

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA E CIRURGIA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ALTERAÇÕES GLOMÉRULO-TUBULARES EM CADELAS
COM CARCINOMA MAMÁRIO**

Leandro Zuccolotto Crivellenti

Médico Veterinário

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA E CIRURGIA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ALTERAÇÕES GLOMÉRULO-TUBULARES EM CADELAS
COM CARCINOMA MAMÁRIO**

Leandro Zuccolotto Crivellenti

Orientador: Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana

Coorientador: Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica Veterinária.

2014

C936a Crivellenti, Leandro Zuccolotto
Alterações glomérulo-tubulares em cadelas com carcinoma
mamário / Leandro Zuccolotto Crivellenti. - - Jaboticabal, 2014
xv, 64 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientador: Aureo Evangelista Santana

Coorientadores: Gyl Eanes Barros Silva e Mirela Tinucci Costa

Banca examinadora: Priscylla Tatiana Chalfun Guimarães Okamoto,
Andrigo Barboza de Nardi, Geórgia Modé Magalhães e Sabryna
Gouveia Calazans.

Bibliografia

1. Cães. 2. Glomerulonefrite. 3. Tubulopatias. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.61:636.7



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ALTERAÇÕES GLOMÉRULO-TUBULARES EM CADELAS COM CARCINOMA MAMÁRIO

AUTOR: LEANDRO ZUCCOLOTTO CRIVELLENTI

ORIENTADOR: Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. GYL EANES BARROS SILVA

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. PRISCYLLA TATIANA CHALFUN GUIMARAES OKAMOTO
Departamento de Clínica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

Prof. Dr. ANDRIGO BARBOZA DE NARDI
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. GEÓRGIA MODÉ MAGALHÃES
Universidade de Franca / Franca/SP

Profa. Dra. SABRYNA GOUVEIA CALAZANS
Universidade de Franca / Franca/SP

Data da realização: 26 de junho de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LEANDRO ZUCCOLOTTO CRIVELLENTI – nascido em 05 de abril de 1983 na cidade de Batatais – SP, filho de Hildebrando Crivellenti e Eliana Vicari Zuccolotto Crivellenti. Graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em 2006. Nos anos de 2007-2009 participou do programa de aprimoramento (residência médica) em Clínica Médica e Cirurgia de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Universidade de Franca (UNIFRAN). Em março de 2009, ingressou no curso de mestrado na área de Clínica Médica do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – campus de Jaboticabal – SP. Doutorando em Clínica Médica Veterinária pela UNESP- campus de Jaboticabal, SP, em conjunto com o Serviço de Patologia Renal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), Ribeirão Preto, SP, e estágio e pesquisa internacional junto à The Ohio State University, Ohio, EUA (FAPESP/BEPE). Autor do Livro “Casos de Rotina em Medicina Veterinária de Pequenos Animais” e “Bulário Médico-Veterinário Cães e Gatos”. Atualmente é professor do curso de Medicina Veterinária na Universidade de Franca (UNIFRAN).

***“Nunca ande pelo caminho traçado,
pois ele conduz somente até aonde os outros foram”***
Alexander Graham Bell

Dedico
Aos meus alunos, amigos e mestres,
os quais me incentivam a crescer a cada dia.

AGRADECIMENTOS

À Deus por sua presença em minha vida.

À Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado (Processo FAPESP 2011/08416-6), auxílio à pesquisa regular (Processo FAPESP 2011/11355-9) e a bolsa de auxílio e pesquisa no exterior (FAPESP/BEPE 2012/25515-0).

Ao meu orientador Prof. Tit. Dr. Aureo Evangelista Santana por sua dedicação e disposição em sempre auxiliar; não somente seus próprios orientandos, mas também a todas as pessoas e programas por ele dirigidos. Aprendi com ele que muita coisa é possível e que os grandes feitos caminham junto com a humildade.

Ao meu Coorientador Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva que me ensinou não só o mundo magnífico das glomerulopatias, como também esteve sempre presente na minha formação, crescimento profissional, sempre me impulsionando e me inserindo no mundo da nefrologia.

À minha Coorientadora Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa que foi o elo entre a nefrologia e os pacientes com neoplasia mamária. Agradeço a disponibilidade e as portas sempre abertas.

Não poderia deixar de agradecer aos “*mentors*” americanos Prof. Christopher Adin e Prof. Rachel Cianciolo, da Faculdade de Medicina Veterinária da *The Ohio State University*. O contato com estes grandes pesquisadores foi uma peça importantíssima para meu crescimento profissional. Agradeço aos ensinamentos que transpassaram o tempo, e a tamanha confiança em mim depositas na execução de importantes trabalhos e parcerias firmadas.

À equipe do Laboratório de Patologia Clínica “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do HVGLN, Câmpus de Jaboticabal, SP, em especial ao Prof.Dr. Aureo e aos funcionários Eugênio, Matheus, Douglas, Aloísio e Rosangela, sempre dispostos a ajudar e que mantêm o ambiente de trabalho sempre prazeroso e empolgante.

Ao Serviço de Obstetrícia e Reprodução, em especial ao Prof.Dr. Wilter Ricardo R. Vicente e aos pós-graduandas Marina, Ana Paula e Ricardo e a Anestesista Paloma, pela acolhida e grandes feitos, por manterem sempre um clima amistoso e agradável.

Ao Serviço de Oncologia Veterinária, em especial ao Prof.Dr. Andriago Barboza de Nardi e Profa.Dra. Mirela Tinucci Costa e aos pós-graduandos Rafael, Paulo, Érika, Rosana, Giovanna, Thaís, Eduardo, Letícia, Marília e Thiago que foram peças importantíssimas para finalização dessa etapa.

Ao Programa de Castração da Universidade Estadual Paulista (UNESP, campus de Jaboticabal), em especial aos Profs. Dr. Jeffrey Frederico Lui e Dr. Gilson Hélio Toniollo e toda equipe, que tornaram possível a inclusão de alguns animais no grupo controle.

Ao Laboratório de Patologia Renal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP) em especial ao Prof. Dr. Gyl E. B. Silva e aos funcionários Flávio e Guilherme, excelentes profissionais que contribuíram diretamente na execução deste trabalho.

Ao laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de São Paulo (USP – Ribeirão Preto) e em especial a funcionária Maria D. Ferreira, por toda paciência e dedicação.

À graduanda Aline Tedesco, minha co-orientada de iniciação científica, pela dedicação e aos excelentes resultados obtidos que se somaram a esta tese.

À minha esposa, Sofia Borin Crivellenti. Simplesmente é impossível quantificar o quanto à admiro. Excelente profissional, lutadora, dedicada e companheira. É muito bom caminhar ao seu lado.

Aos meus pais Hildebrando e Eliana, que me ensinaram como caminhar e me mostraram os caminhos. Sem vocês nada disso seria possível.

À minha irmã Julia e ao meu cunhado Rafael, queridos afilhados e padrinhos de casamento, agradeço pelo amor e amizade incondicionais.

A minha sogra Regina pela torcida, entusiasmo e apoio durante mais essa trajetória.

A todos meus familiares e amigos e em especial ao meu tio Prof. Dr. Sérgio Zucoloto, grande incentivador e pesquisador, e aos primos Rafael, Livia e Rodolfo que estão também inseridos na área acadêmica.

A todos os funcionários, pós-graduandos e residentes do Hospital Veterinário FCAV/UNESP/Jaboticabal que fizeram diretamente ou indiretamente parte desta etapa.

Aos meus pacientes e seus proprietários, que tornaram esse experimento possível.



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 011862/11 do trabalho de pesquisa intitulado **"Correlação entre alterações túbulo-glomerulares e o grau histológico de neoplasias mamárias em cadelas"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 08 de Junho de 2011.

Jaboticabal, 13 de junho de 2011.


Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA


Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEUA

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE APÊNDICES.....	xiii
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xv
I - INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	1
II - OBJETIVOS.....	5
III - MATERIAL E MÉTODOS.....	6
Animais e grupos experimentais.....	6
Grupo controle (GC).....	6
Grupo carcinoma mamário (CM).....	6
Critérios de exclusão.....	7
Obtenção das amostras.....	8
Sangue.....	8
Urina.....	8
Fragmentos renais.....	8
Análises de amostras de sangue e urina.....	10
Hematologia e bioquímica sérica.....	10
Urinálise e determinações bioquímicas urinárias.....	11
Mensuração da pressão arterial sistólica.....	12
Análise microscópica dos fragmentos renais.....	13
Microscopia de luz.....	13
Imunofluorescência.....	13
Microscopia eletrônica.....	14
Avaliação e interpretação das análises microscópicas.....	14
Histopatologia da neoplasia mamária.....	15
Eletroforese de proteínas séricas e urinárias.....	15

Avaliação sorológica e PCR.....	17
“Dot-Elisa” para detecção de anticorpos <i>anti-Ehrlichia canis</i>	17
Técnica sorológica para detecção de anticorpos IgG e IgM anti- leptospira canina.....	17
Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	18
Análise estatística.....	18
IV - RESULTADOS.....	19
Aspectos clínicos.....	19
Provas de função renal.....	19
Hemograma.....	20
Urinálise.....	20
Avaliação urinária pós-biópsia renal.....	21
Neoplasias mamárias.....	21
Avaliação dos fragmentos renais.....	23
Microscopia de luz.....	23
Imunofluorescência.....	23
Microscopia eletrônica de transmissão.....	26
Eletroforese das proteínas séricas e urinárias.....	26
Proteínas séricas.....	26
Proteínas urinárias.....	27
V - DISCUSSÃO	29
VI - CONCLUSÃO.....	35
VII - REFERÊNCIAS.....	36
APÊNDICES.....	42

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Provas de função renal – densidade específica urinária, creatinina e ureia séricas, excreção fracionada de sódio (EF_{Na}) e razão proteína creatinina urinária (UP/C). Resultados obtidos nas avaliações de 11 cadelas sadias (grupo controle) e em 32 cadelas com carcinoma mamário. Jaboticabal, 2014...	20
Tabela 2. Hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos totais e plaquetas. Resultados obtidos nas avaliações de 11 cadelas sadias (grupo controle) e em 32 cadelas com carcinoma mamário. Jaboticabal, 2014.....	20
Tabela 3. Número de cães que apresentavam positividade para imunofluorescência para IgG, IgM, IgA e complemento C3. Resultados obtidos nas avaliações de 11 cadelas sadias (grupo controle) e em 29 cadelas com carcinoma mamário. Jaboticabal, 2014.....	23
Tabela 4. Valores da Média e Desvio Padrão das proteínas séricas. Resultados obtidos nas avaliações de 11 cadelas sadias (grupo controle) e em 32 cadelas com carcinoma mamário. Jaboticabal, 2014.....	27
Tabela 5. Aparecimento das proteínas urinárias conforme seu peso molecular (kDa) nas amostras de urina. Resultados obtidos nas avaliações de 11 cadelas sadias (grupo controle) e em 32 cadelas com carcinoma mamário. Jaboticabal, 2014.....	28

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1. Etapas relacionadas à biópsia renal. (A) Inserção da agulha tipo tru-cut horizontalmente na superfície do córtex renal do rim esquerdo. (B) Compressão local durante 3-5 minutos para minimizar o sangramento local e reduzir o risco de hemorragias. (C) Presença de provável hematoma moderado (seta) após a terceira repetição do procedimento, sem a presença de hemorragia ativa. Jaboticabal, 2014.....</p>	09
<p>Figura 2. Fotos ilustrativas da variedade no tamanho das neoplasias mamárias caninas. As neoplasias variaram de pequenos nódulos (< 1 cm de diâmetro) (A- seta vermelha) até grandes massas (> 10 cm de diâmetro) (B – seta branca). Jaboticabal, 2014.....</p>	22
<p>Figura 3. Alterações mais prevalentes na microscopia de luz observadas nas cadelas com carcinoma mamário. (A) Proliferação celular e lesão segmentar focal (seta) na coloração de trichromio de Masson. x400. (B) Expansão de matriz (seta vermelha). x400. (C) Glomeruloesclerose segmentar focal com sinéquia (seta) na coloração de trichromio de Masson. x400. (D) Glomeruloesclerose segmentar focal com sinéquia (seta) na coloração de prata metenamina (PAMS). x400. Jaboticabal, 2014.....</p>	24
<p>Figura 4. Imunofluorescência renal dos animais com carcinoma mamário. (A) Positividade forte granular de IgM em polo vascular (seta). x400. (B) Moderada positividade granular de IgM em mesangio associada com extensão para alça capilar e forte positividade segmentar (seta). x400. (C) Positividade forte granular de IgM em mesangio associada com extensão para alça capilar. x400. (D) Evidência de IgA negativa. Observar apenas a presença de cilindro fortemente marcado (controle positivo - seta). x100. Jaboticabal, 2014.....</p>	25

Figura 5. Fotomicrografia da microscopia eletrônica dos fragmentos renais das alterações mais prevalentes encontradas nos animais com carcinoma mamário, aumento de 44000. (A) Espaço subendotelial não organizado associado a depósitos eletrodensos (setas brancas) (em destaque ampliado - seta), aumento de 70000. (B) Presença de depósitos eletrodensos (setas brancas) e fusão de pedicelos (setas pretas), aumento de 120000. Jaboticabal, 2014.....

