233-295, 2000.
- CLEARY, M. P. Effect of obesity on breast cancer development. In A. e. ASVCP (Ed.), *Concurrent Annual Meetings*, Savannah, Georgia, USA, pg.10-14, 2007.
- CLEARY, M.P.; GROSSMANN, M.E.; RAY, A. Effect of obesity on breast cancer development. *Veterinary Pathology* vol.47 n.2 p.202-213, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985809357753>
- CONSIDINE, R. V. et al. Serum immunoreactive leptin concentrations in normal weight and obese humans. *New England Journal of Medicine*, v. 334, p. 292-295, 1996. <https://doi.org/10.1056/NEJM199602013340503>
- CUI, Y.; ZHANG, M.; PESTELL, R.; CURRAN, E.M.; WELSHONS, W.V.; FUQUA, S.A. Phosphorylation of estrogen receptor alpha blocks its acetylation and regulates estrogen sensitivity. *Cancer Res*, v. 64, n. 24, p. 9199-9208, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2126>
- DALECK, C. R.; NARDI, A. B.; RODASKI, S. *Oncologia em Cães e Gatos*. São Paulo, ROCCA, p.612, 2009.
- DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; COSTA, T. A.; MACEDO, T. R.; RODIGHIERI, S. M. et al. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamento em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. *Archives of Veterinary Science*, v. 7, n. 2, p. 15-26, 2002. DOI: <https://doi.org/10.5380/avs.v7i2.3977>
- EUGENIA, F.V.V.M. Señalización de la Leptina. *Revista de Educación Bioquímica*. p. 50, 2006.
- FLEMING, N.M.; ROBINSON, T.; THOMSON, B.; GRAETZ, N.; MARGONO, C. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 n.38, pag. 81-766, 2014.
- FRIEDMAN, J.M.; HALAAS, J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. vol.395 n.6704 p.70-763, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1038/27376>
- FUJITA, Y.; MURAKAMI, M.; OGAWA, Y.; MASUZAKI, H.; TANAKA, M.; OZAKI, S. ET AL. Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 128, n. 1, p. 21-26, 2002.
- GAROFALO, C.; SURMACZ, E. Leptin and cancer. *J Cell Physiol*, v.207, n.1, p.12-22, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.20472>
- GERMAN, A.J. The growing problem of obesity in dogs and cats. *Journal of Nutrition*, v.136, p.1940-1946, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/136.7.1940S>
- GERMAN, A. J. et al. Improvement in insulin resistance and reduction in plasma inflammatory adipokines after weight loss in obese dogs. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 27, p. 214-226, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2009.07.001>

- GERMAN, A.J.; RYAN, V.H.; GERMAN, A.C.; WOOD, I.S.; TRAYHURN, P. Obesity, its associated disorders and the role of inflammatory adipokines in companion animals. *The Veterinary Journal*, v. 185, p. 4-9, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.04.004>
- GOSMIDE, P. R. S.; BRANDÃO, C. V. S.; RANZANI, J. J. T. et al. Estudo retrospectivo de cadelas portadoras de neoplasias mamárias submetidas à mastectomia. Botucatu, CAD, 2009.
- GROSSMANN, M. E.; NKHATA, K. J.; MIZUNO, N. K.; RAY, A.; CLEARY, M. P. Effects of adiponectin on breast cancer cell growth and signaling. *British journal of cancer*, v. 98, n. 2, p. 370, 2008.
- HAVEL, P.J.; KASIM-KARAKAS, S.; MUELLER, W.; JOHNSON, P.R.; GINGERICH, R.L.; STERN, J.S. Relationship of plasma leptin to plasma insulin and adiposity in normal weight and overweight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*. V.81 n.12 p.13, 1996.
- HU, X.; JUNEJA, S.C.; MAIHLE, N.J.; CLEARY, M.P. Leptin - a growth factor in normal and malignant breast cells and for normal mammary gland development. *J Natl Cancer Inst*. v.94, n.22, p.11-1704, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/94.22.1704>
- ISHIKAWA, M.; KITAYAMA, J.; NAGAWA, H. Enhanced expression of leptin and leptin receptor (OB-R) in human breast cancer. *Clin Cancer Res*. v.10, p.31-4325, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0749>
- JARDÉ, T.; CALDEFIE-CHE´ZET, 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*, vol.16, pag.1197–1210, 2009.
- JARDÉ, T.; PERRIER, S.; MARIE-PAULE, V.; CALDEFIE-CHE´ZET, F. Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer, *European Journal of cancer*, vol.4, n.7, p.33-43, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.09.005>
- JERICÓ, M. M.; SCHEFFER, K. C. Aspectos epidemiológicos dos cães obesos na cidade de São Paulo. *Clínica Veterinária*, ano VII, n. 37, p. 25- 29, 2002.
- KIENZLE, E.; BERGLER, R.; MANDERNACH, A. A comparison of feeding behavior and the human-animal relationship in owners of normal and obese dogs. *Journal Nutrition*, Bethesda, v.128, n.12, p. 2779-2782, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/128.12.2779S>
- LAFLAMME, D.P. Understanding and managing obesity in dogs and cats., *Veterinary Clinical North American Small Animal Practice*, v.36 n.6, p.1283-1295, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2006.08.005>
- LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J. e VAIL, D.M. (Eds). *Withrow e MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. St. Louis, 4.ed., p.619-636, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-072160558-6.50029-0>
- LIM a, H.Y. et al. Effects of obesity and obesity-related molecules on canine mammary gland tumors. *Veterinary pathology*, v. 52, n. 6, p. 1045-1051, 2015a.
- LIM, H. Y. et al. Obesity, expression of adipocytokines, and macrophage infiltration in canine mammary tumors. *The Veterinary Journal*, v. 203, n. 3, p. 326-331, 2015b. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.01.005>
- MANTZOROS, C.S.; MAGKOS, F.; BRINKOETTER, M.; SIENKIEWICZ, E.; DARDENO, T.A.; KIM, S.Y. et al. Leptinin human physiology and pathophysiology. *American Journal of*

Physiology-Endocrinology And Metabolism. v.301, n.4, p.84-567, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00315.2011>

MARTIN, L. et al. Leptin, body fat content and energy expenditure in intact and gonadectomized adult cats: a preliminary study. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 85, p. 189 – 194, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0396.2001.00322.x>

MONTILLA, R.N.G. et al. Avaliação do estado nutricional e do consumo alimentar de mulheres no climatério. *Revista de Associação Médica Brasileira*, v.49, n.1, p.91-95, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-42302003000100040>

NGUYEN, P.; DIEZ, M. Obesity: epidemiology, pathophysiology and management of the obese dogs. In: PIBOT, P; BIORGE, V; ELLIOT, D. *Encyclopedia of Canine Clinical Nutrition*, v.1, p. 2-43, 2006.

