

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CADELAS: EXPRESSÃO
GÊNICA E PROTEICA DA VIA WNT/B-CATENINA, SUA
ASSOCIAÇÃO COM A TRANSIÇÃO EPITÉLIO-
MESÊNQUIMA E PROGNÓSTICO**

Erika Maria Terra
Médica veterinária

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CADELAS: EXPRESSÃO
GÊNICA E PROTEICA DA VIA WNT/B-CATENINA, SUA
ASSOCIAÇÃO COM A TRANSIÇÃO EPITÉLIO-
MESÊNQUIMA E PROGNÓSTICO**

Erika Maria Terra

Orientadora: Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa

Co-orientadora: Profa. Dra. Renée Laufer Amorim

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária (Área de Clínica Médica Veterinária).

2014

Terra, Erika Maria
T323n Neoplasias mamárias de cadelas: Expressão gênica e proteica da
via Wnt/ β -catenina, sua associação com a transição epitélio-
mesênquima e prognóstico / Erika Maria Terra. -- Jaboticabal, 2014
xvii, 105 p. : il. ; 28 cm

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

Orientadora: Mirela Tinucci Costa

Coorientadora: Renée Laufer Amorim

Banca examinadora: Felipe Augusto Ruiz Sueiro, Noeme Sousa
Rocha, Geovanni Dantas Cassali, Andriago Barboza De Nardi

Bibliografia

1. Cão. 2. Metástase. 3. EMT. 4. Imuno-histoquímica. 5. RNAm. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-006:636.7

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CADELAS: EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DA VIA WNT/B-CATENINA, SUA ASSOCIAÇÃO COM A TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESEÑQUIMA E PROGNÓSTICO

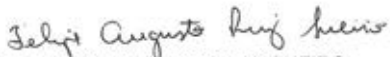
AUTORA: ERIKA MARIA TERRA

ORIENTADORA: Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. RENÉE LAUFER AMORIM

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


Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. FELIPE AUGUSTO RUIZ SUEIRO
VETPAT - Laboratório de Patologia Veterinária / Campinas/SP


Profa. Dra. NOEME SOUSA ROCHA
Departamento de Clínica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu


Prof. Dr. GEOVANNI DANTAS CASSALI
Departamento de Patologia Geral / Universidade Federal de Minas Gerais / Belo Horizonte/MG


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

Data da realização: 30 de maio de 2014.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ERIKA MARIA TERRA – nascida em um de novembro de 1983, na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, filha de José Luiz Pereira Terra e Maria de Fátima Tostes Terra. Iniciou a graduação no curso de Medicina Veterinária em fevereiro de 2003 na FCAV/Unesp Jaboticabal, tendo finalizado a mesma em dezembro de 2007. Desenvolveu projeto de iniciação científica, com bolsa PIBIC, sob a orientação do Prof. Dr. Dalton José Carneiro, na área de histologia no ano de 2005, mais especificamente avaliando alterações histológicas do trato digestório de peixes. Durante a graduação, participou de cursos e realizou estágios relacionados com diversas áreas disponibilizadas pelo curso de Medicina Veterinária, inclusive na área de oncologia. Ingressou no programa de pós-graduação para o curso de Mestrado em agosto de 2008 pela FMVZ/Unesp Botucatu sob a orientação da Prof. Dra. Noeme Sousa Rocha. Durante o mestrado passou a atender como voluntária no Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário da FCAV/Unesp Jaboticabal. Ministrou aulas e palestras, participou de congressos na área e auxiliou na organização de eventos além de publicar artigos em periódicos e anais de congressos. Em 2010, defendeu sua dissertação intitulada “TGFβ, pSmad2, p53, p63, E-caderina e Vimentina como marcadores prognósticos em tumores espontâneos de mama de cadelas”. Em agosto de 2010 iniciou o curso de Doutorado pela FCAV/Unesp Jaboticabal sob a orientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa e se manteve no atendimento voluntário do Serviço de Oncologia Veterinária do HV desta Instituição durante todo o curso. Ministrou palestras e colaborou em aulas para a graduação e pós-graduação, além da participação em duas bancas de conclusão do curso de graduação em medicina veterinária. Realizou estágio de docência na disciplina de Clínica Médica de Pequenos Animais no segundo semestre de 2011 junto aos alunos do 3º ano de graduação em medicina veterinária da FCAV/Unesp Jaboticabal. Participou de congressos científicos nacionais e internacionais e em dois congressos no exterior (2012 e 2013) com trabalho selecionado para apresentação oral. Realizou estágio de pesquisa pela Mississippi State University durante três meses sob a supervisão do Prof. Dr. Camilo Bulla, onde trabalhou com cultivo celular de osteossarcoma e neoplasias mamárias caninas com o apoio financeiro da FAPESP. Durante o doutorado publicou artigos científicos em periódicos nacionais e internacionais de impacto na medicina veterinária.

Dedico

À minha família (meus pais e minha irmã) por serem a minha essência e fonte de inspiração

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à Deus pelo dom da vida e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus pais pelo apoio constante desde o início da graduação. Dediquei este trabalho à vocês pois esta conquista também lhes pertence. Eu sei que vocês sofreram a cada negativa, a cada expectativa, a cada viagem, a cada mudança, mas nunca deixaram de me encorajar a continuar e chegar ao fim. Sou uma pessoa extremamente feliz de poder dividir este momento com vocês.

À minha orientadora, Profa. Mirela Tinucci Costa, minha “mãe acadêmica”, pela paciência, incentivo e colaboração em todas as dificuldades surgidas não só relacionadas ao projeto, mas também em minha vida pessoal. Como pessoa, professora e orientadora é um exemplo a ser seguido.

À minha co-orientadora, Profa. Renée Laufer Amorim, que teve participação ativa desde a elaboração deste projeto até o momento das análises finais. Você foi fundamental para a realização desta pesquisa. Muito obrigada pela sua insistência e otimismo, já que sem eles chegar ao fim teria sido ainda mais difícil.

Ao professor e amigo Geovanni Cassali pelos conselhos, ensinamentos e pelo exemplo de pesquisador que é. O seu conhecimento acerca das neoplasias mamárias em cadelas é muito grande, mas sua humildade e dedicação ao ensino e a pesquisa são ainda maiores. Poder contar com sua ajuda e confiança durante este projeto e também fora dele foi algo muito incentivador.

À FAPESP pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de estudos referente à esta pesquisa e por proporcionar a oportunidade de apresentar trabalhos em congressos internacionais, além de financiar a realização do estágio de pesquisa na Mississippi State University.

À minha irmã, a primeira e melhor amiga que a vida me deu.

Ao meu namorado Marcos (Bah), meu porto seguro e a minha melhor companhia para todas as horas. Você é a pessoa que me faz rir mesmo quando a vontade é chorar, me faz seguir adiante mesmo quando a vontade é

desistir. Sem dúvida o homem da minha vida e a pessoa que eu quero ter ao lado pelo resto dos meus dias.

À minha amiga Letícia Anai por ter participado em todas as fases deste projeto desde antes do início. Você é uma das pessoas mais sinceras que conheço e leva a sério o significado da palavra amizade. Dividiu comigo tempos alegres e tristes, me recebeu em casa, e foi a melhor companhia para “passar apuros” no Brasil e no exterior (rs). Muito obrigada por toda a ajuda direta ou indireta para que eu chegasse ao final do doutorado.

À minha companheira Rosana Salvador, que dividiu todas as angústias e incertezas da execução deste projeto, desde a coleta do material até o final do experimento. As viagens à Botucatu não seriam as mesmas sem você para compartilhar tudo comigo. Posso dizer que a sua dedicação e paciência me ensinaram muito.

À “equipe mamária”: Rosana, Talita e Giovanna pela colaboração e apoio. A participação de cada uma na realização deste projeto foi indispensável, desde o atendimento dos animais até a finalização da redação da tese. Cada uma, com seu jeitinho ajudou como podia e contribuiu muito para os resultados aqui apresentados.

À amiga Geórgia gostaria de agradecer pela revisão dos casos e também pela parceria desde a época do mestrado. É muito bom poder contar com pessoas como você.

Ao amigo Paulo Jark que sempre apoiou, incentivou e contribuiu na execução deste experimento. Posso dizer que apesar de não ser da equipe da mama, você contribuiu igualmente na realização deste trabalho. Ainda, você também é um grande amigo com quem sei que posso contar em todas as horas.

À amiga e colega de profissão Sabryna Calazans por toda a ajuda dentro e fora do projeto, pelos conselhos e ensinamentos.

Aos “meus irmãos oncológicos”: Rosana, Paulo, Letícia, Lívia, Giovanna, Marília, Josiane, Rafaela, Reinaldo, Giovanni, Sofia, Rafael Huppes pela ajuda na seleção dos casos e no atendimento aos proprietários e seus animais.

Aos amigos que aqui fiz: Thiago Munhoz, Fábio (Ferruge), Michelle, Fernando Rosa, Evandro Zachée, Marcelo (Pará), Mônica (Bombom), Mariana Kihara, Felipe Barros, Kalina, Ana Gering, dentre muitos outros, por fazerem de

Jaboticabal a minha segunda casa e fazer com que vir pra cá sempre fosse motivo de alegria.

Aos demais colegas e funcionários do HV da FCAV/Unesp Jaboticabal.

Aos colegas e funcionários do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ/Unesp Botucatu: Marcela Marcondes, Valéria, Maury e Claudinei pelo apoio e acolhida todas as vezes que fui para Botucatu.

Aos colegas e funcionários do Laboratório Neogene da FMB/Unesp Botucatu: Márcio de Carvalho, Sandra, Lucas, Ana Carolina, Nayara, Renata e Larissa pela paciência e apoio durante a realização das técnicas de biologia molecular.

Aos proprietários e seus animais pela colaboração indispensável à realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	v
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA).....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. OBJETIVOS.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1. Coleta do Material	14
4.2. Grupos Experimentais.....	15
4.3. Imuno-histoquímica.....	16
4.4. Microdissecção a laser.....	17
4.5. Extração do RNA	19
4.6. Pré-amplificação linear do RNA	19
4.7. RT-qPCR.....	21
4.8. Forma de análise dos resultados	22
4.8.1. Expressão proteica.....	22
4.8.2 Expressão gênica.....	24
4.8.3. Análise da sobrevida global das pacientes.....	25
5. RESULTADOS.....	26
5.1. Dados epidemiológicos	26
5.2. Expressão proteica – Análise Univariada.....	27
5.2.1. APC (Adenomatous poliposis coli).....	27
5.2.2. Wnt5a.....	30
5.2.3. β -catenina.....	32
5.2.4. E-caderina.....	33
5.2.5. Citoceratina.....	35
5.2.6. Vimentina.....	37
5.3. Expressão proteica – Análise Multivariada.....	39
5.4. Expressão gênica.....	45
5.4.1. APC (Adenomatous poliposis coli).....	45

5.4.2. <i>WNT5A</i>	47
5.5. Análise da sobrevida global das pacientes.....	49
6. DISCUSSÃO.....	53
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
8. CONCLUSÕES.....	68
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	69
10. REFERÊNCIAS.....	71
APÊNDICE 1.....	83
APÊNDICE 2.....	86

NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CADELAS: EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DA VIA WNT/B-CATENINA, SUA ASSOCIAÇÃO COM A TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA E PROGNÓSTICO

RESUMO - Tumores mamários são muito comuns em cadelas e apresentam comportamento biológico semelhante aos que ocorrem nas mulheres, tornando a cadela um excelente modelo de estudo comparativo. A transição epitélio-mesênquima (EMT) facilita a migração celular, favorecendo a ocorrência de metástases, fator que tem influência direta no prognóstico das pacientes com neoplasia mamária. Assim, este estudo objetivou avaliar, pela técnica de imuno-histoquímica, marcadores de EMT em tumores mamários caninos (E-caderina, β -catenina, Vimentina e Citoceratina), além da expressão gênica e protéica de dos genes *WNT5A* e *APC* pelas técnicas de RT-qPCR e imuno-histoquímica. Para isto foram utilizadas 98 cadelas, sem predileção por raça ou idade, além de glândulas mamárias normais. Quatro grupos foram formados: (G1) 5 amostras de mamas normais sem alterações histopatológicas; (G2) 28 alterações mamárias benignas; (G3) 56 carcinomas mamários sem metástase e (G4) 14 carcinomas mamários com metástase. Ambos os genes (*APC* e *WNT5A*) mostraram maior expressão entre as mamas normais, sem diferença entre neoplasias benignas e malignas (com e sem metástase). O fenótipo de EMT foi identificado pela análise multivariada, pois neoplasias benignas foram fortemente associadas à β -catenina em membrana, escore elevado de citoceratina e negatividade para vimentina nas células epiteliais, enquanto os carcinomas metastáticos foram associados à β -catenina nuclear, baixo escore de E-caderina e positividade para vimentina em suas células epiteliais neoplásicas. Como a presença de β -catenina nuclear é característica da ativação da via de sinalização do Wnt/ β -catenina, é possível concluir que esta via está ativada entre as neoplasias mamárias caninas e que o processo de EMT está ocorrendo visto a transformação das células epiteliais das neoplasias benignas em um fenótipo mesenquimal como o observado nas neoplasias metastáticas. Tal achado fornece dados para melhor compreensão da progressão tumoral e abre novas perspectivas de pesquisa, tanto nas neoplasias mamárias caninas como em outros tipos tumorais, com a possibilidade de identificação de novos fatores prognósticos além de alvos terapêuticos para a medicina veterinária.

Palavras-Chave: cão, metástase, EMT, imuno-histoquímica, RNAm.

MAMMARY TUMORS IN BITCHES: GENE AND PROTEIN EXPRESSION OF WNT/ β -CATENIN PATHWAY, ITS ASSOCIATION WITH EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION AND PROGNOSIS

ABSTRACT - Mammary tumors are very common in bitches and have a very similar biological behavior to the ones that occur in women, turning it an excellent model for comparative studies. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) facilitate migration and the occurrence of metastasis, factor that have direct influence on prognosis. Thus, this study aimed to evaluate, by immunohistochemistry (IHC), EMT markers in canine mammary tumors (e-cadherin, β -catenin, vimentin and cytokeratin). In addition, gene and protein expressions of two genes *WNT5A* and *APC* were evaluated by qRT-PCR and immunohistochemistry. To this, 98 bitches with no breed or age predilection, besides normal mammary glands without neoplastic lesions were used to form four groups: (G1) 5 normal mammary samples; (G2) 28 benign mammary lesions; (G3) 56 non-metastatic mammary carcinomas and (G4) 14 metastatic carcinomas. Both genes, *APC* and *WNT5A* show higher expression between normal mammary samples and no difference among benign and malignant tumors (metastatic and non-metastatic). EMT phenotype was identified by multivariate analysis, because benign tumors were strongly associated with membranous β -catenin, high scores of Cytokeratin and no vimentin expression in epithelial cells and metastatic carcinomas were strongly associated to nuclear β -catenin, low E-cadherin expression and vimentin positivity in neoplastic epithelial cells. As nuclear localization of β -catenin is characteristic of Wnt/ β -catenin signaling pathway aberrant activation, we can conclude that Wnt/ β -catenin signalling pathway is activated among canine mammary tumors and EMT is occurring since benign epithelial cells have been transformed in mesenchymal cells in metastatic tumors. Those findings provide data for a better understanding of cancer progression and open new perspectives about research not only in mammary tumors, but also in other neoplastic types in dogs, facilitating to identify new prognostic factors and new therapeutic targets in veterinary medicine.