LISTA DE APÊNDICES

	Página
Apêndice A1. Médias e respectivos desvio padrão dos parâmetros bioquímicos séricos Resultados obtidos nas avaliações de 11 cadelas sadias (grupo controle) e em 32 cadelas com carcinoma mamário. Jaboticabal, 2014.....	42
Apêndice A2. Descrição dos parâmetros avaliados no grupo carcinoma mamário no que concerne a número de nódulos mamários, volume total das neoplasias, classificação TNM e histopatológica, e região anatômica e grau de malignidade da neoplasia mamária de cada cadela, individualmente. Jaboticabal, 2014.....	43
Apêndice 3A. Ficha de consciência e de concordância com as condições do protocolo experimental utilizada. Jaboticabal, 2014.....	45

ALTERAÇÕES GLOMÉRULO-TUBULARES EM CADELAS COM CARCINOMA MAMÁRIO

RESUMO – O presente estudo buscou avaliar as alterações glomerulares e tubulares associadas com o carcinoma mamário em cadelas. Para tanto foram utilizadas 11 fêmeas caninas como controle e 32 com diagnóstico de carcinoma mamário, atendidas pelo Serviço de Oncologia e Obstetrícia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, câmpus de Jaboticabal, SP. O protocolo experimental incluiu a obtenção de histórico clínico e exames inerentes ao hemograma, bioquímica sérica, excreção fracionada de sódio, eletroforese de proteínas séricas e urinárias e pressão arterial sistêmica em conjunto da avaliação do tecido renal obtido por tru-cut logo após a realização da ovariectomia (OV), os quais foram avaliados por microscopia de luz, imunofluorescência e microscopia eletrônica de transmissão. Vale ainda ressaltar que exames sorológicos, PCR e testes hormonais foram utilizados para exclusão/inclusão de animais nos seus respectivos grupos. O grupo carcinoma apresentou maior concentração de globulinas, haptoglobina e transferrina séricas, indicando provável estímulo e produção de substâncias provenientes do carcinoma mamário. A proteinúria associada a maior frequência no aparecimento de proteínas urinárias de baixo, médio e alto pesos moleculares e sua relação com as alterações da microscopia de luz evidência que existem tanto alterações glomerulares quanto tubulares. Ademais a associação desses achados ao depósito de diferentes classes de imunoglobulinas e complemento C3 (C3) na imunofluorescência renal, e a presença de depósitos eletrodensos subendoteliais no glomérulo confirmam a existência de importantes alterações renais relacionados ao carcinoma mamário em cadelas.

Palavras-chave: cães, neoplasia mamária, glomerulonefrite, tubulopatias.

GLOMERULAR AND TUBULAR ALTERATIONS IN BITCHES WITH MAMMARY CARCINOMA

ABSTRACT – The present study evaluated the glomerular and tubular alterations associated with mammary carcinoma in bitches. Eleven animals was used for control and 32 bitches with diagnosis of mammary carcinoma was assisted by Oncology and Obstetrics Service of the Veterinary Teaching Hospital "Governador Laudo Natel" of Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, câmpus de Jaboticabal. The experimental protocol included obtaining clinical history and examination inherent to the blood count, serum biochemistry, urinary fractional excretion of sodium, electrophoresis of serum and urinary protein and blood pressure in combination with the evaluation of renal tissue obtained by tru-cut after the achievement of ovariohysterectomy (OH), which were evaluated by light, immunofluorescence and transmission electron microscopy (TEM). Serological tests, PCR and hormonal tests were used for animal's exclusion or inclusion in their respective groups. Carcinoma group had higher concentration of globulins, haptoglobin and serum transferrin, indicating probable stimulation and production of substances from mammary carcinoma. Proteinuria associated with higher frequency of low, medium and high molecular weights of urinary proteins and their relationship with glomerular and tubular alterations evidenced by light microscopy and the association of these findings to the deposit of different classes of immunoglobulins and complement C3 (C3) in renal immunofluorescence, and the presence of subendothelial electron-deposits in the glomerulus might support the hypothesis of existence of renal alterations associated with mammary carcinoma.

Keywords: Dogs, mammary neoplasia, glomerulonephritis, tubulopathy.

I REVISÃO DE LITERATURA

Da mesma maneira que os seres humanos e animais com câncer ocasionalmente desenvolvem insuficiência renal, glomerulopatias paraneoplásicas e, algumas vezes, síndrome nefrótica (ALVES, 2006; YHEE, et al., 2010; TAKEDA et al., 2013). Embora o câncer de mama seja considerado um dos maiores problemas em mulheres (LACOMBE et al., 2013) e cadelas (De NARDI et al., 2009; CASSALI et al., 2011) nos países ocidentais, a fisiopatologia dos tumores sólidos e sua relação com a ocorrência de glomerulopatia ainda se mantém obscura (CAMBIER; RONCO, 2012), dificultando o entendimento da influência das referidas doenças neoplásicas na fisiopatogenia das lesões glomerulares e túbulo-intersticiais.

As doenças glomerulares são importantes causas de insuficiência renal terminal tanto em humanos (HUMPHREYS et al., 2005; ALVES, 2006) quanto em animais (LESS, 2004; HEIENE et al., 2007). Dentre os mecanismos que conduzem ao seu desenvolvimento, destacam-se os de natureza imunológica, cuja proteinúria é o marco tanto da doença, quanto de sua perpetuação (VADEN, 2004; HEIENE et al., 2007).

De acordo com Grant e Forrester, (2001), a doença túbulo-glomerular, de ordem imune, pode ocorrer de duas maneiras; por deposição do complexo antígeno-anticorpo nos glomérulos, ou pela adesão de antígenos à parede capilar glomerular, estimulando a produção de anticorpos e causando lesão. Ato contínuo, em função de uma estimulação continuada, estabelece-se uma reação inflamatória e consequente destruição progressiva dos glomérulos e túbulos, os quais são substituídos paulatinamente, por tecido cicatricial afuncional (ALVES, et al. 2006).

Seja qual for a modalidade específica assumida pelas glomerulopatias de origem imunológica, sua evolução natural leva à hialinização, fibrose e oclusão das alças glomerulares, consequentes à produção excessiva de elementos da matriz extracelular. A lesão perpetua-se mesmo quando a agressão inicial é descontinuada, tornando esse processo um dos principais promotores e mantenedores da doença renal crônica (LEES, 2004, GRAUER, 2005).

Os tumores de mama estão entre os mais prevalentes tumores de cadelas (DE NARDI, 2009). As neoplasias malignas são as mais comuns encontradas na casuística nacional chegando a 80% dos casos (ZUCCARI et al., 2001; DE NARDI, 2002; OLIVEIRA FILHO et al., 2010), sendo os carcinomas simples e os tumores mistos mamários, os de maior ocorrência (FERREIRA et al., 2003).

A classificação histopatológica dos tumores de mama está fundamentada na sua estrutura tecidual, incluindo epitelial glandular (adenoma/adenocarcinoma), mioepitelial ou ambas as origens (CASSALI et al., 2011). Mais especificadamente o carcinoma mamário é classificado em carcinoma *in situ*, carcinoma complexo, carcinoma simples e há ainda tipos especiais de carcinomas. O carcinoma simples possui três variantes histomorfologicamente distintas: túbulo, papilar e sólido. Além disso, são encontrados nos carcinomas especiais os carcinomas micropapilar, mucinoso, secretório, rico em lipídeos, e os de células fusiformes e escamosas (CASSALI et al., 2011).

Já o estadiamento clínico tumoral segue a classificação TNM (tamanho, linfonodo e metástase) estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (DE NARDI et al., 2009), recentemente modificada para adequação à espécie canina (CASSALI et al., 2011). No geral, tumores mamários apresentam diversos tamanhos, variando de milímetros até massas extremamente volumosas, manifestando-se em uma ou em ambas as cadeias mamárias. As características relacionadas à dimensão, forma e delimitação da massa tumoral, muitas vezes, guardam estreita coerência com o aparecimento de micrometástases ou metástases em outros órgãos, principalmente nos pulmões (DE NARDI et al., 2009). Grandes massas, ou mesmo número elevado de nódulos mamários podem ter maior relação com o aparecimento de metástases à distância, e correlacionam-se com pior prognóstico ao paciente (CASSALI et al., 2011).

Além da possibilidade da metástase local e a distância, as neoplasias mamárias também podem promover o aparecimento de lesões renais. Estudos em seres humanos com neoplasia evidenciaram que as glomerulopatias advindas da deposição de imunocomplexos no território túbulo-glomerular sejam provavelmente as mais comumente encontradas, podendo evoluir desfavoravelmente e resultar em déficits funcionais (EAGEN; LEWIS, 1977; FILGUEIRA et al., 2010). Entretanto, salienta-se que

a incidência e a prevalência das glomerulopatias associada aos carcinomas ainda é um assunto de debate (CAGNOLI, 2010), pois devido à correlação entre o câncer e as doenças glomerulares ser reportado como de ocorrência casual e de ainda não existirem modelos experimentais fidedignos, até mesmo sua existência é discutida (TAKEDA et al., 2012). A maior revisão de literatura humana que aborda a correlação entre as glomerulopatias e o câncer reportou a prevalência de 10% de nefropatia membranosa e esta estava relacionada, principalmente, ao carcinoma em diversos órgãos (JHAVERI et al., 2013).

Embora praticamente todos os estudos do câncer estejam voltados para a avaliação das lesões glomerulares, é sabido que o envolvimento túbulo-intersticial é um importante componente no agravamento de lesões renais, independentemente da causa. Neste contexto, os eletrólitos presentes na urina podem ser mensurados diretamente e servem também para estimar o trabalho tubular despendido na sua reabsorção (LEFEBVRE, 2011).

A excreção fracionada de sódio é a mais estudada em geral, em termos práticos, e pode ser utilizada clinicamente para diferenciar azotemias pré-renais e renais. Ademais, seu aumento também é reconhecido nos casos de nefrites tubulointersticiais e doenças renais crônicas, especialmente quando a taxa de filtração glomerular já está diminuída (BURANAKARL et al., 2007).

Apesar de existirem poucos relatos sobre glomerulopatias caninas (YHEE et al., 2010), sua associação com doenças neoplásicas é frequente, podendo alcançar 17 a 40% em caninos e felinos (GRANT; FORRESTER, 2001). Na literatura médica, a associação entre neoplasias e glomerulopatias é bastante referida e, muitos relatos têm evidenciado que a proteinúria apresenta correlações positivas com o grau de malignidade e com prognóstico reservado (SAWYER et al., 1988; PEDERSEN; MILMAN, 1996; JORGENSEN et al., 2008).

O achado de proteinúria tem sido reportado em neoplasias de pulmão, esôfago, estômago, cólon, rins e mama em humanos, ocasionando lesões glomerulares como glomerulonefrite membranosa, glomerulopatias de lesões mínimas, amiloidose (EAGEN; LEWIS, 1977), glomerulopatia por IgA, glomerulopatia segmentar focal

(GESF), membranoproliferativa, crescêntica e microangiopatia trombótica (FILGUEIRA et al., 2010). A proteinúria glomerular patológica ocorre devido lesões na barreira de filtração tanto pela carga quanto pelo tamanho das proteínas. Neste caso, são encontradas na urina proteínas de peso molecular médio (aproximadamente 60 a 80 kDa) ou mesmo proteínas de alto peso molecular (acima de 80 kDa), sendo a proteinúria classificada como seletiva e não seletiva, respectivamente (SCHAEFER et al., 2011). Para essa diferenciação, pode se usar o índice de seletividade protéica. Esse pode ser usado para avaliar a permeabilidade capilar glomerular a macromoléculas (*clearance* de globulinas), em que são necessárias avaliações eletroforéticas de proteínas sanguíneas e urinárias. Já, no caso da proteinúria tubular são encontradas proteínas de baixo peso molecular na urina (abaixo de 60 kDa) decorrente da não reabsorção protéica nos túbulos (GRAUER, 2005; ALVES et al., 2006).

Outro fator que pode agravar e contribuir com a deposição de imunocomplexos são as gamopatias encontradas em alguns casos de neoplasias, cujas imunoglobulinas ou subunidades podem ser determinadas tanto no soro quanto na urina (GIRAUDEL et al., 2002). Nesse âmbito a eletroforese em gel de poliacrilamida, confeccionado na presença de SDS (sódio-dodecil-sulfato), é um dos métodos mais utilizados para determinação do peso molecular das proteínas, através da comparação com proteínas de pesos moleculares já conhecidos, submetidas às mesmas condições (NAOUM, 1999).

A histopatologia renal, observada na microscopia de luz, bem como concomitante análise imunofluorescente e pela microscopia eletrônica possibilitam o pronto reconhecimento da lesão (ALVES et al., 2006), elucidação dos mecanismos fisiopatogênicos e, assim com o enquadramento terapêutico mais adequado para cada situação (ARESU et al., 2008).

II OBJETIVOS

Objetivo geral

Objetivou-se com este estudo a avaliação a existência de alterações, e em caso afirmativo, caracterizar os tipos de glomerulopatias e tubulopatias que acometem cadelas portadoras de carcinoma mamário.

Objetivos específicos

Avaliar parâmetros que possam identificar alterações glomerulares e tubulares, partir da excreção fracionada de sódio, eletroforese de proteínas séricas e urinárias, pressão arterial sistólica e da análise histopatológica do tecido renal obtido por intermédio de biópsia renal utilizando-se das técnicas de microscopia de luz, imunofluorescência e microscopia eletrônica de transmissão.