MULLER, D.C.M.; SCHOSSLER, J.E.; PINHEIRO, M. Adaptação do índice de massa corporal humano para cães. *Cienc. Rural*, Santa Maria, v.38, n.4, p.1038-1043, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000400020>

OKUMURA, M.; YAMAMOTO, M.; SAKUMA, H.; KOJIMA, T.; MARUYAMA, T.; JAMALI, M. et al. Leptin and high glucose stimulate cell proliferation in MCF-7 human breast cancer cells: reciprocal involvement of PKC- α and PPAR expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, v. 1592, n. 2, p. 107-116, 2002.

OLIVEIRA FILHO, J. C.; KOMMERS, G. D.; MASUDA, E. K. et al. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. n. 30, v. 2, p. 177-185, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010000200014>

PEREZ, A.D.; RUTTEMAN, G.R.; PENA, L.; BEYNEN, A.C.; CUESTA, P. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, Lakewood, v. 12, n. 3, p. 132-139, 1998.

RACHIGLIO, A.M.; CIRILLO, D, L.A. MONTAGNA, R. GIORDANO, A. NORMANNO, N. Leptin signaling in breast cancer: an overview. *J Cell Biochem.*; vol.105, n.4, p.64-956, 2008.

RADIN, M. J.; SHARKEY, L. C.; HOLYCROSS, 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. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2009.00133.x>

RESSEL, L.; FINETELLO, R.; INNOCENTI, V.W.; VANNOZZI, I.; POLE, A. Preliminary report on the expression of leptin and leptin receptor (ObR) in normal, hyperplastic and neoplastic canine mammary tissues. *Research in veterinary science*, v. 93, n. 1, p. 343-349, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.07.020>

RICCI, R.; BEVILACQUA, F. The potential role of leptin and adiponectin in obesity: a comparative review. *Veterinary Journal*, v.191 n.3 p.0-292, 2012.

SCHWARTZ, M.W.; PRIGEON, R.L.; KAHN, S.E.; NICOLSON, M.; MOORE, J.; MORAWIECKI, A. et al. Evidence that plasma leptin and insulin levels are associated with body adiposity via different mechanisms. *Diabetes Care*. v.20 n.9 p.1476-81, 1997. DOI: <https://doi.org/10.2337/diacare.20.9.1476>

SONNENSCHN, E. G.; GLICKMAN, L. T.; GOLOSCHMIOT, 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, p.694-703, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a115944>

TORÍBIO, J.M.M.L.; LIMA, A. E.; FILHO, E. F. M.; RIBEIRO, L. G. R.; D'ASSIS, M. J. M. H.; TEXEIRA, R. G.; DAMASCENO, K. A.; CASSALI, G. D.; NETO, J. M. C. Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de Salvador, Bahia. *Revista Ceres*, v. 59, n.4, p. 427-433, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2012000400001>

WILLETT, W. Diet and Cancer. *The Oncologist*, v.5, p.393-404, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.5-5-393>

YAMAGAMI, T.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, K.; SUGIYAMA, M. Prognosis for canine Malignant Mammary Tumors Based on TNM and Histologic Classification. *J. of Vet. Med. Sci.*, v. 58, n. 11, p. 1079-1083, 1996. DOI: https://doi.org/10.1292/jvms.58.11_1079

YIN, N.; WANG, D.; ZHANG, H.; YI, X.; SUN, X.; SHI, B. et al. Molecular mechanisms involved in the growth stimulation of breast cancer cells by leptin. *Cancer research*, v. 64, n. 16, p. 5870-5875, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0655>

ZORAN, L.D. Obesity in Dogs and Cats: A Metabolic and Endocrine Disorder. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.40, p. 39-221, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.10.009>

ZUCCARI, D.A.P.C.; SANTANA, A.E; ROCHA, N.S. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e as histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science*, v. 38, n.1, p.38-41, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-95962001000100007>

CAPÍTULO 2

ARTIGO:

A SER SUBMETIDO NA REVISTA:

SEMINA: CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EXPRESSÃO DE LEPTINA E RECEPTOR DE LEPTINA EM CARCINOMAS MAMÁRIOS DE CADELAS OBESAS

Resumo

Na espécie humana e em cadelas a obesidade é considerada fator de risco no desenvolvimento de neoplasias mamárias e a leptina é um hormônio liberado por adipócitos que estimula a proliferação de células cancerosas. Objetivou-se através do estudo verificar a expressão da leptina e seu receptor em carcinomas mamários de cadelas, por meio da técnica de imunohistoquímica e correlacionar esta expressão com a obesidade, tamanho do tumor, idade, tipo e grau histológico. Relacionou-se ainda obesidade com tamanho do tumor, idade e grau histológico. Foram utilizadas 84 cadelas, submetidas à exérese cirúrgica de carcinomas mamários, totalizando 95 amostras de carcinomas simples e complexo que foram submetidas à avaliação imunohistoquímica para a expressão de leptina e seu receptor. Carcinomas complexos corresponderam a 41% das amostras (39/95) e 59% carcinomas simples (56/95). Quanto ao índice de massa corporal dos cães (IMCC) 9,52% estavam abaixo do peso (8/84), 29,76% estavam dentro do peso ideal (25/84), 33,33% se encontravam acima do peso (28/84) e 27,39% estavam obesas (23/84) no momento da mastectomia. Observou-se que a idade dos animais obesos com carcinomas mamários era menor e que animais obesos eram portadores de tumores com maiores tamanhos quando comparados à aqueles com outras condições corporais. A expressão de leptina não está diretamente relacionada ao IMCC, porém a expressão de ObR foi maior ($p<0.05$) em cadelas com maiores valores de IMCC. Houve correlação entre idade e expressão de leptina indicando que animais mais velhos são portadores de tumores que expressam leptina com maior frequência. A obesidade pode ser considerada fator de risco para carcinomas mamários em cadelas uma vez que cadelas obesas apresentam carcinomas mamários mais precocemente e massas tumorais de maior tamanho. Ainda, a expressão de Obr é maior em carcinomas de cadelas obesas.