Keywords: dog, metastasis, EMT, immunohistochemistry, mRNA

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1: Anticorpos primários utilizados com especificação de clone, diluição, fabricante, espécie de origem e referência..... Pág. 16
- TABELA 2. Sequências *forward* (F) e *reverse* (R) dos primers confeccionados para amplificação dos genes..... Pág. 22
- TABELA 3. Distribuição dos tipos histopatológicos das amostras utilizadas de acordo com o grupo experimental..... Pág. 26
- TABELA 4. Distribuição do padrão das metástases no G4 de acordo com o tipo e graduação histológica..... Pág. 27
- TABELA 5. Número de amostras de mamas caninas em cada grupo e grau histopatológico para os diferentes escores de marcação do APC..... Pág. 29
- TABELA 6. Número de amostras em cada um dos grupos e graus histopatológicos para as diferentes intensidades de marcação da proteína APC..... Pág. 29
- TABELA 7. Número de amostras em cada grupo e grau histopatológico para os diferentes escores de marcação da proteína Wnt5a..... Pág. 31
- TABELA 8. Número de amostras dos graus histopatológicos I, II e III para os diferentes escores e intensidade de marcação da proteína Wnt5a..... Pág. 31
- TABELA 9. Número de amostras de cada grupo e grau histopatológico com marcação em membrana, citoplasma e núcleo para o anticorpo β -catenina..... Pág. 33
- TABELA 10. Número de amostras em cada grupo e grau histopatológico para os diferentes escores de marcação em membrana para a E-caderina... Pág. 34
- TABELA 11. Número de amostras negativas e positivas para marcação citoplasmática de E-caderina nos diferentes grupos experimentais e graus histopatológicos..... Pág. 35
- TABELA 12. Número de amostras em cada grupo e grau histopatológico para os diferentes escores de marcação para o anticorpo Citoceratina..... Pág. 36
- TABELA 13. Número de amostras dos grupos e graus histopatológicos para as diferentes intensidades de marcação para o anticorpo Citoceratina..... Pág. 37
- TABELA 14. Número de amostras em cada grupo e grau histopatológico para os diferentes escores de marcação para o anticorpo Vimentina..... Pág. 39

- TABELA 15. Valores de Qui-quadrado (χ^2) para cada variável dentro de seu respectivo grupo. As células em negrito são valores de Qui-quadrado positivos..... Pág. 40
- TABELA 16. Número de amostras em cada grupo para os diferentes escores de marcação das proteínas Wnt5a e APC..... Pág. 44
- TABELA 17. Número de amostras em cada grupo para os diferentes escores de marcação das proteínas E-caderina e Citoceratina..... Pág. 44
- TABELA 18. Número de amostras em cada grupo para as marcações das proteínas Vimentina e β -catenina..... Pág. 45
- TABELA 19. Ciclo de amplificação (Ct) de cada amostra para os genes alvo (*APC*) e endógeno (*ACTB*), diferença entre o Ct da amostra para o gene alvo e endógeno (Δ Ct), diferença entre o Δ Ct da amostra com o Δ Ct do controle positivo ($\Delta\Delta$ Ct) e nível de expressão gênica (QR) de cada uma das amostras dos grupos experimentais..... Pág. 47
- TABELA 20. Ciclo de amplificação (Ct) de cada amostra para os genes alvo (*WNT5A*) e endógeno (*ACTB*), diferença entre o Ct da amostra para o gene alvo e endógeno (Δ Ct), diferença entre o Δ Ct da amostra com o Δ Ct do controle positivo ($\Delta\Delta$ Ct) e nível de expressão gênica (QR) de cada uma das amostras dos grupos experimentais..... Pág. 49

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Representação esquemática da via de ação do Wnt/ β -catenina. Degradação da β -catenina pelo complexo de destruição na ausência do Wnt (OFF) e a β -catenina agindo como fator transcricional na presença do Wnt e inibição do complexo de destruição (ON). Pág. 8

FIGURA 2. Fotomicrografia de amostra de neoplasia maligna da mama de cadela antes (A) e após (B) a microdissecção de sua porção epitelial.... Pág. 18

FIGURA 3. Imunodeteção da proteína APC em neoplasia mamária canina. (A) Carcinoma mamário em tumor misto grau III não metastático (Grupo 3) com marcação citoplasmática em mais de 75% das células e de fraca intensidade. (B) Carcinoma mamário padrão micropapilar metastático (Grupo 4) com marcação em mais de 75% das células e de intensidade média de marcação citoplasmática. (C) Carcinoma mamário padrão sólido grau III metastático (Grupo 4) com marcação em 50-75% das células de intensidade média. (D) Carcinoma mamário em tumor misto grau II não metastático com forte intensidade de marcação citoplasmática. Imuno-histoquímica, Histofine, DAB, 200x..... Pág. 28

FIGURA 4. Imunodeteção da proteína Wnt5a em neoplasias mamárias caninas. (A) Adenoma mamário (Grupo 2) com marcação citoplasmática em mais de 75% das células e de fraca intensidade. (B) Carcinoma mamário *in situ* não metastático (Grupo 3) com marcação citoplasmática em mais de 75% das células e de moderada intensidade. (C) Carcinoma mamário padrão tubular grau II não metastático (Grupo 3) com marcação em mais de 75% das células e com moderada intensidade. (D) Carcinoma mamário em tumor misto grau I não metastático (Grupo 3) com marcação em mais de 75% das células e de forte intensidade. Imuno-histoquímica, Histofine, DAB, 200x..... Pág. 30

FIGURA 5. Imunodeteção de β -catenina em neoplasias mamárias caninas. (A) Carcinoma mamário padrão papilar grau II não metastático (Grupo 3) apresentando marcação em mais de 75% das células em membrana. (B) Carcinoma mamário padrão papilar grau II não metastático (Grupo 3) com marcação mista entre membrana e citoplasma; (C) Carcinoma mamário em tumor misto grau I não metastático (Grupo 3) com marcação citoplasmática em mais de 75% das células, observar a ausência de divisão entre membrana e citoplasma; (D) Carcinoma mamário padrão sólido grau 2 metastático (Grupo 4) com marcação nuclear em 50-75% das células. Imuno-histoquímica, Histofine, DAB, 200x..... Pág. 32

FIGURA 6. Imunodeteção de E-caderina em neoplasias mamárias caninas. (A) Carcinoma mamário em tumor misto grau I não metastático (Grupo 3). Observar a forte marcação em membrana celular em mais de 75% das células. (B) Carcinoma mamário padrão tubular grau I não metastático (Grupo 3) com baixa marcação em membrana (até 25% das células) e presença de marcação citoplasmática. Notar a ausência de distinção entre membrana e citoplasma. Imuno-histoquímica, Histofine, DAB, 200x..... Pág. 34

FIGURA 7. Imunodeteccção de citoceratina em neoplasias mamárias caninas. (A) Adenoma mamário (Grupo 2) apresentando marcação em mais de 75% das células e de forte intensidade. (B) Carcinoma mamário padrão sólido grau II metastático (Grupo 4) com marcação em até 25% das células e de fraca intensidade. Imuno-histoquímica, Histofine, DAB, 200x..... Pág. 36

FIGURA 8. Imunodeteccção de vimentina em neoplasias mamárias caninas. (A) Carcinoma mamário padrão tubular grau I não metastático (Grupo 3) com marcação positiva nas células mioepiteliais (seta) e negativa nas células epiteliais neoplásicas. (B) Êmbolo tumoral metastático em vaso linfático de mama canina com células epiteliais positivas para vimentina (seta). (C) Carcinoma mamário padrão sólido grau I não metastático (Grupo 3) com célula epitelial positiva no centro da imagem (seta). (D) Carcinoma padrão sólido grau III metastático (Grupo 4) apresentando elevado percentual de marcação nas células epiteliais neoplásicas (seta). Imuno-histoquímica, Histofine, DAB, 200x..... Pág. 38

FIGURA 9. Mapa perceptual demonstrando as associações entre os grupos compostos por neoplasias benignas e outras alterações não malignas da glândula mamária canina (G2), o grupo dos carcinomas não metastáticos (G3) e o grupo dos carcinomas metastáticos (G4) com os escores de marcação de cada anticorpo e o padrão de localização celular da β -catenina..... Pág. 41

FIGURA 10. Mapa perceptual contendo as associações mais fortes (círculos e seta em azul) entre os grupos e as proteínas estudadas de acordo com a Análise de Correspondência Múltipla..... Pág. 43

FIGURA 11. Expressão relativa do gene *APC* entre os grupos. Diferença significativa para a expressão do gene *APC* entre os grupos (A); Expressão significativamente maior entre as amostras de mama normal quando comparadas às neoplasias benignas (B) e às neoplasias malignas (C); Ausência de diferença entre as neoplasias benignas e malignas (D)..... Pág. 46

FIGURA 12. Expressão relativa do gene *WNT5A* entre os grupos. Diferença significativa para a expressão do gene *WNT5A* entre os grupos (A); Expressão significativamente maior entre as amostras de mama normal quando comparadas às neoplasias benignas (B) e às neoplasias malignas (C); Ausência de diferença entre as neoplasias benignas e malignas (D)..... Pág. 48

FIGURA 13. Análise da sobrevida global das pacientes (em dias) com relação ao escore de marcação do *APC*. (A) Ausência de diferença significativa entre os carcinomas não-metastáticos, G3 e (B) e entre os carcinomas metastáticos, G4. Log-rank Test, $p < 0,05$ Pág. 50

FIGURA 14. Análise da sobrevida global das pacientes (em dias) com relação ao escore de marcação do Wnt5a. (A) Ausência de diferença significativa entre os carcinomas não-metastáticos, G3 e (B) e entre os carcinomas metastáticos, G4. Log-rank Test, $p < 0,05$ Pág. 50

FIGURA 15. Análise da sobrevida global das pacientes (em dias) com relação ao escore de marcação da E-caderina. (A) Ausência de diferença significativa entre os carcinomas não-metastáticos, G3 e (B) e entre os carcinomas metastáticos, G4. Log-rank Test, $p < 0,05$ Pág. 51

FIGURA 16. Análise da sobrevida global das pacientes (em dias) com relação ao escore de marcação da Citoceratina. (A) Ausência de diferença significativa entre os carcinomas não-metastáticos, G3 e (B) e entre os carcinomas metastáticos, G4. Log-rank Test, $p < 0,05$ Pág. 51

FIGURA 17. Análise da sobrevida global das pacientes (em dias) com relação a localização da marcação da β -catenina. (A) Ausência de diferença significativa entre os carcinomas não-metastáticos, G3 e (B) e entre os carcinomas metastáticos, G4. Log-rank Test, $p < 0,05$ Pág. 51

FIGURA 18. Análise da sobrevida global das pacientes (em dias) com relação ao escore de marcação da vimentina. (A) Ausência de diferença significativa entre os carcinomas não-metastáticos, G3 e (B) diferença significativa entre os carcinomas metastáticos, G4. Log-rank Test, $p < 0,05$ Pág. 52

FIGURA 19. Análise da sobrevida global das pacientes (em dias). (A) Sobrevida global com relação ao nível de RNAm do APC para QR $< 0,6$ (gene negativamente regulado, QR entre 0,6 e 2 (expressão normal) e QR > 2 (gene positivamente regulado); (B) Sobrevida global com relação ao nível de RNAm do WNT5A. Os valores de QR são os mesmos para o gene APC. Log-rank Test, $p < 0,05$ Pág. 52



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 022691/10 do trabalho de pesquisa intitulado "**Expressão gênica e protéica de marcadores da via Wnt/ β -catenina, sua relação com o fenótipo de EMT (epithelial-mesenchymal transition) e a correlação com o prognóstico das neoplasias mamárias de cadelas**", sob a responsabilidade da Profª Drª Mirela Tinucci Costa 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 25 de Novembro de 2010.

Jaboticabal, 29 de Novembro de 2010.


Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA


Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEUA

1. INTRODUÇÃO

Segundo relatório recente da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS (Organização Mundial da Saúde), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. No Brasil, estima-se que cerca de 57.000 novas mulheres sejam diagnosticadas com câncer de mama em 2014, sendo que, devido ao diagnóstico tardio da doença, a taxa de mortalidade pelo câncer de mama ainda é alta no país (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2008; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA, 2013).

Da mesma forma, na Medicina Veterinária, estima-se que 198 em cada 100.000 cadelas desenvolvam neoplasias mamárias a cada ano, tornando-a também a mais comum entre as fêmeas desta espécie, com incidência de duas a três vezes maior que a observada em mulheres (BRODEY; GOLDSCHIMIDT; ROSZEL et al., 1983; SORENMO, 2003; RODASKI; PIEKARZ, 2008).

Apesar dos enormes progressos, a oncogênese do câncer de mama continua a ser um processo de vários passos ligado a mais de uma alteração molecular (WIDAKOWICH et al., 2007). A transformação de células normais em células malignas requer um acúmulo de mutações autônomas no DNA da célula, resultando em proliferação celular e habilidades para escapar do controle endógeno do ciclo celular, além de possuir resistência à apoptose (ARGYLE; KHANNA, 2007; KLOPFLEISCH & GRUBER, 2009; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Em adição a estes eventos celulares autônomos, são necessários fatores essenciais associados ao microambiente tumoral para que os tumores se tornem clinicamente relevantes (JOYCE, 2005).

A ativação da via canônica de sinalização do Wnt/ β -catenina é necessária para o desenvolvimento e diferenciação de inúmeros tipos celulares, incluindo o epitélio da glândula mamária (INCASSATI et al., 2010). Em contrapartida, a ativação aberrante desta via é observada em várias neoplasias humanas como o câncer de mama, o colorretal além dos carcinomas hepatocelulares e pancreáticos (NODA et al., 2009; KHRAMTSOV et al., 2010; SCHOLER-DAHIREL et al., 2011; WHITE; CHIEN; DAWSON, 2012).

Quando da ativação desta via, o Wnt se liga aos seus receptores de membrana inativando o complexo de degradação da β -catenina, fazendo com

que esta se acumule no citoplasma e se desloque ao núcleo para agir como um fator transcricional, desencadeando a transição epitélio-mesênquima. Esta transição é incriminada em facilitar a progressão tumoral promovendo a disseminação metastática (HOLLIER et al., 2009; KIM et al., 2010; MICALIZZI; FARABAUGH; FORD, 2010).

Durante anos, patologistas veterinários vêm considerando o grau histopatológico para determinação do prognóstico, no entanto, o aumento da disponibilidade de anticorpos para estudos imuno-histoquímicos tem permitido que critérios adicionais sejam avaliados. Como alterações genéticas são responsáveis por muitos tipos tumorais, a expressão de inúmeros oncogenes e supressores tumorais tem sido determinada nos diferentes tipos histológicos de neoplasias mamárias e relacionados com o aumento da malignidade ou prognóstico desfavorável (MORRIS, 2010).