III MATERIAL E MÉTODOS

Animais e grupos experimentais

A utilização dos animais seguiu protocolo experimental previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV-UNESP (protocolo nº0118662/11). Em adição, nenhum paciente fez parte deste estudo senão após consentimento expresso do proprietário, por intermédio de preenchimento e subscrição de ficha de consciência e de concordância com as condições do protocolo experimental (Apêndice 3A).

Ao final deste estudo foram avaliadas 43 cadelas adultas, atendidas pelos Serviços de Oncologia Veterinária e Reprodução e Obstetrícia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” (HVGLN) da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, as quais foram distribuídas em dois grupos experimentais, como a seguir:

Grupo Controle (GC): o grupo controle constituiu-se de 11 cadelas adultas e inteiras provenientes da casuística do setor de Obstetrícia e Reprodução do HVGLN que foram submetidas a ovário-histerectomia (OH) eletiva. Esses animais foram selecionados para pareamento entre a idade do grupo carcinoma. O peso do grupo controle variou entre três e 63 kg ($13,8 \pm 17,8$ kg) e a idade entre seis e 12 anos ($8,7 \pm 2,2$ anos), e o bom estado de saúde foi aquilatado com base em exame físico, exames laboratoriais de rotina (hemograma, bioquímica sérica e urinálise), exames específicos como reação em cadeia da polimerase (PCR) e sorologias (descritos nos critérios de exclusão), além de ultrassom abdominal.

Grupo Carcinoma Mamário (CM): o grupo carcinoma mamário compôs-se de 32 cadelas inteiras provenientes da casuística do setor de Oncologia e Obstetrícia e Reprodução do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” que foram submetidas a

ovário-histerectomia (OH) eletiva com posterior mastectomia, com diagnóstico histopatológico de carcinoma mamário, e sem histórico ou alterações clínicas de outras doenças, cujo peso oscilou entre 3,2 e 39 kg ($13,6 \pm 9,8$ kg) e a idade entre seis e 16 anos ($9,5 \pm 2,2$).

Foram também avaliados, além do tamanho tumoral usado para a classificação TNM, o número total de nódulos em cada cadela, o volume tumoral individual de cada nódulo, o qual foi obtido pela fórmula $\pi/6 \times \text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{altura}$ (TOMAYKO e REYNOLDS, 1989), e finalmente, somando-se todos os volumes individuais, o volume total tumoral em cada paciente estudada. Ademais, com o objetivo de verificar se os resultados obtidos poderiam ser alterados quando se levasse em consideração não somente o volume tumoral total caracterizado pela fórmula supracitada, mas também sua relação com o porte de cada fêmea, o volume total tumoral foi dividido pelo peso do animal, gerando um resultado em cm^3/kg .

Crítérios de exclusão

Não foram incluídas no grupo CM cadelas que apresentassem quaisquer evidências de metástases em órgãos alvos e/ou comorbidades potencialmente causadoras de alterações túbulo-glomerulares, tais como dermatopatias crônicas, endocrinopatias, erliquiose, babesiose e leptospirose. Vale ressaltar que a presença de ulceração e/ou contaminação do(s) tumor(es) de mama, bem como a existência de outros tipos de neoplasias concomitantes também perfizeram motivos de exclusão.

Para tanto, além da anamnese e do exame físico detalhado foram realizados exames complementares para pesquisa de metástases, incluindo radiografias torácicas em três projeções (VD, LD e LE) e ultrassonografia abdominal, assim como sorologia para *Leptospira* spp. e *Ehrlichia canis* e PCR para *E. canis* e *Babesia canis*. Foram também excluídos do grupo CM e controle, pacientes que tivessem sido imunizados recentemente (período inferior à 3 meses) que fossem portadores de outras doenças, ou ainda quando paciente pertencesse à uma raça sabidamente predisposta à algum tipo de glomerulopatia.

Obtenção das amostras

1. Sangue

Amostras de sangue, dos animais de ambos os grupos, foram coletadas por venopunção jugular, obtendo-se um volume total de 5-7 mL antes da cirurgia em jejum. Uma alíquota de 2-3 mL foi armazenada em tubo apropriado contendo ácido etilenodiaminotetracético a 10%, (K₂EDTA) para realização de hemograma e posterior PCR, e a alíquota remanescente (3-4 mL) envasada em tubo sem anticoagulante (Vacutainer[®]), previamente identificado. Após coagulação, o sangue foi centrifugado a 800G, durante 5 minutos, para separação do soro. Uma vez separado, o soro foi transferido, em subalíquotas de 1-2 mL, para microtubos plásticos previamente identificados, e congelados à -20°C.

2. Urina

As amostras de urina foram obtidas por cistocentese para realização de urinálise antes e após a cirurgia para avaliação da urinálise e bioquímicos e avaliação da hematúria, respectivamente. Após centrifugação, frações do sobrenadante foram acondicionadas e mantidas congeladas a -20°C até o momento das análises bioquímicas.

3. Fragmentos renais

As biópsias renais foram realizadas com o paciente em decúbito dorsal logo após a realização da ovário-histerectomia (OH). Para tanto foi utilizado dispositivo semiautomático por agulha cortante tipo Tru-cut^{®1} calibre 18, 16 ou 14 gauge dependendo do tamanho do animal. Nenhuma imagem ultrassonográfica foi necessária para realização do procedimento, a agulha foi direcionada horizontalmente na superfície do córtex renal do rim esquerdo (Figura 1). Foram realizados três repetições do procedimento e colhidos fragmentos do córtex renal conforme já preconizado em outros trabalhos (DONNELLY et al., 2008; HUSSAIN et al., 2010). É importante ressaltar ainda

¹ M.D.L Aghi speciali e componenti medicalli - Italy

que o procedimento foi realizado igualmente nos dois grupos estudados. Ato contínuo a biópsia renal a compressão local foi realizada durante 3-5 minutos para minimizar o sangramento local e reduzir o risco de hemorragias (Figura 1).



Figura 1. Etapas relacionadas à biópsia renal. **(A)** Inserção da agulha tipo tru-cut horizontalmente na superfície do córtex renal do rim esquerdo. **(B)** Compressão local durante 3-5 minutos para minimizar o sangramento local e reduzir o risco de hemorragias. **(C)** Presença de provável hematoma moderado (seta) após a terceira repetição do procedimento, sem a presença de hemorragia ativa. Jaboticabal, 2014.

Os fragmentos apresentaram tamanho padrão da agulha (\pm de 1-2 cm) e foram removidos através de jato de solução salina ou por gentil deslocamento do tecido por agulha fina, e inicialmente reservados em solução salina (10 min). O material foi examinado visualmente e adequadamente separado para microscopia de luz, imunofluorescência e microscopia eletrônica de transmissão. O maior fragmento foi, preferencialmente, selecionado para microscopia de luz, e em seguida para a fluorescência. Para a microscopia eletrônica dois pequenos fragmentos (1-2 mm) foram selecionados da terceira amostra e eventuais tecidos remanescentes foram incorporados a amostra destinada a microscopia de luz.

Salienta-se que todos os cuidados referentes aos momentos pré, trans e pós-cirúrgicos foram rigorosamente observados, e as pacientes receberam fluidoterapia isotônica (10 mL/kg/h), durante e após a cirurgia com o intuito de estimular a diurese. Ao final da cirurgia, as amostras de urina foram avaliadas quanto à presença de hematúria macroscópica e microscópica.

Análises das amostras de sangue e urina

As análises das amostras de sangue e urina foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do HVGLN, Câmpus de Jaboticabal, SP.

1. Hematologia e bioquímica sérica

Foram realizadas as contagens globais de hemácias, leucócitos e plaquetas em contador automático de células². A contagem diferencial dos leucócitos foi obtida em lâminas de esfregaços sanguíneos, devidamente fixados ao ar e corados com uma mistura de metanol, May-Grunwald e Giemsa. A partir da contagem leucocitária global e da fórmula leucocitária relativa, obteve-se a fórmula leucocitária absoluta, por uma regra de três simples.

² ABC Vet – Horiba ABX – São Paulo, Brasil.

As amostras de soro foram analisadas para determinação das concentrações de creatinina (método Jaffé modificado), ureia (método enzimático-urease), proteínas totais (método biureto), albumina (método verde de bromocresol) alanina aminotransferase (método Reitman e Frankel), fosfatase alcalina (método Roy modificado), cálcio total (reação cromogênica com cresolftaleína complexona) e fosfato (método de Daly e Ertingshausen modificado). Neste caso, utilizou-se o sistema Labtest³ para diagnóstico e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro⁴ semi-automático para provas bioquímicas.

2. *Urinálise e determinações bioquímicas urinárias*

O exame físico da urina foi realizado por intermédio da observação macroscópica, restrito à cor e aspecto urinários. A densidade urinária foi mensurada em refratômetro digital⁵. As características químicas da urina foram avaliadas com o auxílio de fitas reagentes comerciais⁶, de acordo com as recomendações do fabricante, onde a presença de proteína foi classificada como negativa ou positividade de traços, 1+, 2+ e 3+. Para realização da análise do sedimento urinário as amostras foram centrifugadas a 800 G, durante cinco minutos. O sobrenadante foi desprezado na sua quase totalidade, o sedimento ressuspendido e depositado entre lâmina e lamínula. Ato contínuo, a preparação entre lâmina e lamínula foi analisada a fresco, com auxílio de um microscópio fotônico, empregando-se objetivas secas de 10x e 40x para contagens de cada elemento figurado por campo microscópico.

As dosagens de proteínas e creatinina urinária foram obtidas a partir do sobrenadante. Para a determinação da razão proteína creatinina urinária (UP/C), foram feitas dosagens de proteína urinária pelo método de vermelho de pirogalol (kit Sensiprot⁷) e creatinina pelo método de picrato em meio alcalino, ambas com leitura em

³ LABTEST - Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil

⁴ LABQEST-LABTEST – Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil

⁵ Refratômetro de Mesa – UGI (1,000 – 1,050) - Atago - Tóquio – Japão

⁶ Combur¹⁰Test[®]UX – Boehringer Mannheim S.A. - Buenos Aires- Argentina

⁷ Labtest Diagnóstica – Belo Horizonte – MG – Brasil

aparelho semi-automático⁸ em modo colorimétrico. Para o cálculo da razão proteína/creatinina urinária utilizou-se da fórmula:

$$UP/C = \frac{UPt \text{ (mg/dL)}}{Ucr \text{ (mg/dL)}}$$

Onde:

UP/C = razão proteína creatinina urinária

UPt = concentração urinária de proteínas

Ucr = concentração urinária de creatinina

As concentrações séricas e urinárias de sódio foram determinadas utilizando-se método íon-seletivo⁹. Para os cálculos da excreção fracionada de solutos utilizou-se a fórmula que se segue:

$$EF_{Na} = \frac{U_{Na} \text{ (mEq/L)} \times Scr \text{ (mg/dL)}}{Ucr \text{ (mg/dL)} \times S_{Na} \text{ (mEq/L)}} \times 100$$

Onde:

EF_{Na} = excreção fracionada de sódio

U_{Na} = concentração urinária de sódio

Scr = concentração sérica de creatinina

Ucr = concentração urinária de creatinina

S_{Na} = concentração sérica de sódio

Mensuração da pressão arterial sistólica

A pressão arterial sistólica (PAS) foi aferida, e sempre que possível foi avaliada em três momentos distintos (consulta inicial, segunda avaliação e avaliação no dia da

⁸ Labquest – Labtest Diagnóstica - Belo Horizonte – MG – Brasil

⁹ ISLAB – Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil

cirurgia), por método indireto, utilizando-se de manguito inflável aplicado ao redor do membro torácico direito, entre o cotovelo e o carpo, para ocluir o fluxo sanguíneo. Foi obtida a média de 5 aferições após completa tranquilização do paciente. O manguito utilizado correspondeu a 40-50% da circunferência da extremidade envolvida, e para tanto foi empregado manguito habitualmente utilizado na área de pediatria humana, tamanho infantil e neonatal. A PAS foi então aferida utilizando um aparelho ultrassônico com *doppler* vascular¹⁰, através da detecção do fluxo sanguíneo nas artérias superficiais do carpo.

Análise microscópica dos fragmentos renais

As amostras foram transferidas para frasco contendo Bouin, aldeído glutárico e congeladas em nitrogênio líquido para avaliação por microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e imunofluorescência, respectivamente. O fragmento foi considerado satisfatório para avaliação na microscopia de luz quando tivesse mais de 5 glomérulos. Todo o processamento histotécnico dos fragmentos do parênquima renal foi realizado conforme a rotina do Laboratório de Patologia Renal da FMRP-USP, Ribeirão Preto, SP.

1. Microscopia de luz

A fixação da amostra em Bouin alcoólico ou formoldeído teve a duração mínima de 5 horas, e após este período, a amostra foi então desidratada em álcool, diafanizada em xilol e incluída em parafina. Cortes com 3µm de espessura foram obtidos em micrótomo e corados com Hematoxilina-Eosina, Tricrômico de Masson, Vermelho do Congo, impregnados com Prata Metenamina (PAMS), montados em lâminas de microscopia e recobertos por lamínulas. Os cortes, então, foram examinados em microscópio óptico Universal ZEISS.