Palavras chaves: Leptina, Obr, Neoplasia mamária, Obesidade, Fator de risco, Canino.

Abstract

In humans and bitches obesity is considered a risk factor in the development of breast cancer. Leptin is a hormone synthesized by adipocytes that stimulates the proliferation of cancer cells. The objective of this study was to verify the expression of leptin and its receptor in mammary carcinomas of bitches by means of the immunohistochemical technique and to correlate this expression with obesity, tumor size, age, type and histological grade. Obesity was also related to tumor size, age and histological grade. We used 84 bitches, submitted to surgical excision of

mammary carcinomas, totaling 95 samples of simple and complex carcinomas that were submitted to immunohistochemical evaluation for the expression of leptin and its receptor. Complex carcinomas corresponded to 41% of the samples (39/95) and 59% simple carcinomas (56/95). The body mass index of dogs (BMI), 9.52% were underweight (8/84), 29.76% were within ideal weight (25/84), 33.33% were overweight (28/84) and 27.39% were obese (23/84) at the time of mastectomy. It was observed that the age of the obese animals with mammary carcinomas was smaller and that obese animals were carriers of tumors with larger sizes when compared to those with other classifications of body conditions. The expression of leptin was not directly related to the BMI, but the expression of ObR was higher ($p < 0.05$) in bitches with higher BMI values. There was a correlation between age and leptin expression indicating that older animals express leptin more frequently. Obesity may be considered a risk factor for breast carcinomas in bitches, once with obese female dogs present early breast carcinomas and tumor masses of larger size. Moreover, the expression of ObR is greater in carcinomas of obese bitches.

Key words: Leptin, ObR, Breast carcinomas, Obesity, Risk factor, Bitches.

Introdução

O tumor de mama é a neoplasia mais freqüente em cadelas (SILVA et al., 2004) e estudos de diversos países relatam frequência de tumores malignos variando de 20 a 80% (GOLDSCHMIDT et al., 2017). No Brasil, a incidência de tumores malignos em cadelas é maior, variando de 89,4% a 91,7% (TORÍBIO et al., 2012; BIONDI et al., 2014).

Em mulheres, a obesidade é considerada fator de risco no desenvolvimento de neoplasias mamárias (BESSAOU; DAURÈS, 2008), assim como em cadelas jovens (SONNENSCHNEIN et al., 1991), pois após a puberdade a glândula mamária apresenta variações cíclicas influenciadas pelos hormônios femininos (NOGUEIRA; CASTRO, 2017).

A associação entre câncer de mama e obesidade não é totalmente compreendido, mas sugere-se que o aumento do risco de câncer de mama em mulheres obesas ocorra em função da exposição ao estrogênio ao longo da vida, já que este hormônio sexual é importante na iniciação e progressão das lesões de câncer de mama (CARMICHAEL; BATES, 2004). Estrogênio e progesterona afetam a taxa de divisão celular que provoca a proliferação das células epiteliais da glândula mamária. As células em proliferação podem sofrer erros genéticos durante a replicação do DNA que, se não corrigidos, podem levar ao fenótipo de malignidade. Em mulheres pós-menopausa, o principal fonte de estrogênio é a conversão do precursor de andrógenos androstenediona em estrogênio no tecido adiposo periférico; quanto maior a quantidade de tecido adiposo, maior a conversão e, portanto, maior a exposição das células mamárias ao estrogênio (LA GUARDIA; GIAMMANCO, 2001)

A leptina é um hormônio liberado por adipócitos que estimula a proliferação de células cancerosas pelo aumento na síntese de aromatase (JARDE et al., 2008) e, nos humanos e cães, os níveis de leptina circulante estão associados ao acúmulo de adipócitos. Pode ainda ocorrer o aumento dos níveis de estrógeno no tecido neoplásico ocasionado pela biossíntese intratumoral mediada pela secreção da aromatase citocromo P450 pelos adipócitos e células cancerosas (MIKI et al., 2007).

Aumento na concentração de leptina, adiponectina, estrógeno e insulin-like growth factor-1 (IGF-1), tem sido associados ao câncer de mama (LORINCZ; SUKUMAR, 2006) e, em mulheres, as concentrações de aromatase estão aumentadas em obesas (BULUN et al., 2012). Estudos em humanos evidenciaram maior expressão de receptores para leptina e superexpressão de leptina em células neoplásicas de carcinoma mamário quando comparados com epitélio normal (ISHIKAWA, 2004), além de existir correlação positiva entre a expressão de leptina, o aumento da expressão de receptores estrogênicos e o tamanho da neoplasia (JARDÉ, 2011). Assim, sugere-se que a obesidade possa estimular o desenvolvimento do carcinoma mamário em mulheres e cadelas pela contínua síntese de estrógeno e estimulação de seus receptores (LIM et al., 2015b).

Até o momento, há escassez de estudos em cadelas envolvendo obesidade e o papel da leptina e seu receptor com a ocorrência de carcinomas mamários, e nenhum foi capaz de elucidar a correlação entre estes fatores. Ressel et al. (2012) demonstrou menor expressão de leptina em neoplasias mais agressivas com moderada ou alta diferenciação, porém estes autores não verificaram correlação entre escore corporal e expressão de leptina. Por outro lado, recentemente, Lim et al. (2015a) demonstraram que a expressão de leptina é maior nos carcinomas em cadelas .

Assim, pela alta frequência de neoplasias mamárias e obesidade na população canina, objetivou-se verificar a expressão da leptina e seu receptor em carcinomas mamários de cadelas, por meio da técnica de imunohistoquímica e correlacionar esta expressão com a obesidade, tamanho do tumor, idade, tipo e grau histológico. Relacionou-se ainda obesidade com tamanho do tumor, idade e grau histológico.

Material e métodos

Animais

Foram incluídas no estudo cadelas de várias idades e raças, portadoras de tumores de mama, encaminhadas voluntariamente ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, no período de Janeiro de 2014 a Dezembro de 2015.