Desde os pioneiros estudos epidemiológicos de Maurice Leblanc, sabemos que cães são uma das espécies mais susceptíveis ao desenvolvimento espontâneo de tumores (ZAIDAN-DAGLI, 2008). Este fato, juntamente com a publicação do genoma do cão (LINDBLAD-TOH et al., 2005) levam a acreditar no valor do uso dos cães como modelo natural de estudo para os cânceres humanos. Soma-se a isto, o aumento da prevalência do câncer entre os animais domésticos, devido, ao menos em partes, à grande longevidade alcançada em razão de um controle mais efetivo das doenças em geral (PANG; ARGYLE, 2009). Ademais, cadelas com neoplasias mamárias são submetidas à procedimentos clínicos, cirúrgicos e diagnósticos que atualmente exercem grande impacto econômico na rotina das clínicas veterinárias brasileiras, justificando a realização de estudos que possam dar novas opções de diagnóstico e tratamento para estas pacientes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As neoplasias mamárias são as mais frequentes nas fêmeas da espécie canina, representando aproximadamente 25 a 50% de todos os tumores diagnosticados, e destes 41 a 53% são de caráter maligno (DALECK et al., 1998; FONSECA; DALECK, 2000; RODASKI; PIEKARZ, 2008), com incidência duas a três vezes maior do que a observada na mulher (BRODEY; GOLDSCHMIDT; ROSZEL, 1983).

A idade média para o aparecimento dos tumores está entre os 7 e os 12 anos de idade, sendo rara a ocorrência em animais menores de quatro anos (LANA et al., 2007; DE NARDI et al., 2008). A etiologia destas neoplasias é multifatorial, podendo sofrer influência hormonal, nutricional e também ambiental (DE NARDI et al. 2008; ANDRADE et al., 2010).

Em geral, os tumores mamários podem ser de tamanhos variados, de milímetros de diâmetro a extremamente desenvolvidos e pode-se encontrar muitas massas em uma ou ambas as cadeias mamárias. Sua localização mais comum corresponde às glândulas abdominais e inguinais, possivelmente por serem as que contêm maior quantidade de parênquima mamário (FOSSUM, 2005; DE NARDI et al., 2008).

Os tumores benignos apresentam-se circunscritos, não aderidos aos tecidos adjacentes e são de evolução lenta. Não possuem potencial de crescimento invasivo e são normalmente encapsulados (ELLIS; ELSTON, 1995; MISDORP, 2002). No entanto, os tumores malignos exibem crescimento invasivo e são, na maioria das vezes, de evolução rápida, associado ao envolvimento dos linfonodos regionais e pulmões. As metástases podem ocorrer tanto pela drenagem linfática como pela via hematogena e seus sítios mais comuns são os linfonodos regionais, seguidos de pulmões, fígado e os ossos (OWEN, 1980; LANA et al., 2007; DE NARDI et al., 2008). Radiografias torácicas, análises bioquímicas e hematológicas rotineiras, escaneamento ósseo e ultrassonografias abdominais são bons instrumentos para a pesquisa de metástases à distância e para o estadiamento clínico (LORHISCH; PICCART, 2006).

O TNM, do inglês: *tumor, node, metastasis* é um sistema de estadiamento útil para auxiliar no estabelecimento do prognóstico e deve ser aplicado antes

do início do tratamento na avaliação do tumor primário, dos linfonodos regionais e a identificação de qualquer sítio de metástases à distância. O mais importante a ser notado no tumor primário é seu tamanho, evidência clínica de invasividade, a suspeita de carcinoma inflamatório, ulceração e crescimento rápido (LANA et al., 2007).

A remoção cirúrgica permanece como a forma mais utilizada e mais aceita para o tratamento das neoplasias mamárias. A recomendação é que sempre seja realizada a mastectomia total unilateral ou a mastectomia radical (ambas as cadeias mamárias), para a excisão de nódulos múltiplos e maiores que meio centímetro de diâmetro. No entanto, em um estudo recente que avaliou as diferentes técnicas cirúrgicas empregadas no tratamento das neoplasias mamárias caninas, não houve diferença para a sobrevida global, intervalo livre de doença e o desenvolvimento de novas lesões nas pacientes submetidas à lumpectomia, nodulectomia e mastectomia regional ou total. Embora seja importante frisar que a escolha da técnica cirúrgica baseou-se nos princípios de cirurgia oncológica e na observação de fatores prognósticos conhecidos como tamanho do tumor e presença de ulceração e aderência (NOVOSAD, 2003; STRATMANN et al., 2008; CASSALI et al., 2011; HORTA et al., 2014).

Com relação ao tratamento a ser empregado no pós-operatório, a literatura cita a quimioterapia, a hormonioterapia e a radioterapia, sendo a primeira a mais comumente utilizada na rotina veterinária. O objetivo destes tratamentos é prevenir o aparecimento de recidivas e/ou metástases (NOVOSAD, 2003).

Os tumores mamários das cadelas são normalmente de origem epitelial e sua nomenclatura internacional é conflitante, pois existem várias propostas de classificação. Estas se baseiam principalmente no padrão morfológico, devido à escassez de informações baseadas em outros parâmetros (DESTEXHE et al., 1993). Devido à alta incidência de neoplasias mamárias em cães no Brasil e com o intuito de aperfeiçoar o diagnóstico e o tratamento destes tumores, pesquisadores brasileiros elaboraram um documento estabelecendo diretrizes para a abordagem das pacientes, desde o momento do exame clínico inicial, estadiamento, diagnóstico e tratamento. Juntamente com este documento foi

proposta uma nova classificação histopatológica que associa histogênese, descrição morfológica e fatores prognósticos (CASSALI et al., 2011).

No entanto, apesar dos avanços na classificação e graduação histopatológica dos tumores mamários, a busca para a elucidação dos mecanismos envolvidos no processo de desenvolvimento de tumores mamários na cadela, bem como a identificação de fatores prognósticos adicionais que possam prever como a doença poderá evoluir em cada paciente continuam (GAMA et al., 2008; ZAIDAN-DAGLI, 2008).

Os tumores mamários malignos possuem o potencial de fazer metástase. O risco e o padrão das metástases são influenciados pelo tipo tumoral, pela diferenciação histológica e outros fatores prognósticos. Em geral, tumores epiteliais malignos fazem metástase por via linfática e os sítios mais comuns de metástases são, à princípio os linfonodos regionais, seguidos de pulmões, fígado e raramente os ossos. Normalmente, em 25% dos casos, os animais apresentam metástases no momento do diagnóstico, nos linfonodos regionais, e em alguns casos nos pulmões, que por serem muito pequenas, podem não ser identificadas pelo exame radiográfico (OWEN, 1980; LANA et al., 2007; DE NARDI et al., 2008).

Cadelas com neoplasias mamárias malignas possuem sobrevida significativamente curta quando comparadas àquelas com neoplasias benignas. A sobrevida global em dois anos está entre 25% e 40%. No entanto, esta sobrevida pode ser influenciada por vários fatores e pode variar significativamente dependendo do tipo histológico e do grau de diferenciação, do estágio da doença e do tratamento empregado. Cadelas com neoplasias pequenas e bem diferenciadas possuem um prognóstico excelente após ressecção cirúrgica, já as cadelas com neoplasias mais avançadas possuem um prognóstico reservado e podem necessitar de terapia adjuvante (SORENMO, 2003).

A invasão e a metástase são características biológicas dos tumores malignos e, nos casos dos tumores de mama, influenciam diretamente no tratamento e no prognóstico. Para que as células tumorais se desprendam de uma massa primária, penetrem nos vasos sanguíneos ou linfáticos e produzam um segundo crescimento tumoral em um local à distância, elas devem superar uma série de etapas e podem estar sujeitas a diversas influências favoráveis

ou não ao seu desenvolvimento (KHANNA; HUNTER, 2005; ZAIDAN-DAGLI, 2008; HOLLIER et al., 2009). A progressão de uma fase primária para uma fase metastática representa um ponto-chave no prognóstico dos pacientes com câncer (CLOHESSY; PANDOLFI, 2009).

Neste contexto, a EMT (*epithelial-mesenchymal transition*), um fenômeno fisiológico que coordena a transição de células epiteliais em células mesenquimais surge como um passo importante na formação de metástases. Esta transição ocorre em diversas fases da embriogênese e também durante várias condições patológicas, como a fibrose tecidual, a cicatrização e o câncer (HOLLIER et al., 2009).

Durante o desenvolvimento embrionário, no processo de cicatrização e também no câncer, as células epiteliais podem atingir graus variados de plasticidade. Estas mudanças permitem uma resposta migratória dinâmica da célula dependendo de sua constituição, de sua expressão gênica e de seu microambiente. Desta forma, a literatura recente tem classificado esta transição em três diferentes subtipos, que são: (1) a que ocorre na fase embrionária ou durante o desenvolvimento de alguns órgãos; (2) presente na fibrose e/ou reparação tecidual e (3) a ligada ao câncer (KALLURI, 2009).

A EMT começa com a perda da polaridade ápico-basal, permitindo a mistura dos componentes apicais e baso-laterais da membrana. Junções célula-célula, incluindo as junções aderentes e as junções *gap*, começam a se separar e a membrana basal subjacente é degradada. Proteínas de superfície celular como E-caderina e integrinas, que mediam as conexões epiteliais com as células vizinhas e a membrana basal, são substituídas por N-caderina e integrinas de adesão transitória, respectivamente, imprimindo à célula um fenótipo mesenquimal. Adicionalmente, elementos do citoesqueleto são reorganizados e a actina periférica é substituída por fibras de tensão, ao passo que filamentos intermediários de citoqueratina são substituídos por vimentina (HAY, 1995; MICALIZZI; FARABAUGH; FORD, 2010).

Juntas, estas mudanças transformam as células de um formato cuboidal para fusiforme e finalmente, as células adquirem as habilidades de invadirem e moverem-se na matriz extra celular desprovidas de qualquer contato célula-célula (HOLLIER et al., 2009, TAYLOR; PAVANI; SCHIEMANN, 2010).

A E-caderina é uma glicoproteína transmembrana, expressa primariamente em células epiteliais e promove a adesão celular por se ligar com as E-caderinas expressas pelas células adjacentes. Sua região extracelular possui função de adesão cálcio-dependente e em sua porção justamembrana ela se liga à p120-catenina, proteína capaz de modular o agrupamento das E-caderinas. O segmento distal de seu domínio citoplasmático interage com a β -catenina que se liga a α -catenina, que por sua vez se liga diretamente à F-actina, acoplando a E-caderina ao citoesqueleto de actina. Desta forma, as caderinas são capazes de formar complexos adesivos intercelulares que são essenciais para a manutenção da integridade tecidual (ONDER et al., 2008; BARANWAL; ALAHARI, 2009; HULPIAU; ROY, 2009).

Nos anos recentes tem ficado claro que a E-caderina e suas cateninas associadas, em particular a β -catenina, não são apenas componentes estáticos das junções aderentes, mas também participam de cascatas de sinalização, como por exemplo na via Wnt. Esta via é conhecida por exercer papel crítico no desenvolvimento embrionário, na manutenção da população de células progenitoras e na proliferação de muitos tipos teciduais, além de estar envolvida na carcinogênese e na EMT (SCHMALHOFER et al., 2009; LACROIX-TRIKI et al., 2010).

Muitas vias de sinalização podem induzir o processo da EMT, já que este requer a coordenação de uma complexa rede de sinalizações extra e intracelulares envolvendo fatores de iniciação e mecanismos de feedback. Dentre elas a via do Wnt/ β -catenina e do TGF β , além dos genes Snail, ZEB e Twist outros fatores transcricionais são incriminados em sua indução (TOMASKOVIC-CROOK et al., 2009; WRIGHT; RICHER; GOODALL, 2010; GHELDOLF; BERX, 2013).

Uma vez que o Wnt se ligue aos seus co-receptores de membrana, Fz/LRP, é ativada a sua via canônica na qual a β -catenina exerce papel central. Esta ligação inativa o complexo de degradação da β -catenina, que se acumula no citoplasma e vai ao núcleo onde age como um fator transcricional em um complexo com as proteínas da família Tcf/Lef. Esta interação leva à expressão de alguns genes, dentre eles, oncogenes como o c-Myc e a Ciclina D1. Na ausência do Wnt, um complexo de destruição contendo APC, Axin e GSK3 β fosforila a β -catenina marcando-a como um substrato para

ubiquitinação pela β -TrCP e subsequente degradação proteossomal, impedindo seu deslocamento ao núcleo, ver Figura 1 (CLEVERS, 2006; SCHMALHOFER et al., 2009; KIM et al., 2010).

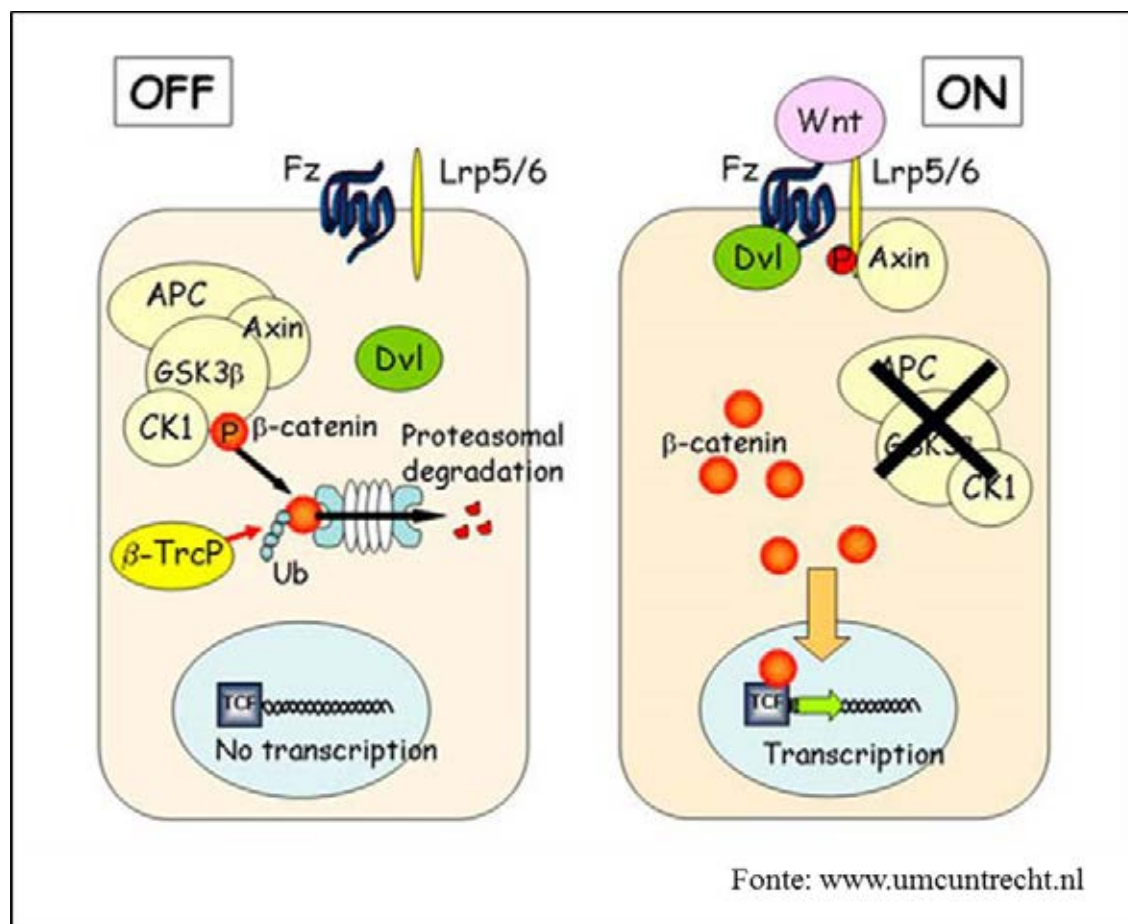


Figura 1. Ilustração da via canônica do Wnt. Degradação da β -catenina pelo complexo de destruição na ausência do Wnt (OFF) e a β -catenina agindo como fator transcrional na presença do Wnt e inibição do complexo de destruição (ON).