¹⁰ MICROEM – Ribeirão Preto, SP/Brasil

2. *Imunofluorescência*

A amostra de tecido renal destinada ao congelamento foi incluída em “tissue tek”¹¹, e congelada em nitrogênio líquido. Foram obtidos cortes de 2-3µm de espessura em criostato a 20°C negativos, os quais foram deixados em repouso em temperatura ambiente durante uma hora. Posteriormente, foram incubados durante 30 minutos em temperatura ambiente, em câmara úmida, com os seguintes anti-soros policlonais: IgM anti-cão (Goat anti-Dog IgM, mu chain specific FITC), IgA anti-cão (Goat anti-Dog, IgA, alpha chain specific FITC), IgG anti-cão (Goat anti-Dog, IgG, specific FITC) e C3 anti-cão (Goat anti-Dog, C3, FITC)¹², conjugados ao isotiocianato de fluoresceína. Após a incubação, as lâminas foram montadas em glicerina tamponada em pH 8,5 e examinadas em microscópio universal ZEISS equipado com sistema para microscopia de imunofluorescência.

3. *Microscopia eletrônica*

As amostras destinada a microscopia eletrônica de transmissão foram fixadas com aldeído glutárico a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,2M (pH 7,3) por 2 horas. Posteriormente foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,2M por 2 horas. A desidratação foi realizada em uma série crescente de acetona (uma imersão de 10 minutos nas concentrações de 30%, 50%, 90% e 95%, e 3 imersões de 20 minutos na concentração de 100%). O material foi infiltrado com uma mistura de resina e acetona nas proporções 3:1, 1:1 e 1:3 (1 hora cada) e por resina pura (3 trocas de 1 hora cada) e, finalmente incluído em resina Araldite 502 (Polysciences Inc., Warrington, PA, EUA).

4. *Avaliação e interpretação das análises microscópicas*

A leitura das lâminas e o material da microscopia de luz quanto eletrônica de transmissão dos fragmentos renais foram realizados em ensaio cego por

¹¹ MILES INC., Diagnostics Division, Elkart, IN 46515 USA, código 4583

¹² Bethyl Laboratories, Inc.- Montgomery, USA

nefropatologista, levando-se em consideração os critérios da Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*) conforme trabalhos apresentados em Medicina Veterinária (VADEN, 2004; ZINI; BONFANTI; ZATELLI, 2004; HEIENE et al., 2007; ARESU et al., 2008).

A avaliação de imunofluorescência foi classificada em granular ou linear, com a inclusão da localização dos depósitos (mesangio, membranas basais, túbulos e vasos sanguíneos), distribuição (focal, difusa, segmentar ou generalizada) e intensidade (graduada em campo escuro usando a escala semiquantitativa de 0, traços, 1+, 2+ e 3+).

Histopatologia da neoplasia mamária

Após a mastectomia da cadeia afetada pela neoplasia, os nódulos foram mensurados com auxílio de paquímetro, para dimensionamento da área total da(s) neoplasia(s). A(s) mama(s) e linfonodos regionais foram fixados em solução tamponada de formol 10%, por 24 horas, processados para inclusão em parafina. Os cortes foram seccionados e as lâminas preparadas e coradas por HE, para determinação das neoplasias. A classificação dos tumores mamários foi realizada nos laboratórios VETMOL (Consultoria e Diagnóstico em Patologia Molecular Veterinária e Pesquisa, Botucatu, São Paulo) e VETPAT (Patologia Biologia Molecular Banco de Sangue Veterinário, Campinas, São Paulo) seguindo os critérios de grau, diferenciação celular, pleomorfismo, anaplasia, ulcerações e contaminação bacteriana, invasão em vasos sanguíneos e linfáticos e metástases em linfonodos estabelecidos por Cassali et al. (2011).

Eletroforese de proteínas séricas e urinárias

A eletroforese das proteínas séricas e urinárias foi realizada tanto nas amostras do Grupo CM quanto no GC. Tal técnica foi efetuada segundo a rotina do Laboratório

do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP.

Após a montagem da cuba de eletroforese, as placas foram preenchidas com o gel de separação “Separating Gel” até a marca de 1,5 cm de referência e uma fina camada de álcool absoluto (etanol 99,5°), suficiente para formar uma película no topo do gel ($\pm 0,6$ mL).

Após a polimerização, o gel de empilhamento “Stacking Gel” foi adicionado e os pentes foram inseridos em cada placa. Estas foram então colocadas na cuba e os pentes, removidos. Por último, a solução tampão de corrida foi adicionada na parte superior da cuba até cobrir todo o gel (± 1 cm acima) que receberiam as amostras.

As amostras séricas foram previamente preparadas da seguinte forma: adicionou-se, em cada amostra, 30 μ L de PBS, 10 μ L do soro a ser analisado e 20 μ L de gel mix (corante) e aqueceu-se sobre água em ebulição por 10 minutos. Ato contínuo, 5 μ L de cada amostra foi depositada em cada “pocinho” da placa contendo o gel e o tampão de corrida. Para referência, no “pocinho” de número 7 colocou-se uma amostra padrão.

Em seguida, as amostras de soro sanguíneos dos animais acometidos por neoplasias foram aplicadas com o auxílio de uma pipeta, sendo 5 μ L de amostra em cada “pocinho”. Ao final desse processo, a cuba de eletroforese foi conectada a uma fonte de energia, regulada para 90 volts. Após a passagem da amostra pelo gel de empilhamento, chegando ao gel de separação, a voltagem foi aumentada em torno de 20%. Ao final da corrida (após 3 h), a fonte foi desligada e o gel retirado da placa cuidadosamente, fixado e corado em Coomassie Blue 0,2% durante 2 horas. O excesso de corante foi desprezado (com descolorante à base de metanol, ácido acético e água destilada) até que o gel ficasse transparente.

A leitura dos géis foi então realizada em densitômetro e os gráficos com as frações proteicas encontradas foram montados.

A metodologia para realização da eletroforese das proteínas urinárias foi a mesma, porém, antes de serem utilizadas, as amostras passaram pelo processo de liofilização (aproximadamente 2000 μ L de cada amostra) e depois foram

ressuspendidas com 100 µL de PBS e centrifugadas durante 10 minutos. Foram utilizados 50 µL do sobrenadante de cada amostra e 20 µL de gel mix (corante). Foram levadas para o aquecimento como descrito anteriormente e, a partir de então, o processo foi semelhante àquele aplicado ao soro dos animais.

Avaliação sorológica e PCR

Cabe rememorar que tanto as avaliações sorológicas como as de PCR foram realizadas em todos os animais, e seguindo os critérios de exclusão explicitados no ítem animais e grupos experimentais, para serem incluídas nos grupos CM ou GC, as fêmeas caninas foram, impreterivelmente, negativas em todas as avaliações que se seguem.

1. “Dot-ELISA” para detecção de anticorpos anti-Ehrlichia canis

Os testes utilizados para detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* da classe IgG foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto (UNESP, campus de Jaboticabal) empregando-se o kit Immunocomb[®] (Biogal, Israel). Utilizou-se a metodologia empregada e descrita pelo fabricante, a qual considera títulos positivos (reagentes) acima de 1:80.

2. Técnica sorológica para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-leptospira canina.

Os testes utilizados para detecção da presença de anticorpos anti-*leptospira* sp. nos soros caninos foram também realizados nas dependências do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto (UNESP, campus de Jaboticabal) através de kits específicos para detecção de IgM¹³ e IgG¹⁴ seguindo as informações do fabricante.

¹³ Test-ITTM *Leptospira canine* IgM, JMR Trading LTDA, Paraná, Brazil.

¹⁴ Immuno Comb *Leptospira canina* IgG, JMR Trading LTDA, Paraná, Brazil.

3. *Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para Ehrlichia canis e Babesia sp.*

As técnicas de PCR foram realizadas conforme orientações e a rotina do Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária do Departamento de Patologia da UNESP, campus de Botucatu, SP, nas quais a extração do DNA de amostras do sangue toral foram realizadas empregando-se a nPCR para os sistemas *Ehrlichia canis* e *Babesia sp.*

Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância do programa estatístico JMP® e GraphPad Prism software. Todos os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e análise de via única ou teste de Friedman, com posterior avaliação pelo teste de *t* student ou Tukey, quando mais de duas variáveis fossem analisadas. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Correlações entre o volume tumoral (tamanho), volume tumoral total e número de nódulos com os dados de proteinúria, parâmetros sanguíneos e histopatologia renal foram obtidas pelo teste de Pearson.

IV RESULTADOS

Aspectos clínicos

Foram realizadas, no total, biópsias renais em 67 cadelas, dentre as quais 24 foram excluídas por apresentarem outros tipos de neoplasia mamária e/ou positividade para alguma das doenças utilizadas como critério de exclusão (doenças infecciosas – *E. canis*, *Babesia sp.*, *Leptospira sp.*). A idade foi considerada como critério de seleção dos animais controle, os quais foram pareados aos animais do grupo CM; não havendo, portanto, diferença significativa entre esta variável nos animais estudados ($P=0.5108$).

Os parâmetros bioquímicos séricos alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), sódio, potássio, fosfato e cálcio total foram utilizados como método de triagem para inclusão dos animais no estudo e, portanto, também não apresentaram diferença significativa entre os grupos analisados (Apêndice 1A).

A pressão arterial sistólica não variou significativamente entre os grupos CM e controle ($138,0\pm 20,6$ mmHg e $125,0\pm 13,8$ mmHg, *respectivamente*; $P=0,4375$), e salienta-se que nenhum dos animais apresentou valores de PAS superiores a 180 mmHg.

Provas de função renal

A análise das variáveis bioquímicas séricas creatinina, ureia, assim como densidade urinária e excreção fracionada de sódio (EF_{Na}) revelaram não haver diferença entre os grupos estudados. No entanto, a razão proteína creatinina urinária (UP/C) foi significativamente superior no grupo CM quando comparada ao GC ($0,40\pm 0,52$ e $0,11\pm 0,08$, *respectivamente*; $P<0.0001$). Nenhum animal do GC apresentou proteinúria, ao passo que 31,25% das fêmeas caninas do grupo CM ($n=10$) apresentaram proteinúria, exibindo valores de UP/C $>0,5$ (Tabela 1).

Tabela 1. Provas de função renal – densidade específica urinária, creatinina e ureia séricas, excreção fracionada de sódio (EF_{Na}) e razão proteína creatinina urinária (UP/C). Resultados obtidos nas avaliações de 11 cadelas sadias (grupo controle) e em 32 cadelas com carcinoma mamário. Jaboticabal, 2014.

Variáveis	GRUPOS		Valor de <i>P</i>
	Controle	Carcinoma mamário	
Densidade específica urinária	1,037 ± 0,009	1,035 ± 0,01	0,1602
Creatinina sérica (mg/dL)	0,98 ± 0,26	0,91 ± 0,21	0,1774
Ureia sérica (mg/dL)	26,15 ± 10,24	32,53 ± 15,11	0,1309
Excreção fracionada de sódio (%)	0,45 ± 0,34	0,53 ± 0,38	0,7646
Razão proteína creatinina urinária (UP/C)*	0,11±0,08	0,40±0,52	< 0,0001

Variáveis seguidas de asterisco (*) apresentam diferença significativa entre grupos analisados ($P < 0,05$).

Hemograma

Os valores obtidos das variáveis hematócrito, hemoglobina e hemácias, leucócitos totais e plaquetas (Tabela 2), assim como as subpopulações leucocitárias (neutrófilos segmentados, neutrófilos bastonetes, linfócitos, eosinófilos, basófilos e monócitos) não foram diferentes entre os grupos estudados. Faz-se importante recordar que a ausência de alterações nas variáveis hematológicas satisfaz parte dos critérios para inclusão dos animais em ambos os grupos, e que animais portadores de quaisquer alterações hematológicas importantes foram excluídos deste estudo.

Tabela 2. Hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos totais e plaquetas. Resultados obtidos nas avaliações de 11 cadelas sadias (grupo controle) e em 32 cadelas com carcinoma mamário. Jaboticabal, 2014.

Variáveis	GRUPOS		Valor de <i>P</i>
	Controle	Carcinoma mamário	
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	6,42 ± 0,73	5,82 ± 1,12	0,1143
Hemoglobina (g/dL)	13,9 ± 1,9	13,9 ± 2,7	0,0742
Hematócrito (%)	42,2 ± 4,9	41,2 ± 8,0	0,6523
Leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	8,26 ± 2,35	10,18 ± 5,26	0,5703
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	310,1 ± 0,9	347,0 ± 1,3	0,7695

Urinálise

Na urinálise foi observado, embora subjetivamente, maior positividade da proteína durante a reação química da tira reagente no grupo CM quando comparado com o GC ($P=0,0167$). Outros parâmetros químicos como pH, glicose, corpos

cetônicos, bilirrubina e sangue oculto, assim como as variáveis encontradas no sedimento urinário se mantiveram dentro do esperado para a espécie canina e nenhuma diferença foi observada entre os grupos estudados.

Avaliação urinária pós-biópsia renal

A hematúria macroscópica e microscópica, analisadas em amostras de urina obtida conseguinte a finalização do procedimento cirúrgico, foram as consequências imediatas mais comuns relacionadas à biópsia renal, ocorrendo em 21% e 97% dos casos, respectivamente. Ressalta-se que não existiram maiores complicações, e todas as cadelas recuperaram-se espontaneamente após 24 horas do procedimento. Ressalta-se ainda que não foram requeridas transfusão sanguínea e/ou reoperação relacionadas ao procedimento biópsia renal. Os animais foram acompanhados por até 3 meses após o procedimento e fazem parte de outro experimento em andamento.