Durante a avaliação clínica determinou-se o IMCC (Índice de Massa Corporal Canina) de cada paciente, de acordo com Muller et al. (2008). O peso das cadelas foi aferido em balança digital com capacidade de até 100 quilos e com auxílio de fita métrica foi mensurado o comprimento da coluna vertebral e comprimento dos membros pélvicos, sendo a soma destes comprimentos a altura do

109 animal a ser utilizado na fórmula $IMCC = \text{peso} / \text{altura}^2$. Os animais foram distribuídos de acordo com
 110 o IMCC em: abaixo do peso ideal, dentro do peso ideal, acima do peso e obesos.

111 Dados clinicopatológicos, tais como idade, raça, características tumorais (tamanho, ulceração,
 112 consistência) foram coletados. Os tumores foram agrupados de acordo com o tamanho em T1
 113 (tumores até 3,0 cm), T2 (3,1 a 5,0 cm) e T3 (tumores maiores que 5,0 cm), segundo Owen (1980).

114 Após avaliação clínica e a critério médico veterinário, as cadelas foram submetidas à exérese
 115 cirúrgica dos tumores.

116

117 Classificação e análise dos tumores

118 Fragmentos de tumores mamários foram fixados em solução de formol 10% tamponado,
 119 desidratados, parafinizados e rotineiramente processados para confecção de lâminas histológicas.

120 As amostras foram analisadas em microscopia de luz e classificadas histologicamente segundo
 121 Misdorp et al. (1999). Foram selecionados somente os casos de carcinoma mamário e estes foram
 122 agrupados de acordo com o tipo histológico em carcinomas complexos e simples. O grau
 123 histológico dos carcinomas mamários foi atribuído de acordo com o sistema Nottingham,
 124 modificado por Elston e Ellis (1991).

125

126 Imunohistoquímica

127 Para verificação da expressão de leptina e seu receptor (ObR), cortes de carcinoma mamário de
 128 aproximadamente cinco μm foram obtidos, desparafinizados em xilol, hidratados em séries
 129 crescentes de etanol e reidratados utilizando água destilada. A recuperação antigênica foi feita
 130 utilizando-se tampão citrato (pH 6,0), em panela de pressão, por 10 min. O bloqueio da peroxidase
 131 foi realizado utilizando dois banhos de água oxigenada a 10%, durante 10 min. O bloqueio das
 132 proteínas endógenas foi feito utilizando ProteinBlock (Dako®, Glostrup, Denmark), durante 30
 133 min. Anticorpo primário anti-leptina (Reahbiotech®, Campinas, São Paulo) foi diluído na
 134 concentração de 1/600, assim como anticorpo anti-ObR (Reahbiotech®, Campinas, São Paulo) e
 135 incubados overnight por 18 horas. Como sistema de revelação utilizou-se anticorpo secundário
 136 biotilado e streptavidinaperoxidase (kit LSAB - Dako®), 30 minutos cada. As lâminas foram
 137 cuidadosamente lavadas com solução de TRIS (pH 7,6) entre cada etapa. A reação foi revelada com
 138 cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB - Dako®) e as lâminas contra coradas com hematoxilina,
 139 desidratadas e montadas.

140 Como controle positivo utilizou-se cérebro de camundongo e tecido adiposo de canino e como
 141 controle negativo da reação substituiu-se o anticorpo primário por diluente de anticorpo.

142 A expressão de leptina e ObR foi realizada por dois patologistas, como proposto por Galofaro et al.
 143 (2006) e Ressel et al. (2012).A amostra foi considerada positivaquando mais de 5% das células
 144 apresentaram marcação citoplasmática, no caso de leptina, e de membrana no caso do ObR.

145

146 Análise estatística

147 Teste de correlação de Person foi utilizado para correlacionar os valores de IMCC com a idade e o
 148 tamanho tumoral. Teste de Man Whitney foi utilizado para verificar a relação entre IMCC, tipo e
 149 grau histológico e marcação imunohistoquímica, além de correlacionar a marcação de leptina e Obr
 150 com tamanho do tumor e idade das cadelas. O teste Binomial foi utilizado afim de comparar a
 151 marcação imunohistoquímica entre os diferentes tipos e graus histológicos.Todas as análises foram
 152 realizadas com o programa estatístico Bioestat para Windows e considerou-se o nível de
 153 significância de 5% ($p \leq 0,05$).

154

155 **Resultados e Discussão**

156 Em relação ao número amostral foram estudadas 95 amostras de carcinoma mamário provenientes
 157 de 84 cadelas, sendo a média de idade das cadelas $10,23 \pm 2,5$, variando de quatro a 17anos. Quanto
 158 à classificação histológica, 41,05% dos tumores eram carcinomas complexos (39/95) e 58,95%
 159 carcinomas simples (56/95).

160 Quanto ao IMCC, 9,52%(8/84) das cadelas estavam abaixo do peso, 29,76% (25/84)estavam dentro
 161 do peso ideal, 33,33% (28/84)se encontravam acima do peso e 27,39% (23/84)estavam obesas.
 162 Assim, as cadelas abaixo do peso ou em peso ideal corresponderam a 39,28 % dos animais (33/84)
 163 e 60,72% (51/84) estavam acima do peso ou obesas. Apesar da caquexia ser considerada a síndrome
 164 paraneoplásica mais comum em medicina veterinária, com incidência em torno de 25% em diversas
 165 neoplasias (BERGMAN, 2013) e indicativa de doença avançada e prognóstico desfavorável
 166 (FINORA, 2003), a maioria das cadelas portadoras de carcinoma mamário estavam acima do peso
 167 ou obesas. Lim et al. (2015) também relataram 46% das cadelas com carcinomas mamários acima
 168 do peso.

169 Na espécie humana a obesidade tem sido associada ao aumento de 30 a 50% na taxa de câncer de
 170 mama em mulheres pós-menopausa (CALLE; RUDOLF, 2004) e mulheres com alto índice de
 171 massa corporal apresentam 1,9 mais chances de serem acometidas por uma neoplasia mamária
 172 (BESSAoud; DAURÈS, 2008). Entretanto esta predisposição não está muito bem caracterizada
 173 em animais (CLEARY, 2010). Sonnenschein et al. (1991) relataram que cadelas que eram magras
 174 aos 9-12 meses de idade tiveram menor risco de desenvolverem neoplasia mamária.

175 O efeito da obesidade no desenvolvimento, progressão e prognóstico dos tumores mamários estão
 176 relacionados ao acúmulo de tecido adiposo e secreção de fatores de crescimento para a glândula

177 mamária, como estrógeno e leptina, e a exposição do tecido mamário principalmente ao estrógeno
178 pode levar ao desenvolvimento de tumores mamários em cães e humanos (CLEMONS, 2001;
179 MARTINELLI, 2004).