O gene *WNT5A* codifica um dos 19 membros da família de ligantes do Wnt, que através da ligação com receptores de tirosina-quinase modulam a via canônica do Wnt/ β -catenina, bem como, diversas outras vias não-canônicas ou β -catenina independentes. Dentre os componentes da via de sinalização do Wnt implicados na oncogênese, o Wnt5a é particularmente interessante pois pode agir como uma oncoproteína ou como supressor tumoral dependendo do tecido em questão (BAUER et al., 2013). A perda ou diminuição da expressão do *WNT5A* é associada com a recidiva precoce e o aparecimento de metástases no carcinoma de mama da mulher (SERRA et al., 2011). No

entanto em melanomas e carcinomas gástricos e pancreáticos de humanos, o WNT5A é normalmente superexpresso e exerce uma função pró-oncogênica promovendo a proliferação e a metástase (WEERARATNA et al., 2002; KURAYOSHI et al., 2006; RIPKA et al., 2007; DA FORNO et al., 2008).

Diversos estudos mostraram uma variedade de cânceres que carregam mutações em pelo menos um componente da via canônica do Wnt/ β -catenina, que levam a sua ativação aberrante. Dentre estas neoplasias, as colorretais e as mamárias ocupam posição de destaque. Desta forma, a perda da E-caderina ou a simples estimulação do Wnt não são necessariamente ligadas ao acúmulo citoplasmático da β -catenina e à ativação transcricional de genes alvo, já que componentes do complexo de destruição também precisam estar comprometidos para permitir seu deslocamento ao núcleo (AOKI; TAKETO, 2007; SCHMALHOFER et al., 2009; LÓPEZ-KNOWLES et al., 2010).

O gene supressor tumoral *APC* (*Adenomatous polyposis coli*) foi inicialmente identificado por apresentar mutação e causar a adenomatose poliposa familiar (APF), uma síndrome hereditária do câncer colorretal que predispõe os portadores ao aparecimento de milhares de pólipos colorretais além do aparecimento precoce e agressivo do câncer de cólon (GRODEN et al., 1991; KINZLER et al., 1991).

Adicionalmente o gene *APC* codifica uma proteína multi-domínio que contém sítios de ligação para diversas proteínas, dentre elas a Axin e a β -catenina. A proteína APC é um componente essencial do complexo de destruição da β -catenina, funcionando como regulador negativo da sinalização intracelular do Wnt (HOWE; BROWN, 2004; YING; TAO, 2009).

Em aproximadamente 85% das neoplasias humanas de cólon e reto são encontradas mutações no gene *APC* que levam à perda de função vistas em estágios precoces da carcinogênese e estão ligadas aos eventos iniciadores da formação do adenoma poliposo. A maioria destas mutações ocorrem em uma região denominada MCR (*Mutation Cluster Region*) e resultam em formação incompleta do terminal C da proteína, causando a perda dos domínios necessários para ligação com a Axin e a β -catenina e conseqüentemente inativando o complexo de destruição (AOKI; TAKETO, 2007). Recentemente foi descoberto por um grupo de pesquisadores que este gene foi o mais

frequentemente mutado no cão, tanto em adenomas quanto em carcinomas colorretais dentre 11 genes avaliados (YOUMANS et al., 2012).

Estudos com linhagens celulares específicas têm relacionado mutações no APC com a carcinogênese mamária. Também em camundongos mutações neste gene levaram a um aumento da susceptibilidade destes ao aparecimento de adenocarcinomas mamários multifocais com subsequente aparecimento de metástases pulmonares (GASPAR et al., 2009; KURAGUCHI et al., 2009).

Com relação à expressão protéica do APC e de outros marcadores da via Wnt/ β -catenina, autores observaram por imunofluorescência que a expressão do APC no citoplasma e de E-caderina e β -catenina na membrana da célula epitelial neoplásica da mama de cadelas foi maior nos tumores benignos e naqueles de grau I quando comparados àqueles de grau III. No entanto estes mesmos autores não observaram diferença para a expressão destas proteínas entre os graus de malignidade, pela técnica do *Western Blot* (RESTUCCI et al., 2007).

A perda ou redução da expressão gênica ou protéica de E-caderina é frequentemente observada durante a progressão tumoral em muitas neoplasias epiteliais, inclusive as mamárias, e é associada com a disseminação metastática, já que promove a desagregação das células neoplásicas. Estudos anteriores em neoplasias mamárias caninas já demonstraram que a perda em sua expressão protéica na membrana celular é observada em tumores de graus mais agressivos (BRUNETTI et al., 2003; SARLI et al., 2004; MATOS et al., 2006). Nas neoplasias humanas e caninas, a perda ou redução da expressão desta proteína pode ocorrer durante ou após a sua transcrição e ser causada por mutações somáticas, deleções cromossômicas, por clivagem proteolítica ou ainda pelo silenciamento de seu gene promotor, o CDH1 (ONDER et al., 2008; YILMAZ; CHRISTOFORI, 2009). Este silenciamento pode ser mediado por uma lista de fatores transcricionais, dentre eles, Snail1, Snail2 (Slug), ZEB1 (δ EF1), ZEB2 (Sip1) e Twist, cuja expressão pode ser induzida por uma variedade de estímulos, incluindo a ativação do TGF β , EGF, Wnt, dentre outros (PEINADO; OLMEDA; CANO, 2007; YILMAZ; CHRISTOFORI, 2009).

A β -catenina desempenha função importante no desenvolvimento da glândula mamária e sua tumorigênese através da sua participação na adesão

celular, transdução de sinais e regulação da expressão gênica. Uma das consequências da ativação da via canônica do Wnt/ β -catenina é a inativação do complexo de degradação da β -catenina, fazendo com que esta se acumule no citoplasma e se desloque ao núcleo, onde age como fator transcricional (KIM et al., 2010).

Embora as consequências sobre a deleção da β -catenina não tenham sido totalmente investigadas, a perda da ligação desta proteína à E-caderina da membrana celular e sua subsequente positividade no citoplasma e/ou no núcleo celular é correlacionada significativamente com prognóstico desfavorável no câncer de mama da mulher (DOLLED-FILHART et al., 2006; INCASSATI et al., 2010) e também da cadela (RESTUCCI et al., 2007; GAMA et al., 2008). Da mesma forma, alguns estudos já observaram o padrão de marcação citoplasmático para a E-caderina em neoplasias mamárias caninas (BRUNETTI et al., 2003; RESTUCCI et al., 2007).

Além da desorganização do complexo E-caderina – β -catenina, a expressão de vimentina é um mecanismo frequentemente associado à EMT e a transformação de células epiteliais normais em células metastáticas. A vimentina é um filamento intermediário do tipo III normalmente expresso em células de origem mesenquimal (GILLES et al., 2003). Entretanto, numerosos estudos demonstraram que ela também pode ser expressa em células epiteliais envolvidas em processos fisiológicos ou patológicos que requerem a migração de células epiteliais (GILLES et al., 1999; MARKIEWICZ et al., 2012; WENG et al., 2014).

Em estudo recente pesquisadores demonstraram que as expressões de vimentina e E-caderina podem ser dinâmicas e heterogêneas em todo o tumor. Avaliando tumores primários e linfonodos metastáticos de carcinomas mamários humanos, eles observaram que a expressão de E-caderina não foi alterada entre os tumores primários e as metástases e que a expressão de vimentina foi mais baixa na metástase quando comparada ao tumor primário, suportando a noção de que a expressão de vimentina nestes tumores é transitória e dependente de estímulo do microambiente (MARKIEWICZ et al., 2012).

Apesar da via canônica de sinalização do Wnt ser a mais comumente descrita na promoção da estabilização da β -catenina, outras vias de sinalização

podem ser aberrantes no câncer de mama da mulher podendo levar à sua estabilização e conseqüente atividade transcricional (INCASSATI et al., 2010).

Durante a progressão tumoral, as células epiteliais se separam do tumor primário, aderem e invadem o estroma ao redor, atingem os vasos sanguíneos e/ou linfáticos e disseminam-se para tecidos e órgãos distantes, onde irão dar origem a tumores secundários. Como a invasão local é o primeiro passo para a disseminação metastática, a EMT é incriminada em contribuir para a progressão tumoral. A implicação desta observação é que as células do câncer podem prontamente reativar propriedades do desenvolvimento fora de contexto no adulto, o que contribuiria para a tumorigênese via indução de proliferação acelerada, resistência à apoptose e evasão da senescência. Esta idéia se expande para além da formação tumoral, já que poderia facilitar sua invasão, a propagação das células e a metástase (TOMASKOVIC-CROOK et al., 2009; MICALIZZI; FARABAUGH; FORD, 2010).

No câncer de mama, similarmente aos outros tipos de câncer, a EMT raramente é homogênea em todo o tumor. Baseado na expressão de marcadores específicos, pesquisas recentes sugerem que ela ocorra de uma maneira mais focal na região invasiva do tumor e, que, neste caso, as células são estimuladas a realizar a transição por alterações genéticas e epigenéticas (HOLLIER et al., 2009; MICALIZZI; FARABAUGH, FORD, 2010).

3. OBJETIVOS

Diante do exposto e visto a alta incidência das neoplasias de mama em cadelas, bem como de seu valor como modelo experimental para o estudo das neoplasias mamárias humanas, este estudo teve como objetivos;

✓ Objetivo Geral

- Avaliar se a via do Wnt/ β -catenina pode estar envolvida com a progressão dos carcinomas mamários de cadelas e se há relação desta via com o prognóstico nestas neoplasias.

✓ Objetivos específicos

- Observar se a localização celular da β -catenina (membrana, citoplasma e núcleo) tem relação com o comportamento biológico e com o prognóstico dos carcinomas mamários de cadelas.
- Avaliar se as imunomarcações de E-caderina, Citoceratina e Vimentina nas células epiteliais tumorais são compatíveis com o fenótipo de EMT.
- Identificar e comparar, pelos métodos da imuno-histoquímica e do RT-qPCR, os níveis de RNAm e proteína do Wnt e do APC nos carcinomas mamários de cadelas, compará-las e relacioná-las ao processo de EMT e ao prognóstico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. 1. Coleta do Material

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (n. 022691/10 – CEUA) e a seleção dos casos foi condicionada ao consentimento livre e esclarecido dos proprietários.

As amostras utilizadas foram extraídas de 98 cadelas portadoras de tumores mamários, sem predileção por raça e idade, provenientes da casuística do Serviço de Oncologia Veterinária (SOV) do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (FCAV), Unesp, campus de Jaboticabal, SP.

As cadelas passaram por atendimento no Serviço de Oncologia Veterinária (SOV) da FCAV, onde foram feitos exames físicos e laboratoriais iniciais, bem como radiografias torácicas em 3 projeções e ultrassonografia abdominal para estadiamento clínico da paciente, além de agendamento do procedimento cirúrgico.

As mastectomias foram realizadas no Serviço de Reprodução e Obstetrícia Veterinária do mesmo hospital. Após a excisão cirúrgica da cadeia mamária e linfonodo adjacente, a peça era inspecionada e todos os nódulos encontrados, bem como os linfonodos, eram avaliados, mensurados e separados para as análises posteriores.

Fragments do material coletado foram conservados, parte em solução de formalina a 10% tamponada com fosfatos (pH 7,4) e outra parte em criotubos estéreis livres de DNase e RNase. Os fragmentos destinados ao congelamento foram imediatamente imersos em nitrogênio líquido, sem o uso de criopreservadores, e posteriormente armazenados em freezer -80°C. Todo o procedimento foi conduzido com material estéril para preservação da qualidade do RNAm.

Com relação aos fragmentos armazenados em formalina, para a preservação do material e otimização das reações de imuno-histoquímica, as amostras permaneceram em solução de formalina a 10% por um período máximo de 24 a 48 horas, sendo depois transferidas para frascos contendo álcool 70%. Após a fixação, os cortes foram destinados ao diagnóstico

histopatológico e às reações de imuno-histoquímica, utilizando-se cortes seriados de 4µm de espessura.

Como controle das reações de imuno-histoquímica e também da RT-qPCR foram utilizados fragmentos de mamas sem alterações histopatológicas de cinco cadelas sem histórico de neoplasia mamária que foram eutanasiadas no Centro de Controle de Zoonoses da cidade de Araçatuba, SP, devido ao diagnóstico de leishmaniose visceral. Estes fragmentos foram coletados da mesma forma que o acima descrito para os tecidos neoplásicos.

Na análise em microscopia de luz pela coloração com Hematoxilina e Eosina (H.E.), foi feita a classificação da neoplasia, segundo os critérios de Cassali et al., (2011), observando-se também a presença de êmbolos em vasos sanguíneos e linfáticos, a invasão do tecido adjacente e também a presença de metástases em linfonodos inguinais e/ou axilares.

4. 2. Grupos Experimentais

Como a maioria das cadelas incluídas no estudo apresentavam nódulos múltiplos, para a inclusão no estudo foi selecionado o tumor de pior prognóstico de cada paciente, considerando-se para isto: tamanho, presença de ulceração, diagnóstico histopatológico e o grau de malignidade de cada um dos nódulos.

As cadelas empregadas no estudo foram alocadas em quatro grupos, de acordo com a histogênese dos tecidos mamários extraídos sendo: mamas normais ou sem alterações histopatológicas, neoplasias benignas ou outras alterações não malignas da glândula mamária, neoplasias malignas sem metástase, ou neoplasias malignas com metástase, seguindo o proposto por Cassali et al. (2011). Apenas as lesões primárias foram avaliadas neste estudo.

G1: 5 mamas sem alterações histopatológicas de cadelas sem histórico de neoplasia.

G2: 28 neoplasias mamárias benignas e outras alterações não malignas da glândula mamária, incluindo ectasias e hiperplasias da mama.

G3: 56 carcinomas mamários sem metástase;

G4: 14 carcinomas mamários com metástase para linfonodos regionais e/ou órgãos distantes, como pulmão, baço e sistema nervoso central.

4. 3. Imuno-histoquímica

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas no Laboratório de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – Unesp, campus de Botucatu, utilizando-se anticorpos específicos para cada reação (Tabela 1).

Tabela 1. Anticorpos primários utilizados nas reações com especificação de clone, diluição, fabricante, espécie de origem e referência.