Neoplasias mamárias

As neoplasias mamárias variaram desde pequenos nódulos (< 1 cm de diâmetro) até grandes massas (> 10 cm de diâmetro) (Figura 2). Conforme critério de seleção para inclusão no grupo CM, reforça-se que nenhuma fêmea apresentava evidência de metástase a distância (pulmão e órgãos abdominais) e nem em linfonodos adjacentes, visíveis ao raio-X, ultrassonografia e histopatologia, respectivamente. A classificação histopatológica utilizada pelos laboratórios VETPAT e VETMOL foi empregada segundo a classificação estabelecida no consenso de tumor de mama no Brasil no ano de 2011 (CASSALI et al. 2011) (Apêndice 2A).

O número de nódulos por animal variou de um a dez ($3,7 \pm 2,8$) e o volume total das neoplasias apresentou variação de 0,04 a 767,15 cm³ ($109,27 \pm 199,43$ cm³). Levando-se em consideração a variedade de pesos apresentados pelas fêmeas caninas com carcinoma mamário, como critério adicional de análise optou-se por realizar a avaliação do volume tumoral em relação ao peso do animal. Nesse sentido foram observadas neoplasias com volume variando de 0,002 a 65,35 cm³/kg de peso ($7,48 \pm 15,09$ cm³/kg).

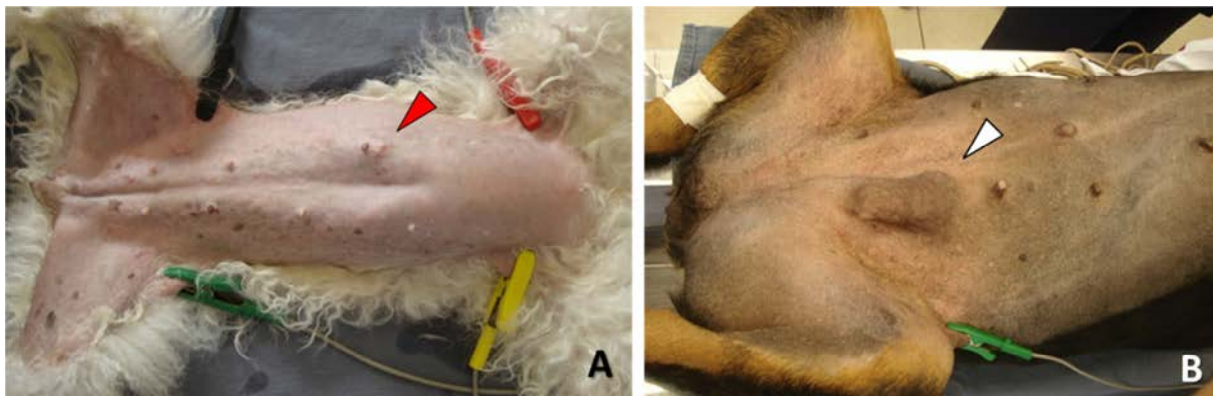


Figura 2. Fotos ilustrativas da variedade no tamanho das neoplasias mamárias caninas. As neoplasias variaram de pequenos nódulos (< 1 cm de diâmetro) (**A**- seta vermelha) até grandes massas (> 10 cm de diâmetro) (**B** – seta branca). Jaboticabal, 2014.

No que se refere à classificação das neoplasias mamárias, todas se constituíram de carcinomas mamários. A maioria apresentou-se como baixo grau de malignidade (n=27, 84,4%). Grau intermediário e alto grau de malignidade foram encontrados em dois (6,2%) e três (9,4%) animais, respectivamente. Dentre as 32 fêmeas do grupo CM, 21 (65,6%) apresentaram apenas um tipo histopatológico de carcinoma mamário e 11 delas (34,4%) apresentaram mais de dois tipos histopatológicos. A classificação histopatológica predominante foi o carcinoma tubular (19 nódulos, 19 fêmeas), seguido de carcinoma complexo (13 nódulos, 13 fêmeas), carcinoma em tumor misto (6 nódulos, 4 fêmeas), carcinoma tubular e papilífero (4 nódulos, 3 fêmeas) e carcinoma sólido (3 nódulos, 3 fêmeas). As informações detalhadas sobre a classificação histológica das neoplasias mamárias, bem como distribuição tumoral e número de nódulos de todas as fêmeas caninas acometidas por carcinoma mamário podem ser encontradas no Apêndice 2A.

Não foram encontradas correlações entre o número de nódulos por animal ou o grau histológico e as variáveis analisadas (descritas no material e métodos). Todavia, foram encontradas correlações positivas entre o volume tumoral total e as globulinas

séricas ($r=0,36$; $P=0,0423$) e entre as alterações renais presentes na microscopia de luz ($r=0,56$; $P=0,0008$). Quando o volume tumoral ajustado pelo peso corporal foi utilizado, este também se apresentou correlacionado positivamente com as alterações renais encontradas na microscopia de luz ($r=0,49$; $P=0,0047$).

Correlações positivas também foram verificadas entre o tamanho do carcinoma mamário segundo a classificação tamanho (TNM) e o volume tumoral total ($r=0,87$; $P<0,0001$), globulinas séricas ($r=0,21$; $P=0,0087$) e alterações renais visibilizadas à microscopia de luz ($r=0,24$; $P=0,0038$).

Avaliação dos fragmentos renais

Microscopia de luz

Foram identificadas alterações renais em 25 cães (78,1%) no grupo CM. Dentre tais alterações, o espessamento da membrana basal glomerular foi a anormalidade mais encontrada (50,0%), seguida pela proliferação celular (30,0%), lesão segmentar focal (30,0%), sinéquia (23,3%), glomeruloesclerose (20,0%), fibrose intersticial e atrofia tubular (FIAT) (16,7%). Foi ainda observado um caso (3,1%) de espessamento fibro-elástico em arteríola. Na avaliação tubular observou-se 5 cadelas (15,6%) com degeneração hidrópica (Figura 3). Nenhuma alteração na avaliação por microscopia de luz foi observada nos animais do GC.

Imunofluorescência

Dos 43 rins biopsiados, três animais do grupo CM não apresentavam glomérulos adequados para avaliação à imunofluorescência. O número de cães positivos para IgG, IgM, IgA e complemento C3 podem ser visibilizados na Tabela 3.

Tabela 3. Número de cães que apresentavam positividade para imunofluorescência para IgG, IgM, IgA e complemento C3. Resultados obtidos nas avaliações de 11 cadelas saudáveis (grupo controle) e em 29 cadelas com carcinoma mamário. Jaboticabal, 2014.

	IgG	IgM	IgA	C3
Controle	0/11	3/11	0/11	0/11
Carcinoma mamário	4/29	28/29	7/29	5/29

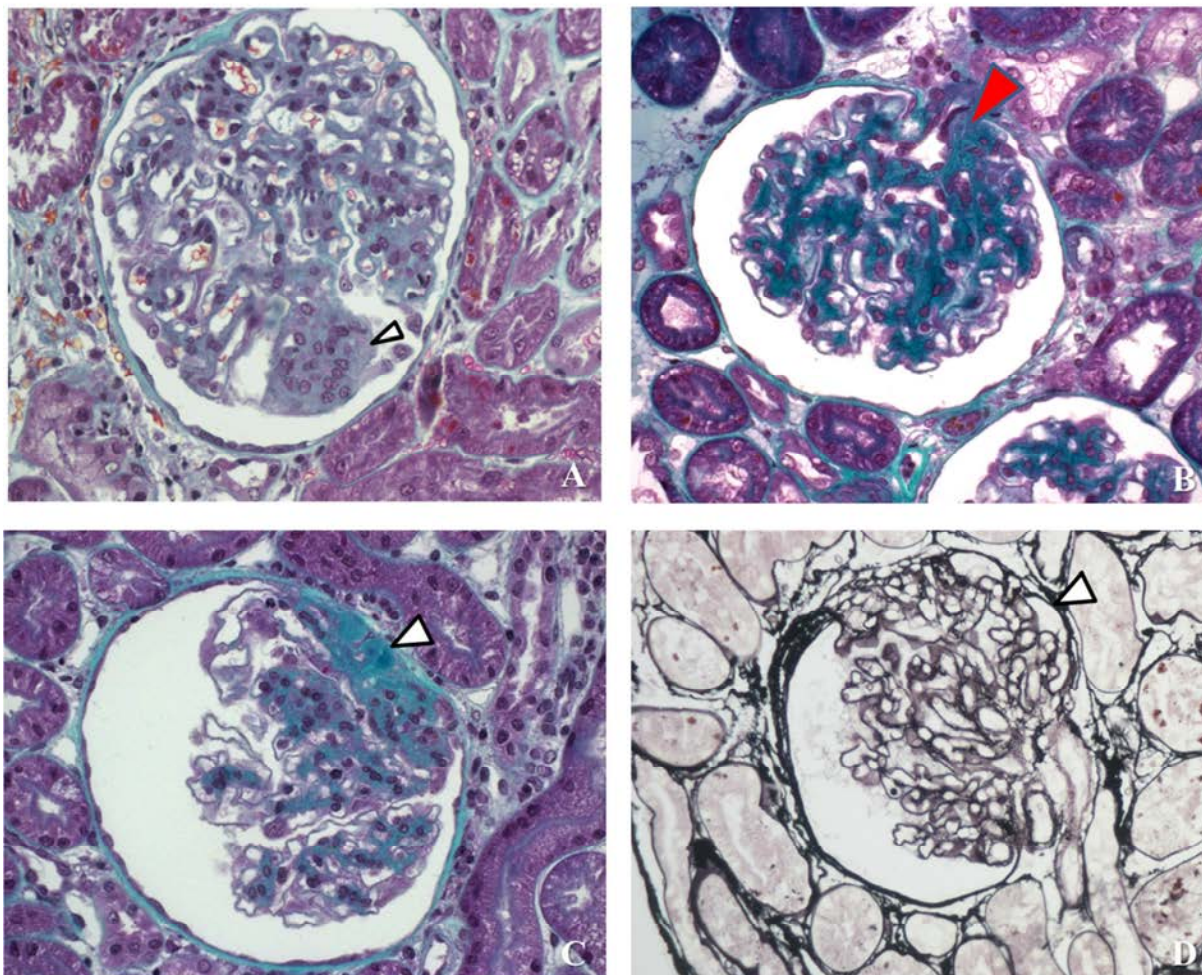


Figura 3. Fotomiografias das alterações mais prevalentes na microscopia de luz observadas nas cadelas com carcinoma mamário. **(A)** Proliferação celular e lesão segmentar focal (seta) na coloração de trichromio de Masson. x400. **(B)** Expansão de matriz (seta vermelha). x400. **(C)** Glomeruloesclerose segmentar focal com sinéquia (seta) na coloração de trichromio de Masson. x400. **(D)** Glomeruloesclerose segmentar focal com sinéquia (seta) na coloração de prata metenamina (PAMS). x400. Jaboticabal, 2014.

Das 29 amostras analisadas do grupo CM, 97% (n=28) apresentaram positividade para IgM. Desses animais, 14 apresentaram positividade apenas para IgM (50,0%), quatro para IgM/IgA (14,3%), quatro para IgM/C3 (14,3%), três para IgM/IgG (10,7%), dois para IgM/IgA/C3 (7,2%) e um para IgM/IgG/IgA (3,6%). Três controles (27,3%) foram graduados em traços a 1+. As imunoglobulinas foram distribuídas

predominantemente em mesangio em 20 animais (71,4%), sendo sete casos em alça glomerular (25,0%) e um em polo vascular (3,6%) (Figura 4).

Positividade moderada a forte foram observadas em cinco cadelas com carcinoma mamário nos depósitos de IgG e IgA em mesangio e em alça glomerular. A positividade de C3 foi observada em cinco cadelas em membrana tubular basal (MTB). IgM demonstrou forte, moderada e fraca positividade em 64,3%, 28,6% e 7,1% dos casos, respectivamente.