180 No presente estudo a média de idade das cadelas obesas foi de 9,5 anos e Nguyen (2006) e
181 Laflamme (2006) relataram que animais de meia idade a idosos são mais predispostos a obesidade.

182 Outro dado interessante, observado no presente estudo, foi que as cadelas com carcinoma mamário
183 que eram obesas apresentaram menor média de idade (9,5 anos) (Tabela 1), ou seja, cadelas obesas
184 apresentam tumores mamários mais precocemente quando comparadas com cadelas acima do peso,
185 no peso ideal e abaixo do peso.

186 LIM et al. (2015a) e LIM et al. (2015b) também verificaram que a idade de manifestação do
187 carcinoma mamário era menor em cadelas com sobrepeso e obesas do que em cadelas magras ou
188 com peso ideal e associaram o excesso de tecido adiposo ao início e desenvolvimento de tumores
189 mamários em cadelas. O tecido adiposo influencia a síntese e biodisponibilidade de estrógeno,
190 progesterona e andrógenos por vários mecanismos. Um destes mecanismos está relacionado à
191 expressão de várias enzimas metabolizadoras de esteróides sexuais pelo tecido adiposo que atuam
192 sobre precursores estrogênicos e androgênicos secretados pelas gônadas e adrenal. O tecido adiposo
193 é o principal local de síntese de estrógeno em mulheres pós-menopausa e o IMC é diretamente
194 relacionado aos níveis de estradiol circulante (KEY et al., 2001). O estrógeno promove o
195 crescimento celular por estimular a liberação do fator de necrose tumoral α e do fator de
196 crescimento semelhante à insulina e por inibir o fator de necrose tumoral β (NORMAN &
197 LITWACK, 1997).

198 Outro mecanismo está ligado à secreção de várias citocinas e hormônios, como leptina,
199 adiponectina, IGF-1, fator de necrose tumoral α e aromatase pelo tecido adiposo que influenciam as
200 células epiteliais da glândula mamária (LAFLAMME, 2006; ZORAN, 2010).

201 Houve correlação entre obesidade e tamanho tumoral, sendo que a média do tamanho dos tumores
202 nos animais obesos era maior que a média em cães abaixo do peso e com peso ideal (Figura 3). A
203 obesidade pode estimular o desenvolvimento do carcinoma mamário em mulheres e cadelas pela
204 contínua síntese de estrógeno e estimulação de seus receptores (LIM et al., 2015) e o estrógeno e
205 progesterona afetam a taxa de divisão celular que provoca a proliferação das células epiteliais da
206 glândula mamária (CARMICHAEL, BATES, 2004), levando à ocorrência de tumores maiores em
207 cães obesos.

208 Em um estudo previamente realizado em cadelas, foi constatado que no grupo de cadelas com
209 sobrepeso ou obesas havia maior número de animais com tumores grau I (LIM et al., 2015a). No
210 presente estudo 47,61% (20/42) dos animais obesos possuíam tumores grau I, enquanto 45,22%

(19/42) possuíam tumores grau II. Apesar da maioria dos tumores serem grau I não houve diferença estatística entre o número de tumores com grau I e II ($p < 0,05$).

Com relação a expressão de leptina, 46 amostras (48,42%) foram positivas e 49 (51,58) negativas, valores semelhantes aos relatados por Lim et al. (2015) que observaram 48.2% dos carcinomas mamários de cadelas expressando leptina e Ressel et al. (2012) que verificaram 34%. Estes autores também relataram que as células neoplásicas malignas apresentavam menor nível de expressão de leptina quando comparados com tecido mamário normal e lesões mamárias benignas.

Não houve correlação entre a expressão de leptina e IMCC, assim como observado por Lim et al. (2015^a), Lim et al. (2015b) e Ressel et al. (2012). Dittrish et al. (2016) verificou correlação entre os níveis de leptina sérica e o IMC canino ou o escore de condição corporal, entretanto esta relação parece não se aplicar à expressão de leptina no tumor mamário de cadelas.

Com relação à expressão de Obr, 52 amostras (54,73%) foram positivas e 43 (45,27%) foram negativas, valores semelhantes aos relatados por Lim et al. (2015a) que verificaram 57,1% de positividade e Ressel et al. (2012) verificaram 62,06 % dos carcinomas positivos. Neste estudo verificou-se que de acordo com o aumento dos valores de IMCC a proporção de positivos para o receptor Obr aumenta enquanto a proporção de negativos diminui, ou seja, animais obesos possuem maior quantidade de tumores positivos para o receptor de leptina, sugerindo que a obesidade pode levar a uma maior expressão de receptores para leptina.

Dentro do grupo de cadelas obesas do estudo (23/84), 10 cadelas apresentaram tumores maiores que cinco centímetros e destes 70% (7/10) expressaram receptor para leptina. Dittrish et al. (2016) verificaram que cadelas com maior IMCC apresentavam maiores níveis de leptina sérica. Baseado nesta informação é possível que os maiores níveis de leptina sérica e maior expressão de receptores para leptina possa influenciar a proliferação de células cancerosas e resultar em tumores maiores. A leptina é um hormônio liberado por adipócitos que estimula a proliferação de células cancerosas pelo aumento na síntese de aromatase (JARDE et al., 2008)

Com relação à marcação imunohistoquímica da leptina e características clinicopatológicas, verificou-se que o número de animais com tumores positivos para leptina aumenta de acordo com a idade, assim como relatado por Lim et al. (2015a) que verificaram que conforme a idade do animal aumentava havia aumento da expressão intratumoral de leptina.

Com relação à expressão de leptina e sua correlação com tamanho tumoral no presente trabalho não verificou-se correlação entre estas variáveis, assim como observado por Ressel et al. (2012) e Lim et al. (2015a) na espécie canina. Em humanos a expressão de leptina possui correlação positiva com o maior tamanho da massa tumoral (ISHIKAWA, 2004; NKHATA, 2008).