Anticorpo	Clone	Diluição	Fabricante	Origem	Referência
β-catenina	*	1:100	Spring	Coelho	E2264
Citoceratina	AE1/AE3	1:250	Invitrogen	Camundongo	180132
Wnt5a	*	1:50	Abcam	Coelho	ab72583
E-caderina	NCH-38	1:100	Dako	Camundongo	M3612
Vimentina	Vim 3B4	1:200	Dako	Camundongo	M7020
APC	*	1:100	Abcam	Coelho	ab15270

*anticorpos policlonais

Após desparafinização e hidratação em uma sequência de xilóis e álcoois, seguiu-se a recuperação antigênica com solução tampão de citrato 10mM pré-aquecido, pH 6,0 em panela de pressão (Pascal Dako), de acordo com a programação de tempo e temperatura pré-estabelecida pelo fabricante para todos os anticorpos.

Após a recuperação antigênica, as reações foram continuadas com o uso do *Autostainer (Universal Stainer System – Dako)* seguindo a programação recomendada pelo fabricante, que consiste em bloqueio da peroxidase endógena, lavagem com solução tampão, incubação com anticorpo primário, lavagem, incubação com anticorpo secundário, nova lavagem com solução tampão, incubação com cromógeno Diaminobenzidina (DAB) por cinco minutos e lavagem com solução tampão e água deionizada.

O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com solução de bloqueio pronta para uso (Spring Biosciences – Ref. DHP 125). Não foram utilizados bloqueios de proteína e todas as lâminas foram incubadas por 45 minutos com os anticorpos primários, com exceção da β-catenina que teve 60 minutos de incubação. O anticorpo secundário utilizado em todas as reações foi o Histofine

- *Simple Stain MAX PO (Multi) - Universal Immuno-peroxidase Polymer anti-mouse and anti-rabbit* (Nichirei Biosciences – Ref. 414154F).

Para revelação da reação o cromógeno utilizado foi o DAB (*Dako K3468*) em incubação por cinco minutos e lavagem com solução tampão (Tampão Salina Tris acrescida de Tween - TBS Tween – Ref. TBT999 Biogen) seguida por água deionizada.

Todas as lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris por dois minutos, lavadas em água corrente por 10 minutos, desidratadas e montadas com Permount.

Como controle positivo para a reação da β -catenina e da citoceratina foi utilizada amostra de carcinoma de células escamosas de cão; para E-caderina foi utilizada amostra de mama normal; para o Wnt5a foi utilizada amostra de neoplasia mamária canina conhecidamente positiva; o cólon sem alterações histopatológicas do cão foi utilizado como controle positivo das reações do APC e o próprio tecido mesenquimal da mama foi utilizado como controle interno para a Vimentina. Em todas as baterias de imuno-histoquímica, uma lâmina foi processada como controle negativo, na qual suprimiu-se o anticorpo primário substituindo-o por controle negativo universal de camundongo (*Dako N1698*) para os anticorpos monoclonais e controle negativo universal de coelho (*Dako N1699*) para os anticorpos policlonais.

A avaliação das amostras foi feita pelo mesmo observador em microscopia de luz em aumento de 400X (obj. 40x) com o qual foram localizados os focos de cada lesão e atribuídas escalas de marcação que variaram para cada um dos anticorpos utilizados.

4.4. Microdissecção a Laser

Cortes com 4 μ m de espessura, feitos em criostato a -20°C, corados com Hematoxilina e Eosina (H.E.) e representativos da neoplasia diagnosticada nos cortes em parafina foram selecionados para serem submetidos a microdissecção a laser e posterior análise da expressão gênica. Este passo foi realizado para análise do corte quanto à presença ou ausência de células neoplásicas, bem como para avaliar se este fragmento continha neoplasia correspondente ao diagnóstico inicial da paciente.

Todos os casos selecionados foram novamente cortados em criostato - 20°C na espessura de 5µm e dispostos em lâminas específicas para a técnica de microdissecção a laser (Leica - LMD6500 *RNAse free*). Imediatamente após a realização do corte cada lâmina foi armazenada em freezer -80°C até o momento da realização da microdissecção. Em média foram colocados quatro cortes histológicos por lâmina.

Antecedendo a microdissecção, as lâminas foram processadas individualmente da seguinte forma: descongelamento em temperatura ambiente por 60 segundos, coloração com H.E. (metodologia apropriada, com uso de água DEPC e com menor tempo de preparo) e imediatamente levadas ao microscópio para a realização da microdissecção (Leica *LMD6500*). Para aumentar a preservação do RNA, foram colocados 20 µL de solução tampão (solução contida no kit de extração de RNA – QIAGEN, REF. 74004 - acrescida de β-mercaptoetanol) nos tubos que receberam os cortes. Ao finalizar a microdissecção, os tubos foram agitados para homogeneizar a solução e os cortes e imediatamente levados ao freezer -80°C.

As porções epitelial e mesenquimal da neoplasia, bem como a parte epitelial e estromal da mama normal foram microdissecadas em tubos separados e devidamente identificados (figura 2). Todas as lâminas foram microdissecadas em um período máximo de 30 minutos.

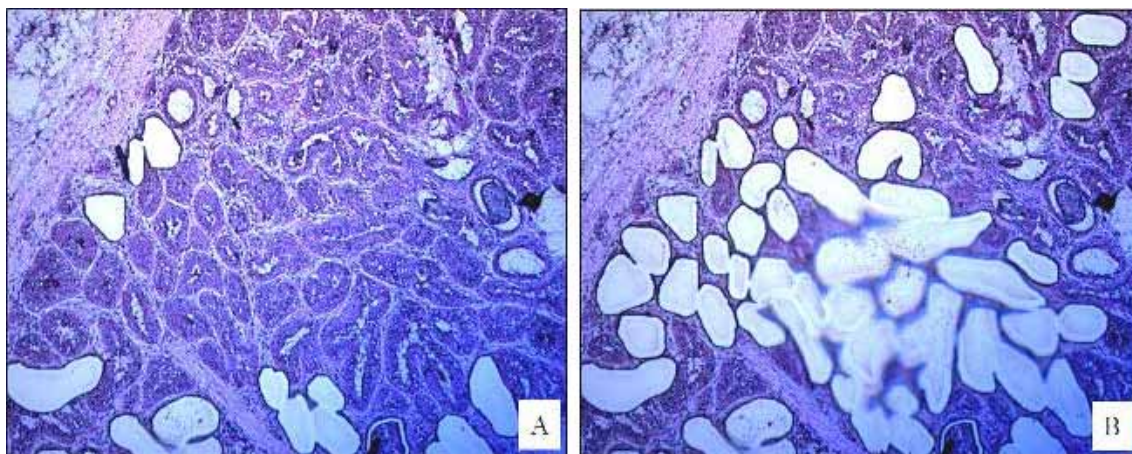


Figura 2. Fotomicrografia de amostra de neoplasia mamária maligna de cadela antes (A) e após (B) a microdissecção a laser de sua porção epitelial (Equipamento: Leica – LMD 6500). Coloração: H.E. Obj. 20x.

4.5. Extração do RNA

Para a extração do RNA foi utilizado o RNeasy Micro Kit (Qiagen – REF. 74004), apropriado para a extração de até 45 µg de RNA total, com a metodologia de acordo com as instruções do fabricante. Ao final da extração o RNA encontrava-se diluído em uma solução final de 14µL.

Em seguida 1 µL de cada uma das amostras foi analisado no NanoDrop (NanoDrop 8000 - Thermo Scientific), para a quantificação do RNA (ng/µL) e também o mesmo volume de cada amostra foi analisado no BioAnalyzer (Agilent Technologies) para avaliação da integridade do RNA.

As etapas referentes às técnicas de biologia molecular foram realizadas no Laboratório NeoGene, FMB/UNESP, campus de Botucatu, sob a orientação da Profa. Dra. Sílvia Regina Rogatto.

4.6. Pré-amplificação linear do RNA

Em geral, as técnicas utilizadas nos estudos de expressão gênica demandam grandes quantidades de material genético para iniciar as reações. A técnica de microdissecção a laser possui a desvantagem de gerar pequenas quantidades deste material genético, uma vez que são algumas células selecionadas para a extração de RNA total quando comparada às técnicas tradicionais.

Desta forma, optou-se pela pré-amplificação do RNA para obter a quantidade mínima necessária para dar início à RT-qPCR. Esta técnica é denominada de Técnica de Eberwine e baseia-se na adição de uma sequência promotora de T7 durante a síntese de cDNA, para realizar a transcrição *in vitro* do RNA (PHILIPS; EBERWINE, 1996). Isto é realizado com o uso de um primer oligo(dT), que contém esta sequência promotora. O segundo passo é a produção de uma fita dupla de DNA a partir do cDNA recém-sintetizado. Finalmente, a sequência promotora é usada para realizar a transcrição *in vitro* de todo o *pool* de DNA de fita dupla correspondente ao *pool* de RNA total que iniciou a reação, amplificando linearmente o material genético e mantendo a quantidade necessária de mensageiros.

O protocolo utilizado no presente estudo consiste em quatro dias consecutivos de reações, composto por duas etapas (48 horas cada) de

amplificação do RNA (Apêndice 2). Na primeira etapa foi realizada a síntese da primeira fita de cDNA, a partir da mistura do *pool* de RNA obtido pela extração descrita com a Oligo(dT)-T7 *primer* (IDT – Integrated DNA Technologies) e incubação a 70°C por 10 minutos em termociclador. Em seguida, foi adicionado um *mix* contendo a enzima SuperScript II (Life Technologies), DTT, dNTP, RNase IN e uma solução tampão para a confecção da primeira fita de cDNA. Esta reação foi incubada a 42°C por 2 horas.

Para a síntese da segunda fita de cDNA foi adicionado ao tubo da reação anterior *E.coli* DNA ligase, RNase H e DNA polimerase I (Life Technologies), além de água DEPC, dNTP e tampão para a confecção da segunda fita de DNA. Esta reação foi incubada a 16°C por 5 minutos e, após foi adicionada a T4 DNA polimerase I (Life Technologies) e novamente a reação foi incubada a 16°C por 5 minutos. Para a inativação desta enzima foram adicionados água DEPC e EDTA 0,5 M pH 8,0 em temperatura ambiente.

O próximo passo foi a purificação do material genético com fenol clorofórmio e álcool isoamílico e a precipitação do mesmo com NH₄AC, NaAC, acrilamida e álcool 100% a 4°C. Após procedeu-se a incubação do material a -20°C por 3 horas. O material retirado do freezer foi centrifugado a 14000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante retirado e descartado. O *pellet* foi então lavado quatro vezes com álcool 70% a 4°C e centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos. Em seguida este mesmo *pellet* foi seco a 37°C em vácuo, eluído em água DEPC pré-aquecida a 55°C e levado ao banho-maria nesta mesma temperatura por 5 minutos. O tubo *ependorf* contendo o material genético foi armazenado a -80°C *overnight*.

No segundo dia da primeira etapa de amplificação foi realizada a transcrição *in vitro* do DNA. Para tal foram adicionados rNTP, um *mix* de enzimas e o tampão necessário com posterior incubação a 37°C por 5 horas. Em seguida foi realizada a purificação do RNA com Trizol e Clorofórmio e sua precipitação com NaAC, glicogênio e Isopropanol. Após centrifugação a 14000 rpm por 30 minutos o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado quatro vezes com álcool 70% a 4°C com nova centrifugação na mesma velocidade por 5 minutos. Este *pellet* foi seco a vácuo na temperatura de 37°C, eluído em água DEPC a 55°C e levado em banho-maria nesta mesma temperatura por 5

minutos. A seguir o material foi armazenado em freezer -80°C até o dia seguinte.

A segunda etapa de pré-amplificação do RNA foi bastante semelhante à primeira com ligeiras modificações e consistiu na confecção de cDNA a partir do RNA obtido na primeira etapa, seguida de síntese de DNA de fita dupla, purificação, transcrição *in vitro*, nova purificação e precipitação.

Ao final, todo o RNA obtido com a pré-amplificação foi quantificado no NanoDrop e armazenado em freezer -80°C até a realização da RT-qPCR.

4.7. RT-qPCR

Devido às diversas limitações impostas pelas técnicas de microdissecção a laser e pré-amplificação linear do RNA no que diz respeito à quantidade de material genético obtido, o número amostral dos grupos para as reações de RT-qPCR foi inferior ao utilizado para a avaliação das expressões protéicas. Das 98 amostras inicialmente selecionadas, 25 puderam ser utilizadas para avaliação da expressão gênica e foram assim distribuídas:

G1: 5/5 mamas normais

G2: 6/28 neoplasias benignas

G3: 15/56 carcinomas mamários sem metástase

G4: 4/14 carcinomas mamários com metástase

As reações de amplificação foram realizadas em placas de 96 poços, contendo duplicatas de cada amostra, controle negativo (branco) e uma amostra tumoral sabidamente positiva como controle positivo. Os controles positivos utilizados foram neoplasias mamárias malignas de cadela que tiveram seu RNA extraído pelo método do Trizol.

Em cada poço foi adicionado 11,5 μL de solução composta por 6,25 μL do reagente Power SYBR Green PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems), 0,3 μL de cada iniciador (*forward* e *reverse*) a 10 Mm e 1 μL de cDNA (diluição de 1:5).

As condições de reação de amplificação para todos os iniciadores foram 40 ciclos de 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 60°C . Curvas de dissociação foram incluídas ao final de cada corrida para a determinação da especificidade dos produtos da PCR, visualizada por um pico único do produto amplificado. Todas as amostras tiveram apenas o seu componente epitelial avaliado. Para

as mamas normais avaliou-se o componente epitelial glandular normal e para os tumores foram avaliadas apenas as áreas transformadas, fossem elas benignas para o grupo 1 ou carcinomatosas para os grupos 2 e 3.

Para toda reação de RT-qPCR é necessária a utilização de genes endógenos ou normalizadores que são genes constitutivamente expressos no tecido em análise. Para este estudo o gene selecionado como normalizador foi a β -actina (*ACTB*), de acordo com Brinkhof et al. (2006).

Os primers para a amplificação dos gene normalizador (β -actina) e dos genes alvo utilizados neste estudo (APC e WNT) foram desenhados com o uso do *software* Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) e suas sequências estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Sequências *forward* (F) e *reverse* (R) dos primers confeccionados para amplificação dos genes *APC*, *WNT5A* e *ACTB*.

GENE	FORWARD	REVERSE
APC	5'-GCGAGGTTTGCAGATTTCCACCA-3'	5'-ATCAGCCATTTCACACCTCCCAGG-3'
WNT5A	5'-CATTGGAGAAGGCGCAAAG-3'	5'-ACCTCCGATGCCGGAATT-3'
ACTB	5'-GGCATCCTGACCCTCAAGTA-3'	5'-CTTCTCCATGTCGTCCCAGT-3'

A amplificação dos fragmentos alvo foi realizada em um termociclador ótico (7000 Real Time PCR System, Applied Biosystems), com um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 15 segundos e pareamento a 60°C por 1 minuto. Os dados ópticos foram posteriormente analisados no programa 7000 System Software (Applied Biosystems).