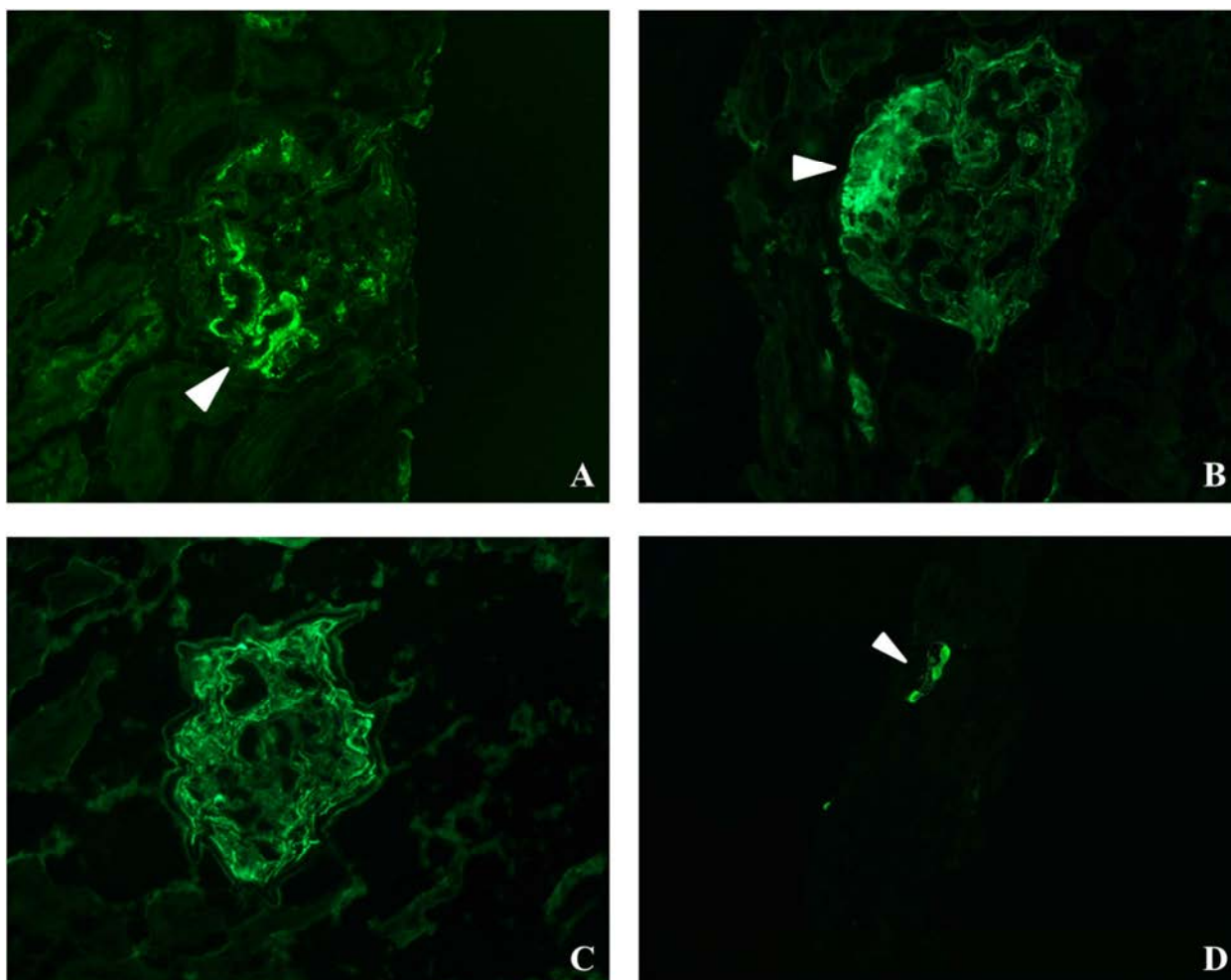


Figura 4. Imunofluorescência renal dos animais com carcinoma mamário. **(A)** Positividade forte granular de IgM em polo vascular (seta). x400. **(B)** Moderada positividade granular de IgM em mesangio associada com extensão para alça capilar e forte positividade segmentar (seta). x400. **(C)** Positividade forte granular de IgM em mesangio associada com extensão para alça capilar. x400. **(D)** Evidência de IgA negativa. Observar apenas a presença de cilindro fortemente marcado (controle positivo - seta). x100. Jaboticabal, 2014.

Microscopia eletrônica de transmissão

Na microscopia eletrônica foram evidenciados depósitos de material eletrodense em região subendotelial em mesangio. Algumas vezes, os depósitos eletrodensos estenderam-se do mesangio para alça capilar, assim como previamente verificado na imunofluorescência. Fusão focal de pedicelos também foi encontrada em grande parte dos animais com carcinoma mamário (Figura 5).

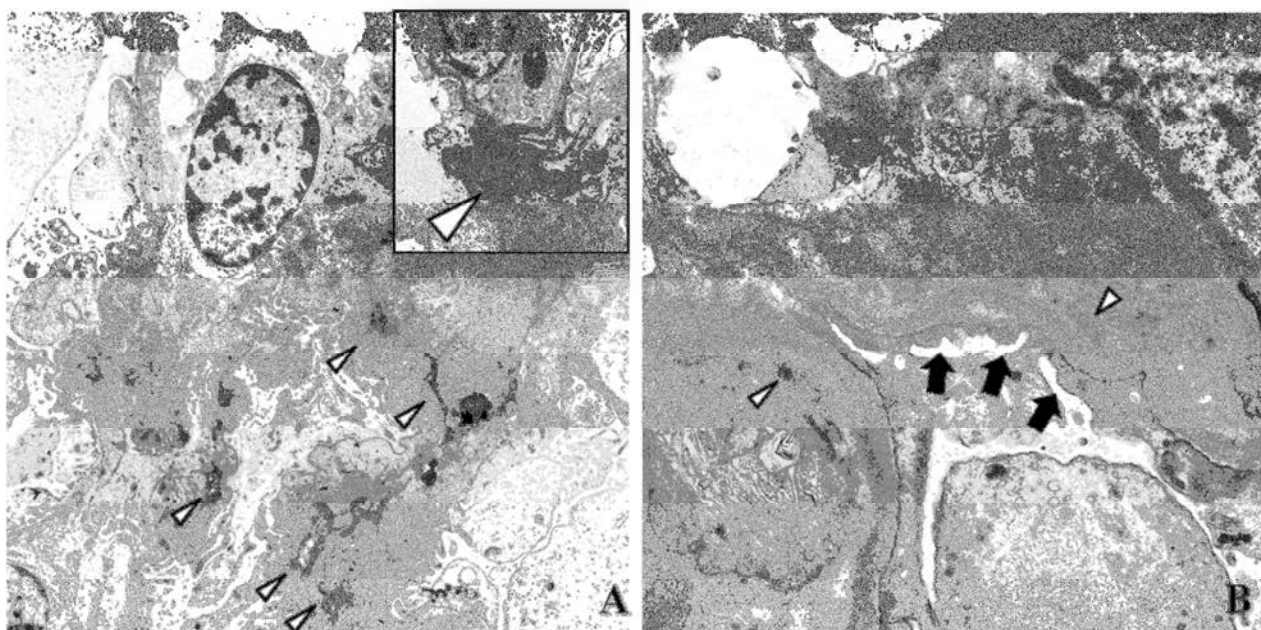


Figura 5. Fotomicrografia da microscopia eletrônica dos fragmentos renais das alterações mais prevalentes encontradas nos animais com carcinoma mamário, aumento de 44000. **(A)** Espaço subendotelial não organizado associado a depósitos eletrodensos (setas brancas) (em destaque ampliado - seta), aumento de 70000. **(B)** Presença de depósitos eletrodensos (setas brancas) e fusão de pedicelos (setas pretas), aumento de 120000. Jaboticabal, 2014.

Eletroforese das proteínas séricas e urinárias

Proteínas séricas

Proteína total e globulinas apresentaram suas concentrações séricas significativamente mais elevadas no grupo CM que os animais controle ($P=0,008$ e $P=0,011$, respectivamente) (Tabela 4).

A diferenciação e fracionamento através da técnica de eletroforese permitiu-nos observar aumentos significativos tanto na concentração da haptoglobina ($139,1 \pm 91,4$ mg/dL) quanto da transferrina ($349,2 \pm 145,9$ mg/dL) séricas no grupo CM ($P=0,0013$ e $P=0,0117$, respectivamente). Outras proteínas mensuradas, tais como ceruloplasmina, alfa 1 – antitripsina, albumina e alfa1 – glicoproteína ácida não se diferenciaram entre os grupos. No que concerne às globulinas analisadas, a IgG sérica, imunoglobulina encontrada em 13,8% das amostras de biópsias renais pela técnica de imunofluorescência no grupo CM manteve-se estável em ambos os grupos, e embora a concentração de IgA sérica do grupo CM tenha se mostrado reduzida quando comparada ao GC, esta não foi estatisticamente significativa ($P=0,09$) (Tabela 4).

Tabela 4. Valores da média e desvio padrão das proteínas séricas. Resultados obtidos nas avaliações de 11 cadelas sadias (grupo controle) e em 32 cadelas com carcinoma mamário. Jaboticabal, 2014.

Perfil seroproteico	Proteínas (mg/dL)		Valor de <i>P</i>
	Controle	Carcinoma mamário	
Proteína total*	6043,0 ± 1153,8	7218,2 ± 950,4	0,0084
Albumina	3311,9 ± 376,4	3716,9 ± 706,8	0,150
Globulinas*	2763,3 ± 656,7	4265,6 ± 1162,1	0,0117
Ceruloplasmina	29,0 ± 11,4	39,6 ± 28,6	0,0568
Transferrina*	230,0 ± 51,5	349,2 ± 145,9	0,0104
Alfa 1 - Antitripsina	165,1 ± 53,5	162,1 ± 53,7	0,4278
Haptoglobina*	43,9 ± 37,4	139,1 ± 91,4	0,0013
Alfa 1 – Glicoproteína Ácida	43,3 ± 52,6	50,1 ± 34,1	0,5879
IgA	62,0 ± 32,6	22,7 ± 15,5	0,090
IgG	1254,2 ± 1056,8	1523,4 ± 810,6	0,4409

Variáveis seguidas de asterisco (*) apresentam diferença significativa entre grupos analisados ($P < 0,05$).

Proteínas urinárias

Com relação às proteínas urinárias, houve maior número de frações proteicas sendo excretada na urina das cadelas com carcinoma mamário em comparação ao grupo controle ($P=0,0009$). Pode-se observar que animais com CM apresentaram maior

frequência de aparecimento tanto de proteínas de baixo (10 a 50 kDa) quanto de médio (60 a 80 kDa) e alto pesos moleculares (> 81 kDa). Com relação ao número de proteínas excretadas na urina, aquelas com peso molecular entre 21 a 30, e 31 a 40 kDa foram as que apareceram em maior quantidade (171 proteínas), principalmente no grupo carcinoma mamário (92,4 e 85,9%, respectivamente). As proteínas urinárias com os intervalos de peso molecular variando de 71 a 80, 81 a 90 e 101 a 110 kDa diferiram estatisticamente entre os grupos estudados, conforme Tabela 5.

Tabela 5. Aparecimento das proteínas urinárias conforme seu peso molecular (kDa) nas amostras de urina. Resultados obtidos nas avaliações de 11 cadelas sadias (grupo controle) e em 32 cadelas com carcinoma mamário. Jaboticabal, 2014.

Peso Molecular (kDa)	n	Frequência		Valor de P
		Controle (%)	Carcinoma mamário (%)	
10 a 20	21	9.52	90.48	0.258
21 a 30	79	7.59	92.41	0.267
31 a 40	92	14.13	85.87	0,200
41 a 50	52	19.23	80.77	0,577
51 a 60	64	20.31	79.69	0,218
61 a 70	43	20.93	79.07	0,427
71 a 80*	25	28.00	72.00	0,034
81 a 90*	26	23.08	76.92	0,010
91 a 100	9	33.33	66.67	0,327
101 a 110*	20	10.00	90.00	0,003
111 a 120	18	33.33	66.67	0,166
121 a 130	3	-	66.67	0,571
131 a 140	0	-	-	-
141 a 150	5	16.67	100.00	-
151 a 160	6	-	83.33	0,142
161 a 170	6	-	100.00	-
171 a 180	2	50.00	50.00	-
>180	22	22.73	77.27	0,299

Dados adicionais: n, número de proteínas observadas em cada intervalo conforme o peso molecular. Valores seguidos de * diferiram significativamente entre si nos grupos estudados (P<0,05).

V DISCUSSÃO

Essa pesquisa teve como foco principal a avaliação das alterações renais relacionadas com o carcinoma mamário na espécie canina. Embora a associação entre as alterações glomerulares e as neoplasias hematopoiéticas (HAAS e VANBEEK, 2011) e os carcinomas sólidos (BACCHETTA et al., 2009) já esteja estabelecida e reconhecida, e haja grandes avanços nestas áreas, ínfimos são os dados encontrados na literatura à respeito das alterações renais relacionadas aos carcinomas mamários. O presente estudo, utilizando-se de microscopia de luz e eletrônica, imunofluorescência, eletroforese das proteínas séricas e urinárias e exames de rotina laboratorial pertinentes à avaliação da funcionalidade renal, demonstrou haver maior perda de proteínas urinárias, deposição de diferentes classes de imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM) e complemento C3 (C3), bem como a presença de depósitos eletrodensos nos glomérulos de cadelas portadoras de carcinoma mamário, evidenciando uma importante associação entre carcinoma mamário e alterações renais.

De acordo com a revisão feita por BACCHETTA et al. (2009), o primeiro trabalho relacionado a alta prevalência de doenças glomerulares em pessoas com câncer foi realizado no ano de 1966. Recentemente, um único experimento com indução do carcinoma em modelos experimentais utilizando ratos geneticamente imunossuprimidos (*nude rat F344/NJcl-run*) foi realizado para averiguar a relação entre carcinoma e as glomerulopatias, no qual proteinúria e declínio da taxa de filtração glomerular foram os resultados mais prevalentes, e fatores como a diminuição da pressão do fluxo sanguíneo renal e deposição de imunoglobulinas também foram relatados (TAKEDA et al., 2012). Embora nenhum caso de tumor de mama tenha sido avaliado, demais autores sugeriram tanto a produção de substâncias provenientes das células tumorais (JHAVERI et al., 2013) quanto a deposição de imunocomplexos como possíveis causadores de alterações renais em humanos portadores de diversos tipos de

neoplasias, incluindo carcinomas de pulmão e próstata, neoplasias hematopoiéticas e lipossarcomas (PASCAL et al., 1976; LEFAUCHER et al., 2006).