244 Em relação aos carcinomas complexos 42,52%% (20/43) são positivos para leptina enquanto os
 245 carcinomas complexos 50,00% (26/52) apresentam a expressão do hormônio. Estudos prévios em
 246 amostras de neoplasias mamárias de cadelas demonstraram que a expressão de receptor de leptina é
 247 maior em tumores malignos quando comparado aos benignos (LIMet al. b) em mulheres, cerca de
 248 83% dos carcinomas mamários expressam Obr (ISHIKAWA et al. 2004).
 249 Não houve correlação entre o tipo e grau histológico e a expressão de leptina e Obr (Tabela 2).
 250 Ressel et al. (2012) relataram que 70% de carcinomas complexos foram positivos para leptina e
 251 apenas 15% dos carcinomas simples foram positivos, e com relação ao Obr 88% dos carcinomas
 252 complexos expressaram Obr. Lim et al. (2015a) observaram que carcinomas grau I expressavam
 253 leptina com maior frequência.

254

255 **Conclusão**

256 A obesidade pode ser considerada fator de risco para carcinomas mamários em cadelas uma vez que
 257 cadelas obesas apresentam carcinomas mamários mais precocemente e massas tumorais de maior
 258 tamanho. Ainda, carcinomas de cadelas mais velhas expressam leptina, porém não há relação entre
 259 expressão de leptina e obesidade. Já a maior expressão de Obr em carcinomas de cadelas obesas
 260 pode influenciar no desenvolvimento tumoral.

261

262 **Referências bibliográfica**

- 263 ASHWELL, C. M. Hormonal regulation of leptin expression in broiler chickens. American Journal
 264 of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, n.1, p.276, 1999. DOI:
 265 <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.276.1.R226>
- 266 BERGMAN, P.J. Paraneoplastics syndromes. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. Small
 267 Animal Clinical Oncology.. Philadelphia, 5.ed, cap.5, p.83-97, 2013. DOI:
 268 <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-2362-5.00005-0>
- 269 BLAND, I.M.; GUTHRIE-JONES, A.; TAYLOR, R.D. et al. Dog obesity: owner attitudes and
 270 behaviour. Preventive Veterinary Medicine, Shannon, v. 92, n.4, p.330-340, 2009.
- 271 BULUN, S.E., CHEN, D., MOY, I., BROOKS, D.C., ZHAO, H. 2. Aromatase, breast câncer and
 272 obesity: A complex interaction. Trends in Endocrinology and Metabolism n.23, p.83–89, 2012.
 273 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.10.003>
- 274 CARMICHAEL, A.R.; BATES T. Obesity and breast cancer: a review of the literature. The Breast,
 275 n.13, 85–92, 2004.
- 276 DITTRICH, G.; BROOCKE, G. M. V. D.; SOUSA, M. G. S.; TOSTES, S. Correlation between
 277 canine serum leptin, body mass index and body fat percentage in dogs XIV Congresso Paulista de
 278 Clínicos Veterinários de Pequenos Animais - CONPAVEPA - São Paulo-SP, anais, 2016.
- 279 EUGENIA F.V.V.M. Señalización de la Leptina. Revista de Educación Bioquímica; p. 50, 2006.

- 280 EUGENIA E. C.; RUDOLF , K. Nature Reviews. Cancer volume 4. p.579-591, 2004. DOI:
281 <https://doi.org/10.1038/nrc1408>
- 282 FINORA, K. Common paraneoplastic syndromes. Clinical Techniques Small Animal Practice,
283 v.18, p.123-126, 2003. DOI <https://doi.org/10.1053/svms.2003.36629>
- 284 FRIEDMAN, J.M.; HALAAS, J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals.
285 Nature.vol.395 n.6704, p.70-763, 1998.DOI: <https://doi.org/10.1038/27376>
- 286 GAROFALO, C.; SURMACZ, E. Leptin and cancer. J. Cell. Physiol., v.207, n.1, p.12-22, 2005.
287 DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.20472>
- 288 HU, X.; JUNEJA, S.C.; MAIHLE, N.J.; CLEARY, M.P. Leptin - a growth factor in normal and
289 malignant breast cells and for normal mammary gland development. J. Natl. Cancer Inst. v.94, n.22,
290 p.11-1704, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/94.22.1704>
- 291 ISHIKAWA, M.; KITAYAMA, J.; NAGAWA, H. Enhanced expression of leptin and leptin
292 receptor (OB-R) in human breast cancer. Clin Cancer Res. v.10, p.31-4325, 2004. DOI:
293 <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0749>
- 294 JARDE, T.; CALDEFIE-CHEZET, F.; DAMEZ, M. Leptin and leptin receptor involvement in
295 cancer development: a study on human primary breast carcinoma. Oncol. Rep. V.19 n.4, p.905-911,
296 2008. DOI: <https://doi.org/10.3892/or.19.4.905>
- 297 JERICÓ, M. M.; SCHEFFER, K. C. Aspectos epidemiológicos dos cães obesos na cidade de São
298 Paulo. Clínica Veterinária, ano VII, n. 37, p. 25- 29, 2002.
- 299 KEY, T. J.; ALLEN, N. E.; VERKASALO, P. K.; BANKS, E. Energy balance and cancer: the role
300 of sex hormones. Proc. Nutr. Soc. n.60, p.81-89, 2001.DOI: <https://doi.org/10.1079/PNS200068>
- 301 KIM H.S. Leptin and leptin receptor expression in breast cancer.Cancer Res. Treat.v.41, n.3,
302 p.63,2009. DOI: <https://doi.org/10.4143/crt.2009.41.3.155>
- 303 KOJIMA, H. et al. Apoptosis of pregnancy-dependent mammary tumor and transplantable
304 pregnancy-dependent mammary tumor in mice. Cancer. Lett. v.110, p.113-121, 1996. DOI:
305 [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(96\)04469-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(96)04469-2)
- 306 LAFLAMME, D.P. Understanding and managing obesity in dogs and cats. Vet Clin North Am
307 Small Anim Pract; n.36 v.6, p.1283-1295, 2006. DOI:
308 <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2006.08.005>
- 309 LA GUARDIA M, GIAMMANCO M. Breast cancer and obesity. Panminerva Med. n.43, v.2,
310 p.123-33, 2001.
- 311 LIM , H. Y.et al. Effects of obesity and obesity-related molecules on canine mammary gland
312 tumors. Veterinary pathology, v. 52, n. 6, p. 1045-1051, 2015a.
- 313 LIM, H. Y. et al. Obesity, expression of adipocytokines, and macrophage infiltration in canine
314 mammary tumors. The Veterinary Journal, v. 203, n. 3, p. 326-331, 2015b. DOI:
315 <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.01.005>
- 316 LORINCZ, A.M.; SUKUMAR, S. Molecular links between obesity and breast cancer. Endocrine-
317 Related Cancer v.13, p. 279-292, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1677/erc.1.00729>