4.8. Forma de Análise dos Resultados

4.8.1. Expressão proteica

Primeiramente todos os anticorpos foram avaliados da mesma forma com relação ao percentual de células marcadas e para isto foram atribuídos escores de marcação: (0) nenhuma ou até 10% de células marcadas, negativo; (1) de 10 a 25% de células marcadas; (2) de 25 a 50% de células marcadas; (3) de 50 a 75% de células marcadas e (4) acima de 75% de células marcadas.

Ademais, para os anticorpos APC, Wnt5a e Citoceratina foi avaliada também a intensidade de marcação, sendo: (I) marcação fraca; (II) moderada e (III) marcação forte.

Para a E-caderina, além do percentual de células marcadas foi avaliada também a positividade no citoplasma das amostras, classificada apenas como positiva ou negativa.

Para a β -catenina a avaliação foi feita através do esquema de escore descrito para o percentual de células marcadas de acordo com ao local da marcação: membranosa (M), citoplasmática (C) ou nuclear. O critério de definição para marcação citoplasmática tanto para este anticorpo como para a E-caderina foi o de não haver delimitação entre membrana e citoplasma, de acordo com Gama et al. (2008).

Todas as amostras foram avaliadas de acordo com a escala e intensidade de marcação e sua dependência com os grupos experimentais (G1, G2, G3 e G4) e com o grau histopatológico de malignidade (Graus I, II e III) pelo método da análise estatística univariada, com o uso do Teste Exato de Fisher. Esta análise permitiu avaliar a dependência de cada variável com o grupo ou grau histopatológico de forma individualizada, sem levar em conta a influência de uma proteína sobre a outra.

Este mesmo teste foi utilizado para avaliar os resultados da localização da marcação da β -catenina e E-caderina. Todas as análises estatísticas univariadas consideraram o nível de significância de 95% e o *software* de análise utilizado foi o SAS versão 9.0 para *Windows*.

A avaliação dos resultados da expressão de todas as proteínas estudadas em conjunto foi feita através da estatística multivariada, pelo método da análise de correspondência múltipla (ACM). Esta análise permite avaliar o padrão de relação entre diversas variáveis categóricas e é muito útil na interpretação de dados que são dependentes e não possuem uma distribuição normal. A ACM converte uma matriz de dados não negativos em um particular tipo de gráfico que exhibe as linhas e colunas da matriz como pontos de um espaço vetorial de dimensão menor que a original, de maneira que as relações entre as linhas, entre as colunas e entre linhas e colunas possam ser interpretadas.

Ou seja, o objetivo desta análise é achar um subespaço que melhor ajuste o conjunto (nuvem) de pontos no espaço euclidiano. Um dos pontos relevantes desta técnica é que não há exigência de normalidade para a resposta estudada. Em conseqüência, os testes estatísticos inferenciais não necessariamente são utilizados, estando a solução sugerida pela distribuição gráfica de seus resultados (GREENACRE; HASTIE, 1987; BENZÉCRI, 1992). Embora não seja necessário o emprego de testes estatísticos, no presente estudo, com o objetivo de reforçar as associações apresentadas pela Análise de Correspondência Múltipla, foi utilizado o Teste Exato de Fisher na avaliação da dependência entre cada variável e o grupo a que pertence.

O *software* utilizado para a análise multivariada foi o STATISTICA 9 e para o Teste Exato de Fisher foi utilizado o *software* SAS versão 9 para *Windows* com nível de significância de 95%. Estas análises foram realizadas no Departamento de Ciências Exatas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/Unesp, campus de Jaboticabal.

4.8.2. Expressão gênica

O cálculo para a determinação da expressão gênica foi o do $\Delta\Delta Ct$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), o qual se baseia na reação exponencial da PCR. Para tal a expressão $QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde QR representa o nível de expressão gênica, Ct representa o ciclo de amplificação no qual cada amostra apresentou amplificação exponencial; ΔCt se refere à diferença entre o Ct da amostra amplificada para o gene alvo e o Ct da mesma amostra amplificada para o gene referência, e $\Delta\Delta Ct$ representa a diferença entre o ΔCt da amostra de interesse em determinado tempo e o ΔCt da amostra de referência. Assim, genes que apresentaram $QR \geq 2$ foram considerados genes de expressão elevada, enquanto genes que apresentaram $QR < 0,6$, foram considerados genes de expressão reduzida.

Foram utilizados os valores de mediana para a comparação entre os grupos através da Análise de Variância (ANOVA) e teste de Kruskal-Wallis e para as comparações aos pares foi utilizado o Teste de Mann-Whitney com nível de significância de 95%. Devido ao baixo número de amostras de carcinomas metastáticos (grupo 3) para a análise das expressões gênicas do

APC e *WNT5A*, estas amostras foram unidas aos carcinomas não metastáticos (grupo 2) para formar um único grupo de neoplasias malignas.

4.8.3. Análise da sobrevida global das pacientes

Para o monitoramento da evolução clínica das cadelas foram aplicados questionários aos proprietários (Apêndice 1), contendo perguntas sobre dados epidemiológicos e reprodutivos, além do endereço e telefones de contato. O objetivo deste questionário foi padronizar as informações levantadas no momento do diagnóstico e obter uma lista de cadastro dos proprietários, que possibilitasse o acompanhamento do animal após a mastectomia por um período de dois anos. O tempo de sobrevida foi contado do momento da realização da cirurgia até o óbito da paciente devido a progressão da doença. A recidiva foi definida como a ocorrência de outra neoplasia mamária após a cirurgia, sendo esta no mesmo local cirúrgico. Não foi considerado como recidiva o aparecimento de novos nódulos na cadeia contralateral.

Para determinar o valor prognóstico do escore de cada um dos marcadores e da localização da β -catenina e também da expressão relativa de cada um dos genes estudados, curvas de sobrevida foram avaliadas pelo método de Kaplan-Meier e a significância estatística foi determinada pelo teste de log-rank. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos com $p < 0,05$. Para a análise de sobrevida foi utilizado o software *GraphPad Prism 5*.

5. RESULTADOS

5.1. Dados epidemiológicos

Das 98 cadelas envolvidas no estudo, 24 (24,5%) eram animais sem raça definida (SRD), 19 (19,4%) da raça Poodle e 10 (10,2%) da raça Cocker Spaniel e os demais de outras raças menos representativas. A idade dos animais variou de 5 a 16 anos, com média de 10 anos.

Com relação ao estado reprodutivo, 29 (29,6%) cadelas eram castradas no momento do diagnóstico, 36 (36,7%) já haviam apresentado pseudogestação pelo menos uma vez ao longo da vida e 9 (9,2%) receberam progestágenos ao menos uma vez.

Exceto para as mamas normais, os tipos histopatológicos diagnosticados nos grupos 2, 3 e 4 foram distribuídos como apresentado na tabela 3:

Tabela 3. Distribuição dos tipos histopatológicos* das amostras de tecido utilizadas de acordo com o grupo experimental.

Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Tipo Histológico	Tipo Histológico	Tipo Histológico
17 adenomas	26 carcinomas em tumor misto	6 carcinomas sólidos
5 hiperplasias	17 carcinomas tubulares	5 carcinomas papilares
6 tumores mamários mistos benignos	6 carcinomas papilares	1 carcinoma em tumor misto
1 ectasia ductal	5 carcinomas sólidos	1 carcinoma micropapilar
	2 carcinomas <i>in situ</i>	1 carcinoma anaplásico
n=28	n=56	n=14

*Classificadas segundo Cassali et al. (2011)

Com relação à graduação histológica, no G3, 70% foram dos tumores classificados em de neoplasias de grau I (n=39), seguido de 23,2% de neoplasias de grau II (n=13) e 3,4% de grau III (n=2). Neste cálculo não foram levadas em conta as 2 amostras de carcinomas *in situ*, já que estas não são graduadas.

Além da classificação histopatológica, o padrão das metástases no grupo 4 foi distribuído conforme apresentado na Tabela 4:

Neste grupo o percentual de neoplasias de grau I foi de 28,6% (n=4); 50% de grau II (n=7) e 7,1% de neoplasias de grau III (n=1). As amostras de carcinoma micropapilar e anaplásico não recebem graduação.

Tabela 4. Distribuição do padrão das metástases no G4 de acordo com o tipo histopatológico e graduação histológica.

Tipo Histológico	Graduação histológica	Localização da metástase
Carcinoma sólido	I	linfonodo inguinal
Carcinoma sólido	III	linfonodo inguinal
Carcinoma sólido	II	linfonodo inguinal e pulmonar
Carcinoma sólido	II	linfonodo inguinal e pulmonar
Carcinoma sólido	II	linfonodo inguinal e esplênica
Carcinoma sólido	II	linfonodo inguinal e cutânea
Carcinoma papilar	I	linfonodo inguinal
Carcinoma papilar	I	linfonodo inguinal
Carcinoma papilar	II	Pulmonar
Carcinoma papilar	II	linfonodo inguinal e cutânea
Carcinoma papilar	II	Sistema nervoso central
Carcinoma em tumor misto	I	Pulmonar
Carcinoma micropapilar	–	linfonodo inguinal e cutânea
Carcinoma anaplásico	–	Cutânea

5.2. Expressão protéica – Análise Univariada

5.2.1. APC (*Adenomatous poliposis coli*)

A marcação para a proteína APC foi observada no citoplasma das células epiteliais neoplásicas, onde 79% das amostras apresentaram escores elevados de marcação, ou seja, escores 3 ou 4, divididos em padrões de fraca, média e forte intensidade de marcação (Figura 3).

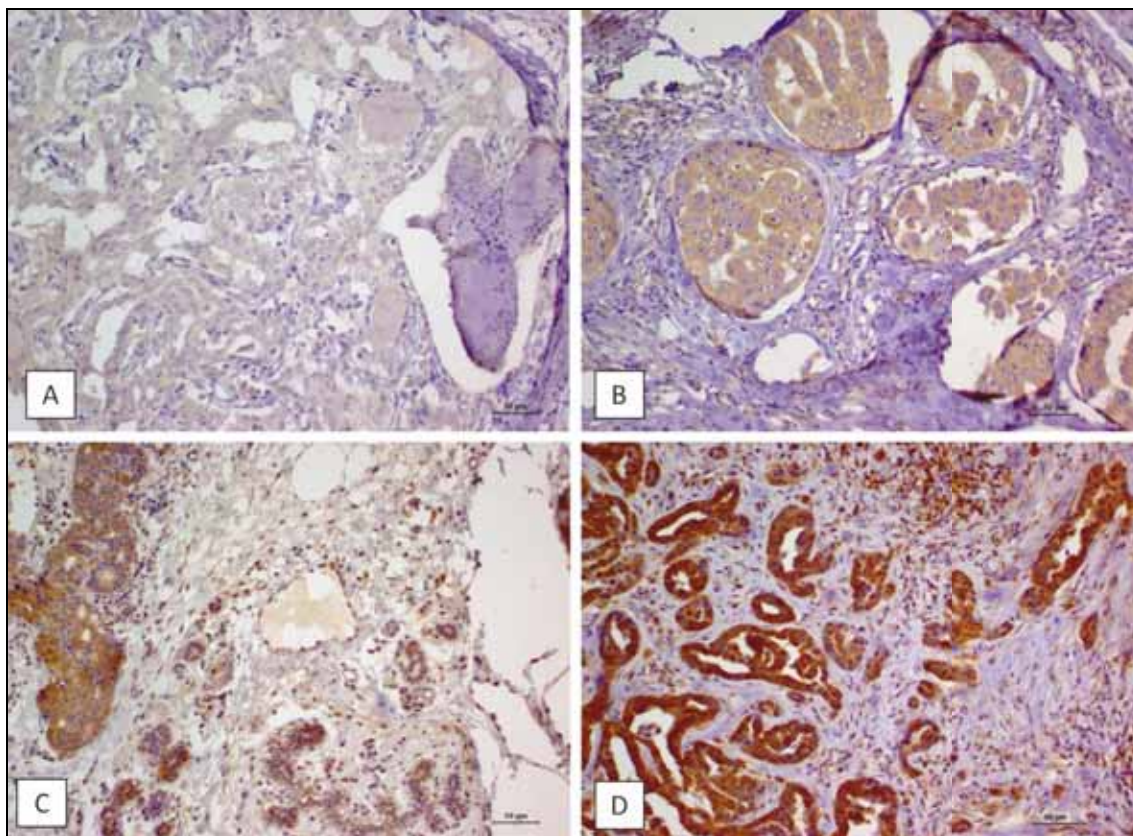


Figura 3. Imunodeteção da proteína APC em neoplasias mamárias caninas. (A) Carcinoma mamário em tumor misto grau III não metastático (Grupo 3) com marcação citoplasmática em mais de 75% das células e de fraca intensidade. (B) Carcinoma mamário padrão micropapilar metastático (Grupo 4) com marcação em mais de 75% das células e de intensidade média de marcação citoplasmática. (C) Carcinoma mamário padrão sólido grau III metastático (Grupo 4) com marcação em 50-75% das células de intensidade média. (D) Carcinoma mamário em tumor misto grau II não metastático (Grupo 3) com forte intensidade de marcação citoplasmática. Imuno-histoquímica, Histofine, DAB, 200x.

Não houve diferença significativa entre os grupos para o escore de marcação da proteína APC. No entanto, quando esta marcação foi avaliada entre os diferentes graus histopatológicos, houve diferença significativa pelo Teste Exato de Fisher (Tabela 5).

Tabela 5. Número de amostras de mamas caninas em cada grupo e grau histopatológico para os diferentes escores de marcação do APC.

APC	Grupos				Graus		
	G1	G2	G3	G4	I	II	III
Escore 1	0	1	3	1	0	2	1
Escore 2	0	1	6	0	4	2	0
Escore 3	0	3	10	3	10	1	3
Escore 4	1	17	26	9	21	12	0
Total (n)	1	22	45	13	35	17	4
Valor de p	p=0,71				p=0,034*		

*Diferença significativa entre os graus pelo Teste Exato de Fisher.

A expressão proteica do APC foi significativamente menor nas neoplasias de grau III quando comparadas àquelas de grau I e grau II ($p=0,014$ e $p=0,033$ respectivamente). O mesmo teste não mostrou diferença para o escore de expressão do APC entre as neoplasias de grau I e II ($p=0,06$).

Com relação às diferentes intensidades de marcação, não houve diferença significativa entre os grupos e os diferentes graus histopatológicos pelo Teste Exato de Fisher (Tabela 6).

Tabela 6. Número de amostras em cada um dos grupos e graus histopatológicos para as diferentes intensidades de marcação da proteína APC.

APC	Grupos				Graus		
	G1	G2	G3	G4	I	II	III
Intensidade I	0	3	12	2	5	5	2
Intensidade II	0	5	13	4	13	4	0
Intensidade III	0	14	20	7	17	8	1
Total (n)	0	22	45	13	35	17	3
Valor de p	p=0,638				p=0,237		

5.2.2. Wnt5a

A marcação para o Wnt5a foi observada no citoplasma das células epiteliais neoplásicas. A mesma foi avaliada de acordo com o percentual de células marcadas bem como para sua intensidade de marcação (Figura 4).