No trabalho em tela, não foi possível caracterizar a existência de alterações de fluxo sanguíneo renal, visto que os animais estudados foram provenientes da casuística natural e com isso, não ter sido possível realizar a comparação dos parâmetros com os resultados prévios ao aparecimento do câncer, contudo, foi observada maior concentração de globulinas séricas, especialmente das proteínas de fase aguda (PFA) transferrina e haptoglobina no grupo CM. Foi indicado através do proteinograma sérico que algumas proteínas, principalmente as de fase aguda, apresentaram-se em maior concentração no grupo carcinoma. Embora esse aumento tenha sido importante, essa se refere a uma reação complexa e inespecífica do organismo animal e se desenvolve rapidamente após qualquer dano tecidual. A origem desta resposta pode ser atribuída a causas infecciosas, imunológicas, neoplásicas, traumáticas, ou outras e o seu propósito é restaurar a homeostase e remover a causa do desequilíbrio. Ademais, cabe salientar que a resposta de fase aguda é muito rápida. Desenvolve-se antes da resposta imune específica e, em muitos casos, antes do início dos sinais clínicos. Por isso, as PFA podem ser consideradas marcadores precoces de qualquer processo patológico ou doença (CERÓN et al., 2005), e poderiam, no caso aqui estudo estarem relacionadas às lesões renais encontradas, porém são necessários futuros estudos para melhor investigação.

Observou-se que apenas uma cadela apresentou características de nefropatia membranosa (NM) (3,1%) e que, apesar dos trabalhos sugerirem a prevalência de 1% até 22% desse tipo de glomerulopatia em humanos com carcinoma (LEFAUCHER et al., 2006; CAMBIER; RONCO, 2012), é importante frisar que os animais foram selecionados ao acaso, diferentemente dos trabalhos já descritos em que a biópsia foi utilizada para diferenciar histopatologicamente glomerulopatias pré-existente. Pode-se, inclusive verificar a prevalência de outros tipos de lesões que acarretaram proteinúria leve ou subclínica assim como verificada em trabalhos em humanos com neoplasias subclínicas (PASCAL et al., 1976) e ratos utilizados como modelos experimentais de carcinoma (TAKEDA et al., 2012). Leafaucher et al., 2006 reportou dois principais riscos

de ocorrência de NM paraneoplásica e sua diferenciação da primária, pessoas com mais de 65 anos e histórico de consumo de mais de 20 pacotes de cigarros por ano. Tal dado apresenta-se difícil de comparação, pois além de não haver nenhum caso de nefropatia membranosa primária descrito em cães, o pareamento por idade realizado no grupo controle minimiza a possibilidade da influência dos supracitados fatores em cadelas com tumor de mama.

Espessamento da membrana basal glomerular, proliferação celular, lesão segmentar focal, sinéquia, glomeruloesclerose e FIAT foram importantes alterações encontradas à microscopia de luz. Embora, não tenham sido verificadas alterações no trabalho experimental com carcinoma em ratos imunossuprimidos (TAKEDA et al., 2012), pode-se sugerir que essas diferenças possam ter decorrido do curto espaço de tempo utilizado para avaliação de modelos experimentais com carcinoma induzido quando comparado com o modelo natural, e do fato dos ratos utilizados serem oriundos de animais geneticamente imunossuprimidos, o que pode ter alterado sobremaneira a resposta do sistema imunológico frente a neoplasia.

Embora a razão não esteja completamente esclarecida, foi observado um maior número de células inflamatórias infiltradas no glomérulo em 30% das cadelas do grupo CM. Uma possível justificativa para tal ocorrência poderia ser advinda da deposição de complexos imunes contendo antígenos tumorais no mesangio e alças glomerulares, induzindo a produção moléculas quimiotáticas proinflamatórias (LEFAUCHER et al., 2006). Salienta-se que nenhuma alteração foi verificada ao nível imunológico celular, ou seja, a contagem de leucócitos totais e suas subpopulações manteve-se dentro dos valores considerados normais para a espécie canina, e dessa forma, apenas a biopsia renal pode identificar a migração de células inflamatórias aos rins das cadelas com carcinoma mamário.

Todavia tenha-se observado degeneração hidrópica tubular renal leve a moderada em 15,6% dos pacientes com carcinoma mamário, isto pode estar correlacionado à processos isquêmicos ocorridos durante o procedimento cirúrgico. Diante do fato dos animais do grupo controle também terem sido submetidos aos mesmos procedimentos anestésicos e cirúrgicos (incluindo protocolo de fluidoterapia

suporte), e em decorrência da alta frequência de proteínas de baixa densidade encontrados na urina do grupo CM, é mais provável que as alterações tubulares estejam relacionadas à presença da neoplasia.

Foi observado espessamento fibroelástico de arteríola em um único animal com carcinoma mamário, e apesar desse achado ser fortemente relacionado com processos hipertensivos em humanos (ALVES, 2006), a pressão arterial sistólica nesse paciente foi de 145 mmHg, considerado dentro do intervalo de referência para a espécie em questão. Dessa forma sugere-se que possam existir outras causas que levem a essa alteração em cães, e embora não se pode incriminar o carcinoma mamário como responsável por tal alteração, visto esta ter sido observada em apenas um caso isolado, futuras investigações são requeridas.

Em contraste com o trabalho de TAKEDA et al., 2012 onde a imunofluorescência glomerular positiva para imunoglobulinas foi observada apenas nos ratos proteinúrico o mesmo não foi verificado no presente estudo. Apesar de verificada positividade para algum tipo de imunoglobulina e/ou C3 em 96,6% das cadelas estudadas, esse achado não apresentou correlação com o fator proteinúria, ou seja, foi observado imunofluorescência positiva mesmo em animais considerados não proteinúrico (UPC < 0,2). Os fatores tempo de desenvolvimento e progressão da neoplasia (longo período de estímulo e secreção de substâncias pelos tumores) talvez possam ser utilizados para explicar a diferença encontrada entre cães naturalmente acometidos e ratos experimentalmente induzidos por neoplasia mamária (LEFAUCHER et al., 2006), e que possivelmente, lenta deposição e rearranjo glomerulares possam ocorrer nos casos naturais.

Resultados dos trabalhos realizados em humanos e experimentos em ratos exibiram predomínio à deposição de IgG e concomitante elevação das frações das mesmas imunoglobulinas séricas (TAKEDA et al., 2012; PASCAL et al., 1976), enquanto a principal imunoglobulina depositada nas cadelas do grupo CM foram as IgM. Embora não se possa precisamente afirmar, é possível que exista um predomínio de IgM na espécie canina, pois as demais imunoglobulinas, identificadas pela técnica de eletroforese sérica, não diferiram entre os grupos estudados, levantando a suspeita

de que o aumento de IgG circulantes não é algo comum no carcinoma mamário em cadelas, pelo menos nas fases estudadas.

De maneira geral, a reação positiva moderada-forte para IgM nos glomérulos sugerem que exista um mecanismo imunológico subjacente e o achado de fluorescência positivo possa ser oriundo do fato desta ser uma glicoproteína de alto peso molecular (880 a 941 kDa) e ter sido aprisionada no glomérulo (ALVES, 2006). Importante ainda frisar que apesar de 27,3% (n=3) dos animais controle terem apresentando positividade à imunoglobulinas, essa foi considerada fraca, e aparentemente sem significância clínica. Estudos futuros, à espelho das glomerulopatias encontradas em idosos em humanos (VIEIRA NETO; MOYSÉS-NETO; DANTAS, 2006) devem ainda vir a suplantiar esses achados.

Na análise ultraestrutural pela microscopia eletrônica de transmissão foram observados depósitos eletrodensos subendoteliais corroborando aos achados descritos no modelo experimental de Takeda et al. (2012) e ao trabalho em humanos envolvendo neoplasias subclínicas de Pascal et al. (1976). Porém, tais resultados diferem dos encontrados nos carcinoma sólidos em outros órgãos, onde foi observada a predominância de depósitos subepiteliais. Diante desses fatos, o achado de depósitos eletrodensos subendoteliais, associado a maior frequência de globulinas concomitante ao aparecimento de proteínas de alta densidade na urina poderia reafirmar a hipótese que exista uma provável deposição de complexos imunes (p.ex., imunocomplexos classe II) (PASCAL et al., 1976). Ainda, considera-se que essa prerrogativa dos depósitos subendoteliais, provavelmente seja a principal explicação da baixa ocorrência de proteinúria clínica (nefrítica ou nefrótica) em pacientes com neoplasia mamária quando comparada com os carcinomas em outros órgãos.

Foi observado ainda nas análises das correlações que o fator tamanho e volume tumoral estão diretamente relacionados com as alterações renais. Dessa forma é aconselhável que os mesmos sejam resseccionado o mais precocemente possível para evitar que ocorram danos aos rins, e que novos estudos prospectivos devam ser realizados para suplantiar essa afirmativa.

Embora não tenha sido o objetivo principal pode-se afirmar que a biópsia renal é um procedimento seguro, e apesar da hematúria macroscópica ter sido observada em uma proporção superior à descrita na literatura veterinária (20,4% e 1-4%, respectivamente) (VADEN, 2004; VADEN, 2005), esse achado muito provavelmente ocorreu devido a avaliação urinária ter sido realizada logo após a biópsia renal em comparação com os outros trabalhos, nos quais fizeram a avaliação após 24 a 72 horas do procedimento.

Não foram encontradas alterações de marcadores como creatinina, ureia, densidade urinária e EF_{Na} entre os grupos estudados. Embora o grupo CM tenha apresentado valores de UP/C superiores aos do GC, a média foi de 0,4, valor considerada limítrofe e, ainda, sem significância clínica em pacientes não azotêmicos segundo a *International Renal Interest Society* (IRIS 2009)¹⁵. Dessa forma, diante da suspeita de alterações glomerulares e tubulares em pacientes com proteinúria subclínica a eletroforese das proteínas urinárias pode ser utilizada.

Este trabalho evidencia uma importante associação e confirma a existência entre a associação do carcinoma mamário e alterações renais, particularmente depósitos eletrodensos subendoteliais, o que o diferencia dos depósitos descritos nos demais carcinomas encontrados em outros órgãos. Ademais, o carcinoma mamário em cadelas é um intrigante modelo da associação entre o câncer e as glomerulopatias, podendo inclusive servir como modelo experimental para humanos.

¹⁵ <http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS%202006%20Staging%20of%20CKD.pdf>

VI CONCLUSÃO

Existem importantes alterações renais relacionados ao carcinoma mamário em cadelas, sendo que a prevalência dos achados estão relacionados aos depósitos eletrodensos subendoteliais.

VII REFERÊNCIAS¹⁶

ARESU, L.; PREGEL, P.; BOLLO, E.; PALMERINI, D.; SERENO, A.; VALENZA, F. Immunofluorescence staining for the detection of immunoglobulins and complement (C3) in dogs with renal disease. **Veterinary Record**, London, v.163, p. 679-683, 2008.

ALVES, M. A. R. Propedêutica das glomerulopatias. In: BARROS, R. T.; ALVES, M. A. R.; DANTAS, M.; KIRSZTAJN, G. M.; SENS, Y. A. S. **Glomerulopatias: patogenia, clínica e tratamento**. São Paulo: Sarvier, 2006, 2ed, cap. 6, p. 64-81.

BACCHETTA, J.; JUILLARD, L.; COCHAT, P.; DROZ, J. Paraneoplastic glomerular diseases and malignancies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Netherlands, v. 70, p. 39-58, 2009.

BURANAKARL, C.; ANKANAPORN, K.; THAMMACHAROEN, S.; TRISIRIROJ, M.; MALLERATMONGKOL, T.; THONGCHAI, P.; PANASJAROEN, S. Relationships between degree of azotaemia and blood Pressure, urinary protein:creatinine ratio and fractional excretion of electrolytes in dogs with renal azotaemia. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam. v. 31, p. 245-257, 2007.

CAGNOLI, L. Solid tumors and paraneoplastic glomerulonephritis. **Giornale Italiano di Nefrologia**, Milano, v. 27, Suppl. 50:S5, p. S 1-7, 2010.

CAMBIER, J.; RONCO, P. Onco-Nephrology: Glomerular Diseases with Cancer. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, D.C., v 7, p. 1701-1712, 2012.

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; De NARDI, A. B. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal Veterinary Pathology**, Botucatu, v. 4, n. 2, 153-180, 2011.

¹⁶ ABNT: NBR 6023/2002.

CERÓN, L.L.; ECKERSALL, P.D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n.2, p. 85-99, 2005.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; COSTA, T. A.; MACEDO, T. R.; RODIGHIERI, S. M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C. H. Prevalence of neoplasias and kind of treatments in dogs seen in Veterinary Hospital at University Federal of Paraná. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.7, n.2, p.15-26, 2002.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; ROCHA, N. S.; FERNADES, S. C. Neoplasias mamárias. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2009. cap. 25, p. 372-383.

DONNELLY, S.; GOODYER, P.; MAUER, M. Comparing the automated versus manual method of needle biopsy for renal histology artefacts. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 23, p. 2098-2100, 2008.