- 318 MIKI Y, SUZUKI T, TAZAWA C. Aromatase localization in human breast cancer tissues: possible
319 interactions between intratumoral stromal and parenchymal cells. *Cancer Res.* v.67, n.8, p.3945-
320 3954, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3105>
- 321 MIYOSHI, Y.; FUNAHASHI, T.; TANAKA S. High expression of leptin receptor mRNA in
322 breast cancer tissue predicts poor prognosis for patients with high, but not low, serum leptin levels.
323 *Int. J. Cancer.* v.118, n.6, p.1414–1419, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.21543>
- 324 MONTILLA, R.N.G. et al. Avaliação do estado nutricional e do consumo alimentar de mulheres no
325 climatério. *Revista de Associação Médica Brasileira*, v.49, n.1, p.91-95, 2003. DOI:
326 <https://doi.org/10.1590/S0104-42302003000100040>
- 327 MULLER, D. C. M.; SCHOSSLER, J. E. ; PINHEIRO, M. Adaptação do índice de massa corporal
328 humano para cães. *Cienc. Rural*, Santa Maria , v. 38, n. 4, p. 1038-1043, Aug. 2008. DOI:
329 <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000400020>
- 330 NGUYEN, P., DIEZ, M. Obesity: epidemiology, pathophysiology and management of the obese
331 dogs. In: PIBOT, P; BIORGE, V; ELLIOT, D. *Encyclopedia of Canine Clinical Nutrition*, ed. 1, p.
332 2 - 43, 2006.
- 333 NOGUEIRA, J. C.; CASTRO, A. C. S. Morfologia das glândulas mamárias (Mammae) de cadelas.
334 In: CASSALI, G.D. *Patologia Mamária Canina – do diagnóstico ao tratamento*. Ed. Medvet, São
335 Paulo, p1-13, 2017.
- 336 NORMAN, A.W.; LITWACK, G. *Hormones*. San Diego : Academic, 2.ed., 558p, 1997.
- 337 OLIVEIRA, S. B. C. Sobre homens e cães: um estudo antropológico sobre afetividade, consumo e
338 distinção. *Dissertação de Mestrado*. UFRJ/IFCS/PPGSA, 2006.
- 339 RACHIGLIO AM, CIRILLO D, LA MONTAGNA R, GIORDANO A, NORMANNO N. Leptin
340 signaling in breast cancer: an overview. *J Cell Biochem.* v.105, n.4, p.64, 2008.
- 341 RESSEL, L.; FINETELLO, R.; INNOCENTI, V.W.; VANNOZZI, I.; POLE, A. Preliminary report
342 on the expression of leptin and leptin receptor (ObR) in normal, hyperplastic and neoplastic canine
343 mammary tissues. *Research in veterinary science*, v. 93, n. 1, p. 343-349, 2012. DOI:
344 <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.07.020>
- 345 SHAW, D.; IHLE, S. Doenças oncológicas. IN: *Medicina interna de pequenos animais*. Porto
346 Alegre: Artes Médicas, cap. 50, p. 630-648, 1999.
- 347 YAGER, J.D.; DAVIDSON, N.E. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* n.354
348 v.3, p.270–282, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMra050776>
- 349 ZORAN, D.L. Obesity in dogs and cats: a metabolic and endocrine disorder. *Vet Clin North Am*
350 *Small Anim Pract.* n.40, v.2, p.221–239, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.10.009>