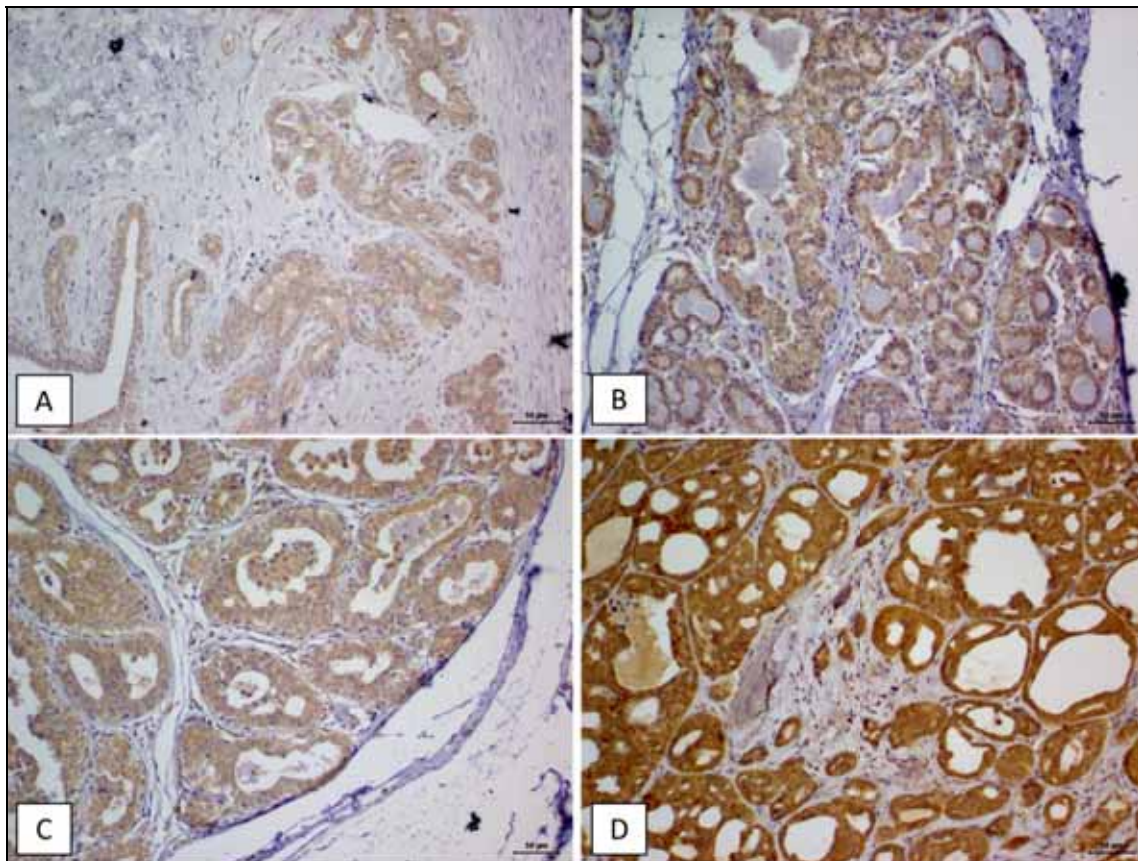


Figura 4. Imunodeteccção da proteína Wnt5a em neoplasias mamárias caninas. (A) Adenoma mamário (Grupo 2) com marcação citoplasmática em mais de 75% das células e de fraca intensidade. (B) Carcinoma mamário *in situ* não metastático (Grupo 3) com marcação citoplasmática em mais de 75% das células e de moderada intensidade. (C) Carcinoma mamário padrão tubular grau II não metastático (Grupo 3) com marcação em mais de 75% das células e com moderada intensidade. (D) Carcinoma mamário em tumor misto grau I não metastático (Grupo 3) com marcação em mais de 75% das células e de forte intensidade. Imuno-histoquímica, Histofine, DAB, 200x.

Não houve diferença significativa entre os grupos e também entre os graus histopatológicos para o percentual de células marcadas (Tabela 7).

Foi observada diferença na intensidade de marcação entre os grupos ($p=0,027$), sendo que as neoplasias benignas apresentaram intensidade significativamente menor de marcação quando comparadas aos carcinomas

não metastáticos ($p=0,033$). As neoplasias benignas não diferiram das mamas normais ($p=0,089$) e dos carcinomas metastáticos ($p=0,174$) (Tabela 8).

Tabela 7. Número de amostras em cada grupo e grau histopatológico para os diferentes escores de marcação da proteína Wnt5a.

Wnt5a	Grupos				Graus		
	G1	G2	G3	G4	I	II	III
Escore 1	0	0	1	2	0	1	0
Escore 2	0	4	1	9	1	0	0
Escore 3	0	5	7	23	5	2	0
Escore 4	2	9	23	5	17	9	2
Total (n)	2	18	32	39	23	12	2
Valor de p	p=0,443				p=0,849		

Ainda com relação à intensidade de marcação das células, as mamas normais não apresentaram diferença quando comparadas aos carcinomas metastáticos ($p=0,107$) e aos carcinomas não metastáticos ($p=0,117$). Também não houve diferença significativa entre os carcinomas com e sem metástase ($p=0,99$).

Não houve diferença significativa para a intensidade de marcação entre os carcinomas de graus I, II e III (Tabela 8).

Tabela 8. Número de amostras dos graus histopatológicos I, II e III para os diferentes escores e intensidade de marcação da proteína Wnt5a.

Wnt5a	Grupos				Graus		
	G1	G2	G3	G4	I	II	III
Intensidade I	1	7	3	0	17	12	7
Intensidade II	1	1	7	1	14	3	5
Intensidade III	0	10	22	5	7	5	1
Total (n)	2	18	32	6	38	20	13
Valor de p	p=0,027*				p=0,555		

*Diferença significativa entre os grupos pelo Teste Exato de Fisher

5.2.3. β -catenina

A marcação para esta proteína foi observada na membrana plasmática da célula epitelial, em seu citoplasma e também no núcleo celular (Figura 5). Houve diferença significativa entre os grupos para a localização da marcação deste anticorpo ($p=0,00065$) pelo Teste Exato de Fisher.

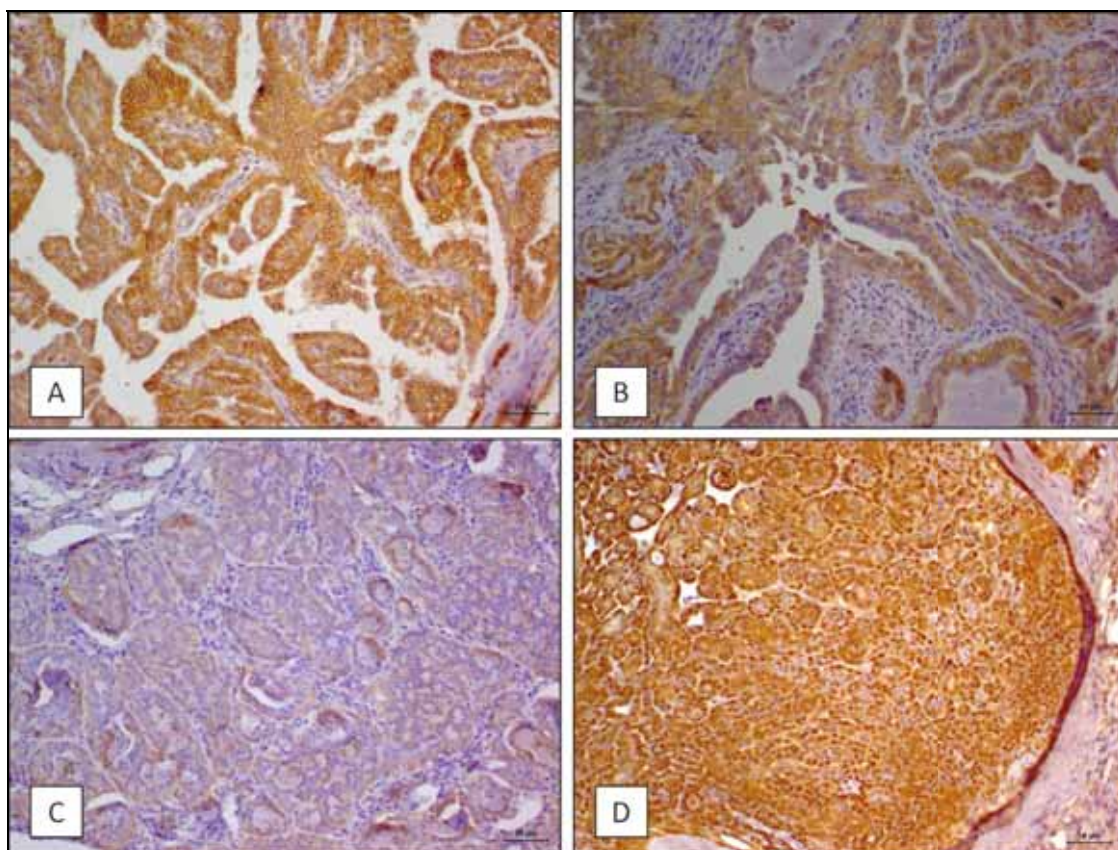


Figura 5. Imunodeteção de β -catenina em neoplasias mamárias caninas. (A) Carcinoma mamário padrão papilar grau II não metastático (Grupo 3) apresentando marcação em mais de 75% das células em membrana. (B) Carcinoma mamário padrão papilar grau II não metastático (Grupo 3) com marcação mista entre membrana e citoplasma; (C) Carcinoma mamário em tumor misto grau I não metastático (Grupo 3) com marcação citoplasmática em mais de 75% das células, observar a ausência de divisão entre membrana e citoplasma; (D) Carcinoma mamário padrão sólido grau II metastático (Grupo 4) com marcação nuclear em 50-75% das células. Imuno-histoquímica, Histofine, DAB, 200x.

As alterações benignas da mama apresentaram maior marcação em membrana que os carcinomas metastáticos ($p=0,001$) e os não metastáticos ($p=0,01$). Houve diferença para a localização celular da β -catenina entre os carcinomas com e sem metástase ($p=0,016$). Não houve diferença significativa

para a localização da marcação entre as mamas normais e as neoplasias benignas ($p=1,000$) e também entre as mamas normais e os carcinomas metastáticos ($p=0,214$) e não metastáticos ($p=0,62$) pelo Teste Exato de Fisher.

A tabela 9 apresenta o número de amostras para o padrão de marcação da β -catenina dentro dos grupos e para cada grau histopatológico. Não houve diferença significativa entre os diferentes graus com relação à localização da marcação para este anticorpo pelo Teste Exato de Fisher.

Tabela 9. Número de amostras de cada grupo e grau histopatológico com marcação em membrana, citoplasma e núcleo para o anticorpo β -catenina.

β -catenina	Grupos				Graus		
	G1	G2	G3	G4	I	II	III
Membrana	2	17	20	1	15	5	0
Citoplasma	0	5	22	1	16	5	1
Núcleo	0	0	7	4	5	5	1
Total (n)	2	22	49	6	36	15	2
Valor de p	$p=0,0006^*$				$p=0,308$		

*Diferença significativa entre os grupos pelo Teste Exato de Fisher

É possível observar que 100% das amostras de mamas normais (G1) e 77,2% das neoplasias benignas (G2) apresentaram marcação de membrana, enquanto 45% das amostras de carcinomas não metastáticos (G3) apresentaram marcação citoplasmática e 66,7% dos carcinomas metastáticos apresentaram marcação nuclear para β -catenina.

5.2.4. E-caderina

A marcação para o anticorpo E-caderina foi observada na membrana celular e no citoplasma das células epiteliais e foi classificada em escores de marcação, como descrito para os demais anticorpos (Figura 6). Não foram observadas amostras negativas para a marcação com este anticorpo.

A diferença do percentual de membranas de células epiteliais marcadas foi significativo entre os grupos pelo Teste Exato de Fisher ($p=0,042$). Esta marcação foi significativamente maior entre as neoplasias benignas quando

comparadas aos carcinomas não metastáticos ($p=0,024$) e aos carcinomas metastáticos ($p=0,0008$). Não houve diferença significativa entre os carcinomas metastáticos e não metastáticos ($p=0,399$).

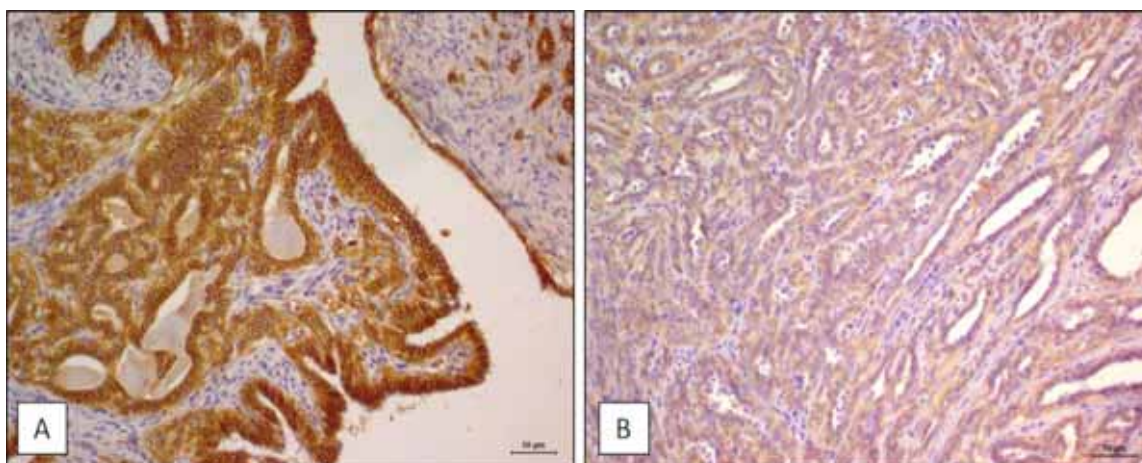


Figura 6. Imunodeteccção de E-caderina em neoplasias mamárias caninas. (A) Carcinoma mamário em tumor misto grau I não metastático (Grupo 3). Observar a forte marcação em membrana celular em mais de 75% das células. (B) Carcinoma mamário padrão tubular grau I não metastático (Grupo 3) com baixa marcação em membrana (até 25% das células) e presença de marcação citoplasmática. Notar a ausência de distinção entre membrana e citoplasma. Imuno-histoquímica, Histofine, DAB, 200x.

Observando as mamas normais, estas não apresentaram diferença significativa quanto ao escore de marcação quando comparadas às neoplasias benignas ($p=1,000$), aos carcinomas não metastáticos ($p=0,854$) e aos carcinomas metastáticos ($p=0,400$) (Tabela 10).

Tabela 10. Número de amostras em cada grupo e grau histopatológico para os diferentes escores de marcação em membrana para a E-caderina.

E-caderina	Grupos				Graus		
	G1	G2	G3	G4	I	II	III
Escore 1	0	0	6	3	4	3	0
Escore 2	0	0	5	2	4	3	0
Escore 3	1	4	17	4	11	7	2
Escore 4	3	17	22	2	18	6	1
Total (n)	4	21	50	11	37	19	3
Valor de p	p=0,042*				p=0,802		

*Diferença entre os grupos pelo Teste Exato de Fisher

A comparação entre os diferentes graus histopatológicos e o percentual de células marcadas não mostrou diferença significativa ($p=0,802$) pelo Teste Exato de Fisher (Tabela 10).