EAGEN, J. W.; LEWIS, E. J. Glomerulopathies of neoplasia. **Kidney International**, New York, v. 11, p. 297-306, 1977.

FERREIRA, E.; BREGUNCI, G. C.; SCHMITT, F. C.; CASSALI, G. D. Protocol for the anatomopathological examination of canine mammary tumors. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 1, 2003.

FILGUEIRA, P. H. O.; VASCONCELOS, L. F.; SILVA, G. B.; DAHER, E. F. Paraneoplastic syndromes and the kidney. **Saudi Journal of Kidney Disease and Transplantation**, Riyadh, v. 21, n. 2, p. 22-231, 2010.

GIRAUDEL, J. M.; PAGÈS, J. P.; GUELFY, J. F. Monoclonal gammopathies in the dog: A retrospective study of 18 cases (1986-1999) and literature review. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood. v.38, p.135–147. 2002

GRANT, D. C.; FORRESTER, S. D. Glomerulonephritis in dogs and cats: glomerular function, pathophysiology, and clinical signs. **Compendium: Continuing Education for Veterinarians**, Yardley, v. 23, n. 8, 739-743, 2001.

GRAUER, G. F. Canine glomerulonephritis: new thoughts on proteinuria and treatment. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v.46, p. 469-478, 2005.

HAAS, M.; VANBEEK, C. Glomerular diseases associated with hematopoietic neoplasms: an expanding spectrum. **Kidney International**, New York, v. 80, p. 701-703, 2011.

HEIENE, R.; KRISTIANSEN, V.; TEIGE, J.; JANSEN, J. H. Renal histomorphology in dogs with pyometra and control dogs, and long term clinical outcome with respect to signs of kidney disease. **Acta Veterinaria Scandinavica**, London, v. 49, n.13, p.1-9, 2007.

HUMPHREYS, B. D.; SOIFFER, R. J.; MAGEE, C. C. Renal failure associated with cancer and its treatment: an update. **Journal of the American Society of Nephrology**, Baltimore. v. 16, p. 151-161, 2005.

HUSSAIN, F.; MALLIK, M.; MARKS, S. D.; WATSON, A. R. Renal biopsies in children: current practice and audit of outcomes. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 25, p. 485-489, 2010.

JHAVERI, K. D.; SHAH, H. H.; CALDERON, K.; CAMPENOT, E. S.; RADHAKRISHNAN, J. Glomerular diseases seen with cancer and chemotherapy: a narrative review. **Kidney International**, New York, v. 84, p. 34-44, 2013.

JORGENSEN, L.; HEUCH, I.; JENSSEN, T.; JACOBSEN, B. K. Association of albuminuria and cancer incidence. **Journal of American Society Nephrology**, Baltimore, v. 19, p. 992-998, 2008.

LACOMBE, J.; MANGÉ, A.; JARLIER, M.; BASCOUL-MOLLEVI, C.; ROUANET, P.; LAMY, P.; MAUDELONDE, T.; SOLASSOL, J. Identification and validation of new autoantibodies for the diagnosis of DCIS and node negative early-stage breast cancers. **International Journal of Cancer**, New York, v. 132, p. 1105-1113, 2013.

LEES, G. E. Early diagnosis of renal disease and renal failure. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, Philadelphia, v.34, p.867-885, 2004.

LEFAUCHER, C.; STENGEL, B.; NOCHY, D. MARTEL, P.; HILL, G. S.; JACQUOT, C.; ROSSERT, J. Membranous nephropathy and cancer: epidemiologic evidence and determinants of high-risk cancer association. **Kidney International**, New York, v. 70, p. 1510-1517, 2006.

LEFEBVRE, H. L. Renal function testing. In: BARTGES, J.; POLZIN, D. J. **Nephrology and Urology of Small Animals**. Wiley-Blackwell. 2011, p. 91-96.

NAOUM, P. C. Proteínas plasmáticas. In: Naoum, P. C. **Eletroforese – Técnicas e Diagnósticos**. Baltimore: Livraria Santos LTDA.1999, p. 13-38.

OLIVEIRA FILHO, J. C.; KOMMERS, G. D.; MASUDA, E. K.; MARQUES, B.M.F.P.P.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS C. S. L. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, 30, n. 2, p.177-185, 2010.

PASCAL, R. R.; IANNACCONE, P. M.; ROLLWAGEN, M.; HARDING, T.A.; BENNETT, S. Electron microscopy and immunofluorescence of glomerular immune complex deposits in cancer patients. **American Association for Cancer Research**, Chicago, v. 36, p. 43-47, 1976.

PEDERSEN, L. M.; MILMAN, N. Prevalence and prognostic significance of proteinúria in patients with lung cancer. **Acta Oncologica**, London, v. 35, n. 6, p. 691-695, 1996.

SAWYER, N.; WADSWORTH, J.; WIJNEN, M.; GABRIEL, R. Prevalence, concentration and prognostic importance of proteinuria in patients with malignancies. **British Medical Journal**, London, v. 296, p.1295-1298, 1988.

SCHAEFER, H.; KOHN, B.; SCHWEIGERT, F. J.; RAILA, J. Quantitative and qualitative urine protein excretion in dogs with severe inflammatory response syndrome. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Filadélfia, v. 25, p. 1292-1297, 2011.

TAKEDA, S; CHINDA, J.; MURAKAMI, T.; NUMATA, A.; IWAZU, Y.; AKIMOTO, T.; HAMANO, Y.; MUTO, S., TAKAHASHI M.; KUSANO, E. Development of features of glomerulopathy in tumor-bearing rats: a potential model for paraneoplastic glomerulopathy. **Nephrology, Dialysis, Transplantation – European Renal Association**, England, v. 27, p. 1786-1792, 2012.

TOMAYKO, M. M.; REYNOLDS, C.P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Germany, v. 24, p. 148-154, 1989.

VADEN, S. L. Renal biopsy: methods and interpretation. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 34, p. 887-908, 2004.

VADEN, S. L. Renal biopsy of dogs and cats. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, Filadélfia, v. 20, p. 11-22, 2005.

VADEN, S. L.; LEVINE, J. F.; LEES, G. E.; GROMAN, R. P.; GRAUER, G. F.; FORRESTER, S. D..Renal biopsy: a retrospective study of methods and complications in 283 dogs and 65 cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Filadélfia, v. 19, p. 794–801, 2005.

VIERA NETO, O. M.; MOYSÉS-NETO, M.; DANTAS, M. Glomerulopatias nos idosos. In: BARROS, R. T.; ALVES, M. A. R.; DANTAS, M.; KIRSZTAJN, G. M.; SENS, Y. A. S. **Glomerulopatias: patogenia, clínica e tratamento**. São Paulo: Sarvier, 2006, 2ed. cap. 27, p. 437-450.

YHEE, J. Y.; YU, C. H.; KIM, J. H.; IM, K. S.; CHON, S. K.; SUR, J. H. Histopathological retrospective study of canine renal disease in Korea, 2003~2008. **Journal of Veterinary Science**, Suwon, v. 11, n. 4, p. 277-283, 2010.

ZINI, E.; BONFANTI, U.; ZATELLI, A. Z. Diagnostic relevance of qualitative proteinuria evaluated by use of sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis and comparison with renal histologic findings in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 65, n. 7, p. 964-971, 2004.

ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Fine needle aspiration cytologic and histologic correlation in canine mammary tumors. **Brazilian Journoul of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 38-41, 2001.

APÊNDICES

Apêndice 1A. Médias e respectivos desvio padrão dos parâmetros bioquímicos séricos Resultados obtidos nas avaliações de 11 cadelas sadias (grupo controle) e em 32 cadelas com carcinoma mamário. Jaboticabal, 2014.

Variáveis	GRUPOS		Valores de referência**
	Controle	Carcinoma mamário	
Alanina aminotransferase (U/L)	42,0 ± 32,1	66,0 ± 32,6	20-150
Fosfatase alcalina (U/L)	74,2 ± 25,9	65,9 ± 47,7	20-150
Sódio (mEq/L)	151,9 ± 2,6	149,1 ± 4,9	146-156
Potássio (mEq/L)	4,0 ± 0,5	4,3 ± 0,5	3,5-5,1
Cálcio total (mg/dL)	10,5 ± 0,8	10,0 ± 1,7	8,6-11,2
Fosfato (mg/dL)	4,75 ± 1,1	5,1 ± 0,8	2,2-5,5
Creatinina (mg/dL)	0,98 ± 0,26	0,91 ± 0,21	0,5-1,5
Ureia (mg/dL)	26,1 ± 10,2	32,5 ± 15,1	15-65
Proteína total* (g/L)	6,0 ± 1,1	7,2 ± 0,9	5,9-7,9
Albumina (g/L)	3,3 ± 0,4	3,7 ± 0,7	2,6-4,0

Variáveis seguidas de asterisco (*) apresentam diferença significativa entre grupos analisados ($P < 0,05$).

**Valores de Referência para a espécie canina do Laboratório de Patologia Clínica – Hospital Veterinário UNESP – campus de Jaboticabal.

Apêndice 2A. Descrição dos parâmetros avaliados no grupo carcinoma mamário no que concerne a número de nódulos mamários, volume total das neoplasias, classificação TNM e histopatológica, e região anatômica e grau de malignidade da neoplasia mamária de cada cadela, individualmente. Jaboticabal, 2014.

Animais	Número de nódulos	Volume total das neoplasias (cm ³)	Tamanho (TNM)	Classificação histopatológica ¹⁷	Região anatômica	Grau de malignidade
1	2	90,37	T3	tubular e tubulopapilífero	A (E), I(E)	1
2	3	3,97	T2	tubulopapilífero e complexo	A(D), I(D)	1
3	2	3,12	T2	tubular	C(E), I(D)	1
4	2	1,06	T1	tubular e complexo	C(E), I(E)	1
5	1	0,04	T1	tubular	T(E)	1
6	3	5,86	T1	complexo	I(E), C(D), (ID)	1
7	1	0,04	T1	complexo	A(E)	1
8	4	57,07	T3	complexo	T(E), A(E), A(D)	2
9	2	0,09	T1	tubulopapilífero	A(E)	1
10	10	6,82	T1	complexo	Ax(E), C(E), I(E), C(D), A(D), I(D)	3
11	3	0,58	T1	tubular	A(E), I(E)	1
12	6	5,57	T2	tubular	C(E), I(E), C(D), A(D), I(D)	1
13	4	282,84	T3	tubular	C(E), I(E), T(D)	1
14	6	4,43	T1	tubular e complexo	A(E), A(D), I(D)	1
15	3	23,54	T2	complexo	C(E), C(D), A(D)	1
16	2	573,52	T3	tubular	C(E), I(D)	3
17	6	58,85	T3	tubular e complexo	T(E), C(E), A(E), I(E), C(D), I(D)	3
18	1	0,18	T1	tubular e complexo	I(D), C(E)	1
19	1	5,57	T1	sólido	A(E)	1

Continua na página seguinte...

¹⁷ Segundo os critérios estabelecidos por Cassali et al. (2011)

... continuação da tabela 2A.

20	3	0,13	T1	tubular	I(E), I(D)	1
21	1	0,36	T1	tubular	A(D)	1
22	4	3,23	T1	complexo	C(E), C(D)	2
23	2	288,90	T3	misto e sólido	C(E), A(E)	1
24	3	0,13	T1	misto	A(D)	1
25	2	23,18	T2	tubular e sólido	A(D)	1
27	1	0,04	T1	tubular	T(D)	1
28	5	89,77	T3	tubular, complexo	C(E), I(E), T(D), C(D), A(D)	1
29	10	418,26	T3	complexo e tubular	T(E), C(E), A(E), I(E), Ax(D), T(D), C(D), A(D), I(D)	1
30	10	462,60	T3	misto e tubular	Ax(E), C(E), A(E), I(E), C(D), A(D), I(D)	1
31	3	767,15	T3	misto	Ax(E), C(D), A(D), I(D)	1
32	1	3,57	T1	tubular	A(E)	1

Ax = axilar, T = torácica, C = central, A = abdominal, I = inguinal, (D) = direita, (E) = esquerda.

Apêndice 3A. Ficha de consciência e de concordância com as condições do protocolo experimental utilizada. Jaboticabal, 2014.

Jaboticabal, ____ de _____ de 201__.

DECLARAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Eu, _____, RG _____ Declaro para os devidos fins que estou ciente do protocolo experimental do projeto de pesquisa intitulado “CORRELAÇÃO ENTRE ALTERAÇÕES TÚBULO-GLOMERULARES E O GRAU HISTOPATOLÓGICO DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS” sob responsabilidade do Médico Veterinário Leandro Zuccolotto Crivellenti (Doutorando) e do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana (Orientador) em desenvolvimento na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” campus de Jaboticabal – SP (UNESP-Jaboticabal), cobre os custo dos exames laboratoriais realizados no laboratório clínico do Hospital Veterinário da UNESP conforme informado na tabela relacionada ao projeto (não estão inclusos os procedimentos relacionados com a cirurgia), e desejo que meu cão de nome _____, raça _____, idade _____, seja incluso no grupo experimental. Por estar ciente dos riscos inerentes a todo estudo experimental, assumo a responsabilidade sobre minha decisão e isento os pesquisadores e a instituição (FCAV-UNESP, Jaboticabal) sobre eventuais problemas que meu cão possa apresentar durante ou após o período experimental.

Assinatura