Figuras

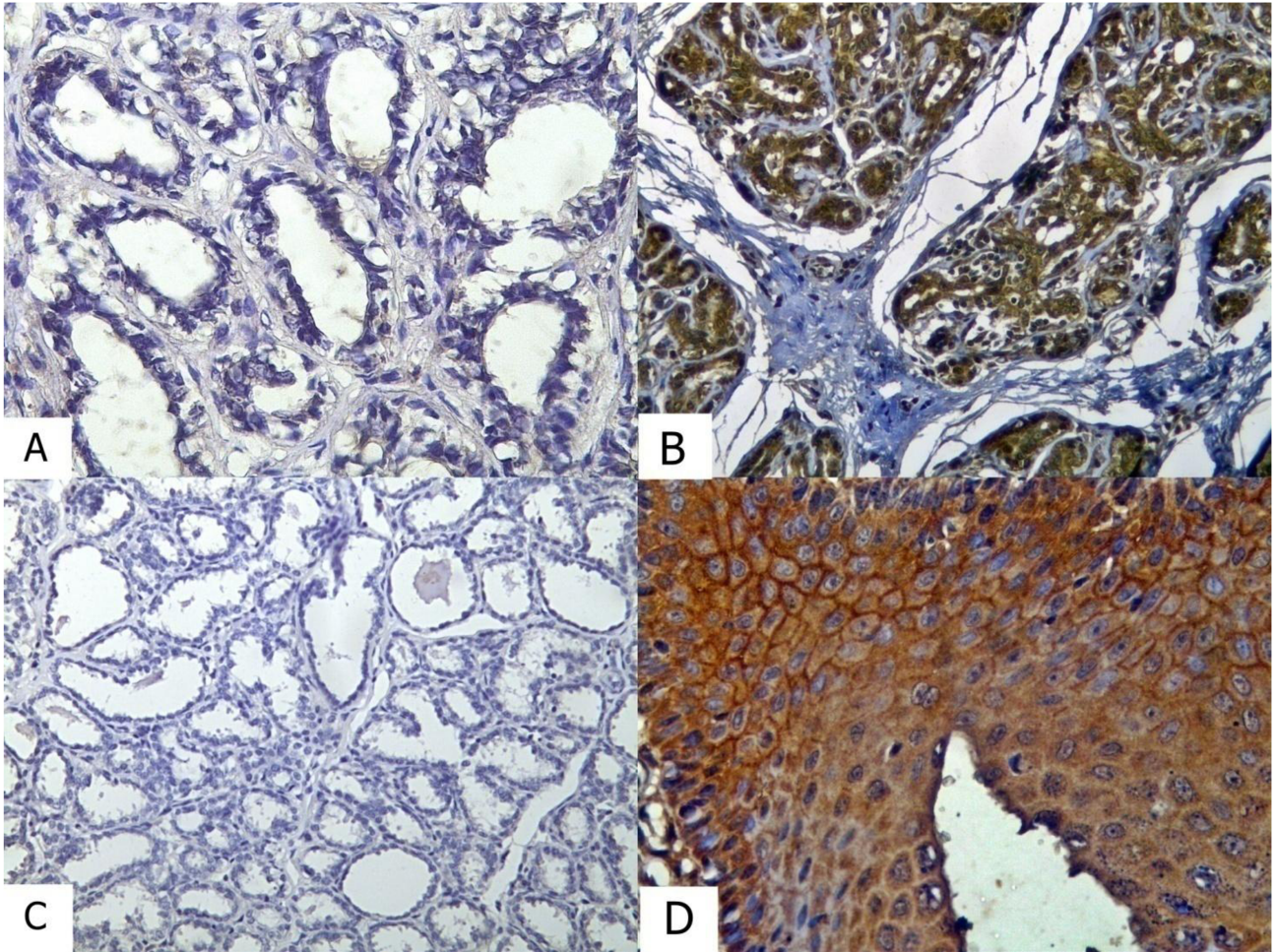


Figura 1. Carcinomas mamários de cadelas. Marcação Imunohistoquímica para leptina (A e B) e seu receptor Obr (C e D) A. Carcinoma simples negativo <5% de células positivas para Leptina (complexo streptavidina-biotina-peroxidase, policlonal anticorpo anti Leptina, contracorado com hematoxilina, aumento 40x) B. Carcinoma simples positivo >5% de células positivas para Leptina (complexo streptavidina-biotina-peroxidase, policlonal anticorpo anti Leptina, contracorado com hematoxilina, aumento 40x) C. Carcinoma simples negativo <5% de células positivas para Obr (complexo streptavidina-biotina-peroxidase, policlonal anticorpo anti Obr, contracorado com hematoxilina, aumento 40x) D. Carcinoma simples positivo >5% de células positivas para Obr (complexo streptavidina-biotina-peroxidase, policlonal anticorpo anti Obr, contracorado com hematoxilina, aumento 40x).

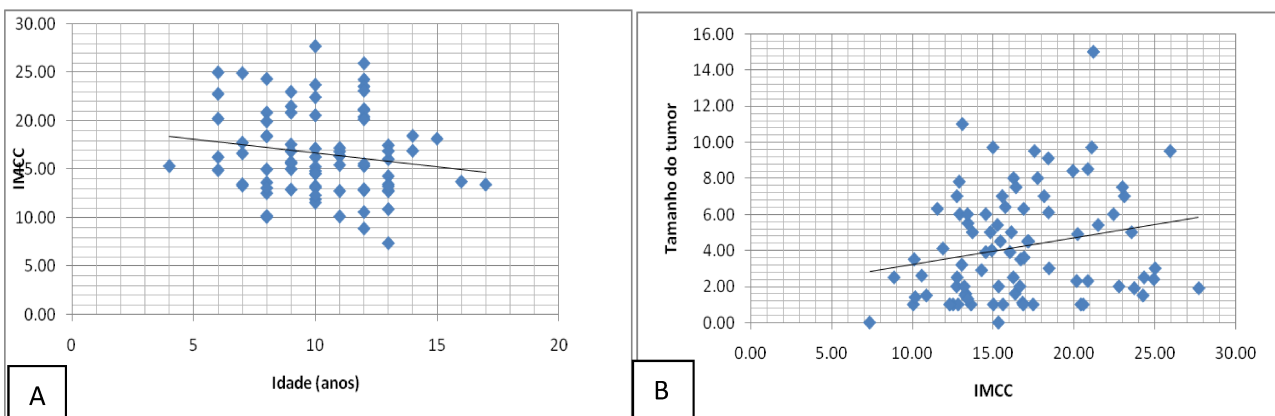


Fig. 2. Curvas de regressão linear de idade e tamanho tumoral de acordo com o IMCC. (A) Animais com neoplasia mamária distribuídos de acordo com a idade (anos) apresentando tendência decrescente de acordo com o aumento dos valores de IMCC. (B) Animais com neoplasia mamária distribuídos de acordo com o IMCC, apresentando tendência crescente dos valores de acordo com o aumento do tamanho tumoral.

Tabela 1.

Idade das cadelas com carcinoma mamário e características tumorais distribuídas de acordo com a classificação do IMCC (Índice de massa corporal canino).

	IMCC				p valor	Teste
	Abaixo do Peso	Peso Ideal	Acima do Peso	Obesos		
Idade	10,8± 2,0	10,5 ± 2,7	10,3 ± 2,6	9,5 ± 2,1	p< 0.05	Pearson
Leptina						
Positivo > 5%	6	8	10	22	ns	Mann Whitney
Negativo < 5%	2	18	9	20		
ObR						
Positivo > 5%	2	13	12	25	p <0.05	Mann Whitney
Negativo < 5%	6	13	7	17		
Tipo de Carcinoma						
Complexo	4	14	5	20	ns	Mann Whitney
Simples	4	12	14	22		
Graduação						
Grau I	4	10	5	20	ns	Man whitney
Grau II	4	13	13	19		
Grau III	0	3	1	3		
Tamanho						
Média	2,48	4,08	4,32	5,13	p <0.05	Person
até 3 cm	6	9	11	11		
3- 5 cm	1	9	6	12		
>5 cm	1	9	11	10		

Tabela 2.

Expressão de leptina e seu receptor (Obr) em carcinomas mamários de cadelas de acordo com a idade, tamanho tumoral, tipo e grau histológico

Características Tumorais	Expressão de Leptina			Expressão de ObR			Teste estatístico
	Positivo >5%	Negativo <5%		Positivo > 5%	Negativo <5%		
Idade	11 ± 2,8	10 ± 2,1	p <0.05	10 ± 2,4	10 ± 2,6	ns	Mann Whitney
Tipo de Carcinoma							
Complexo	20	23	ns	21	22	ns	Binomial
Simples	26	26		22	30		
Graduação							
Grau I	16	23	ns	19	20	ns	Binomial
Grau II	27	22		32	17		
Grau III	3	4		1	6		
Tamanho							
até 3 cm	21	16	ns	18	19	ns	Binomial
3- 5 cm	5	9		11	4		
>5 cm	10	15		14	11		