Foi observado que 47,7% ($n=41$) dos casos apresentavam marcação citoplasmática, ou seja, sem distinção entre o citoplasma e a membrana plasmática. Os dados correspondentes à esta observação estão apresentados na tabela 11.

Tabela 11. Número de amostras negativas e positivas para marcação citoplasmática de E-caderina nos diferentes grupos experimentais e graus histopatológicos.

E-cad/Citop	Grupos				Graus		
	G1	G2	G3	G4	I	II	III
Negativo	4	18	20	3	15	6	2
Positivo	0	3	30	8	22	13	1
Total (n)	4	21	50	11	37	19	3
Valor de p	$p=0,0001^*$				$p=0,802$		

*Diferença entre os grupos pelo Teste Exato de Fisher

Este padrão citoplasmático de marcação foi significativamente maior nos carcinomas metastáticos ($p=0,0018$) e não metastáticos ($p=0,005$) quando comparados às neoplasias benignas e também quando os mesmos carcinomas foram comparados às mamas normais ($p=0,025$ e $p=0,033$ respectivamente). Não houve diferença significativa entre as mamas normais e as neoplasias benignas ($p=1,000$) e entre os carcinomas com e sem metastáse ($p=0,511$).

A marcação citoplasmática não variou entre os diferentes graus de malignidade ($p=0,348$), conforme dados apresentados na tabela 11.

5.2.5. Citoceratina

A marcação para o anticorpo Citoceratina foi observada no citoplasma das células epiteliais e não foram observadas amostras negativas para a marcação deste anticorpo (Figura 7).

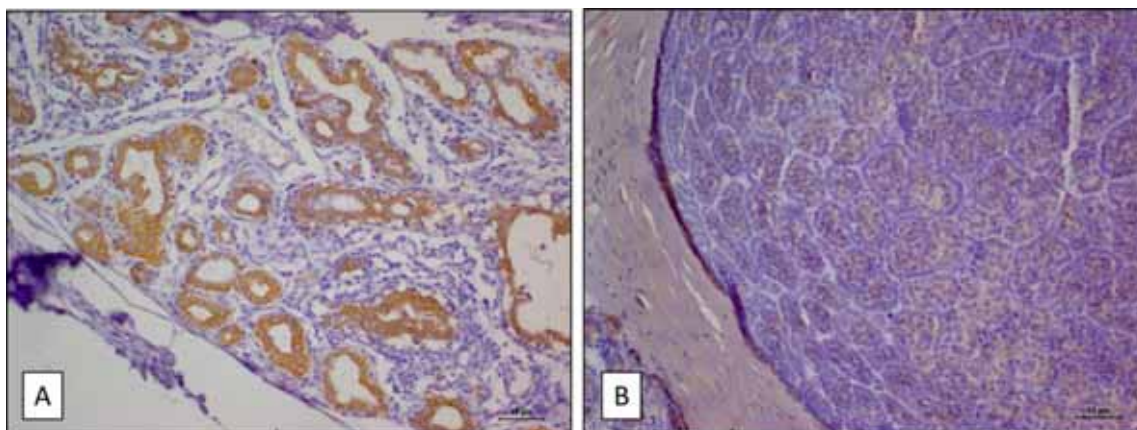


Figura 7. Imunodeteção de citoceratina em neoplasias mamárias caninas. (A) Adenoma mamário (Grupo 2) apresentando marcação em mais de 75% das células e de forte intensidade. (B) Carcinoma mamário padrão sólido grau II metastático (Grupo 4) com marcação em até 25% das células e de fraca intensidade. Imuno-histoquímica, Histofine, DAB, 200x.

Não houve diferença entre os grupos pelo Teste Exato de Fisher para o percentual de células marcadas ($p=0,114$). Este percentual de células marcadas foi diferente entre os graus histológicos ($p=0,038$). Neoplasias de grau I apresentaram maior número de células positivas quando comparadas às de grau II ($p=0,047$) e III ($p=0,034$). Não houve diferença entre as neoplasias de graus II e III ($p=1,000$) pelo Teste Exato de Fisher (Tabela 12).

Tabela 12. Número de amostras em cada grupo e grau histopatológico para os diferentes escores de marcação para o anticorpo Citoceratina.

Citoceratina	Grupos				Graus		
	G1	G2	G3	G4	I	II	III
Escore 1	0	3	15	7	8	11	3
Escore 2	0	2	9	3	7	4	0
Escore 3	0	6	13	2	11	3	0
Escore 4	2	10	14	1	12	2	0
Total (n)	2	21	51	13	38	20	3
Valor de p	$p=0,114$				$p=0,038^*$		

*Diferença entre os graus pelo Teste Exato de Fisher

No que diz respeito à intensidade da marcação observada, houve diferença entre os grupos ($p=0,0034$), sendo que esta foi significativamente

menor nos carcinomas metastáticos quando comparados às neoplasias benignas ($p=0,02$) e aos carcinomas não metastáticos ($p=0,021$). Não houve diferença na comparação entre as mamas normais e os carcinomas metastáticos ($p=0,269$). Os carcinomas sem metástase demonstraram intensidade de marcação significativamente menor que as mamas normais ($p=0,038$), no entanto não foi observada diferença para as neoplasias benignas ($p=0,188$), conforme os dados apresentados na tabela 13. Não houve diferença quanto à intensidade de marcação na comparação entre as neoplasias benignas com as mamas normais ($p=0,146$).

Tabela 13. Número de amostras dos grupos e graus histopatológicos para as diferentes intensidades de marcação para o anticorpo Citoceratina.

Citoceratina	Grupos				Graus		
	G1	G2	G3	G4	I	II	III
Intensidade I	0	6	25	7	17	12	7
Intensidade II	1	2	15	4	14	3	5
Intensidade III	1	13	11	2	7	5	1
Total (n)	2	21	51	13	38	20	13
Valor de p	$p=0,0034^*$				$p=0,116$		

*Diferença entre os grupos pelo Teste Exato de Fisher

Ainda com relação à intensidade da marcação observada entre as células epiteliais neoplásicas não houve diferença significativa entre as neoplasias de graus I, II e III pelo Teste Exato de Fisher ($p=0,116$) (Tabela 13).

5.2.6. Vimentina

Foi observada intensa marcação citoplasmática para o anticorpo vimentina, contudo, neste estudo, foram consideradas apenas aquelas que apresentaram marcação nas células epiteliais neoplásicas, desconsiderando a marcação das células mioepiteliais (figura 8) e das células mesenquimais do estroma adjacente.

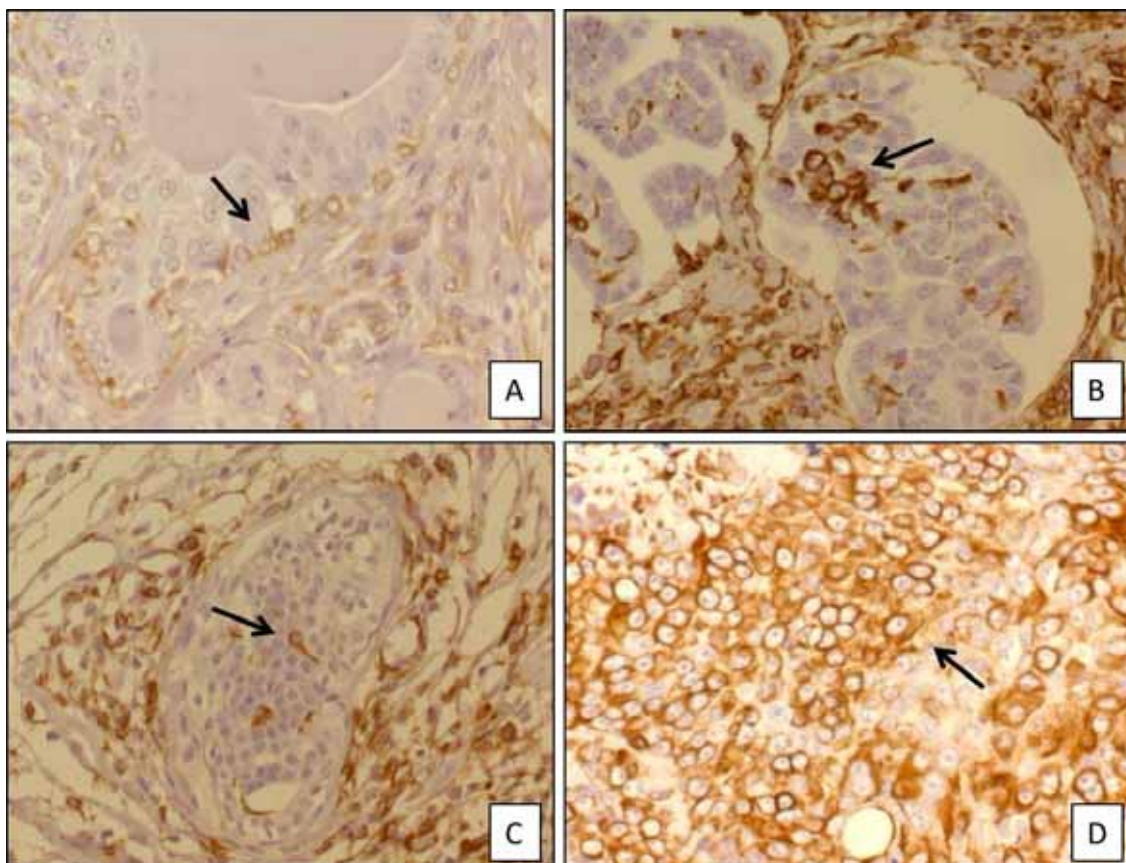


Figura 8. Imunodeteccção de vimentina em neoplasias mamárias caninas. (A) Carcinoma mamário padrão tubular grau I não metastático (Grupo 3) com marcação positiva nas células mioepiteliais (seta) e negativa nas células epiteliais neoplásicas. (B) Êmbolo tumoral metastático em vaso linfático de mama canina com células epiteliais positivas para vimentina (seta). (C) Carcinoma mamário padrão sólido grau I não metastático (Grupo 3) com célula epitelial positiva no centro da imagem (seta). (D) Carcinoma padrão sólido grau III metastático (Grupo 4) apresentando elevado percentual de marcação nas células epiteliais neoplásicas (seta). Imuno-histoquímica, Histofine, DAB, 200x.

Não foram encontradas amostras com marcações em mais de 75% das células epiteliais neoplásicas (score 4). Além disso, a intensidade de marcação não mostrou variação entre as amostras.

Na avaliação deste anticorpo houve diferença entre os grupos pelo Teste Exato de Fisher ($p=0,000002$), mostrando um maior percentual de amostras negativas entre as neoplasias benignas quando comparadas aos carcinomas metastáticos ($p=0,0000003$) e aos não metastáticos ($p=0,0001$). As mamas normais apresentaram menor percentual de marcação em relação aos carcinomas metastáticos ($p=0,0021$), tabela 14.

Não houve diferença significativa entre as neoplasias mamárias malignas com e sem metástase ($p=0,078$) e também entre as mamas normais e as neoplasias benignas ($p=1,0$) e os carcinomas não metastáticos ($p=0,23$).

Tabela 14. Número de amostras em cada grupo e grau histopatológico para os diferentes escores de marcação para o anticorpo Vimentina.

Vimentina	Grupos				Graus		
	G1	G2	G3	G4	I	II	III
Negativo	4	21	20	1	17	2	0
Escore 1	0	1	21	10	18	9	2
Escore 2	0	0	3	1	2	2	0
Escore 3	0	0	4	1	2	4	0
Total (n)	4	22	48	13	39	17	2
Valor de p	$p=0,000002^*$				$p=0,061$		

*Diferença significativa entre os grupos pelo Teste Exato de Fisher

Com relação ao grau histopatológico não foi observada diferença entre as neoplasias de graus I, II e III para o percentual de células positivas para vimentina pelo Teste Exato de Fisher ($p=0,061$), tabela 14.

5.3. Expressão proteica – Análise Multivariada

Com o objetivo de avaliar a associação das proteínas estudadas e o fenótipo de EMT foi utilizada a Análise de Correspondência Múltipla (ACM).

Para esta análise foram utilizados os escores de marcação dos anticorpos do presente estudo: Wnt5a, APC, Citoceratina, E-caderina, Vimentina e ainda a localização da marcação da β -catenina. Como esta análise leva em conta todas as amostras e todos os anticorpos, as amostras que não apresentavam resultados para um ou outro anticorpo (parcelas perdidas) tiveram de ser eliminadas da análise. Desta forma o número de amostras utilizadas para a ACM está apresentado a seguir.

G1: 0/5 mamas normais

G2: 11/28 neoplasias benignas

G3: 15/56 carcinomas mamários sem metástase

G4: 4/14 carcinomas mamários com metástase

Devido ao baixo número amostral de mamas normais e suas respectivas parcelas perdidas, as mesmas não foram incluídas na ACM.

A análise de correspondência usa o conceito básico Qui-quadrado (χ^2) para padronizar as frequências e formar a base para as associações desejadas. É uma medida padronizada que compara um valor real com um valor esperado de uma célula de uma tabela de contingência. Apenas valores de Qui-quadrado positivos são indicadores de associação entre a variável estudada e o grupo a que pertence. É importante salientar que valores de Qui-quadrado acima de 1 demonstram associação mais forte (crescente). A Tabela 15 apresenta os valores de Qui-quadrado para cada uma das variáveis e seus respectivos grupos.

Tabela 15. Valores de Qui-quadrado (χ^2) para cada variável dentro de seu respectivo grupo. As células em negrito são valores de Qui-quadrado positivos.

<i>Variável</i>	<i>Categoria</i>	<i>Benigno</i>	<i>Sem metástase</i>	<i>Com metástase</i>
Wnt5a	Wnt Escore 2	1,603 (+)	0,500	0,533
	Wnt Escore 3	0,742 (+)	0,900	0,166 (+)
	Wnt Escore 4	0,946	0,595 (+)	0,014 (+)
APC	APC Escore 2	1,833	2,500 (+)	0,666
	APC Escore 3	0,018	0,000	0,050 (+)
	APC Escore 4	0,593 (+)	0,657	0,085 (+)
Citoceratina	Cito Escore 1	1,025	0,045 (+)	1,603
	Cito Escore 2	1,833	0,900 (+)	0,166 (+)
	Cito Escore 3	1,456 (+)	0,250	1,066
	Cito Escore 4	1,472 (+)	0,333	0,800
E-caderina	Ecad Escore 1	1,833	0,100 (+)	2,666 (+)
	Ecad Escore 3	0,125	0,714	1,219 (+)
	Ecad Escore 4	0,872 (+)	0,000	2,400
Vimentina	Vim Escore 0	3,645 (+)	0,735	2,266
	Vim Escore 1	2,933	0,250 (+)	3,504 (+)
	Vim Escore 2	1,833	0,900 (+)	0,166 (+)
β -catenina	β -catenina M	2,945 (+)	0,666	1,600
	β -catenina C	0,445	0,666 (+)	0,225
	β -catenina N	2,200	0,000	6,050 (+)

A partir da construção desta tabela é criado um mapa perceptual que permite ao analista visualizar, como em um mapa geográfico, as proximidades (similaridades ou dissimilaridades) entre os estímulos propostos no trabalho de pesquisa. O mapa perceptual para o presente estudo está representado na figura 9.

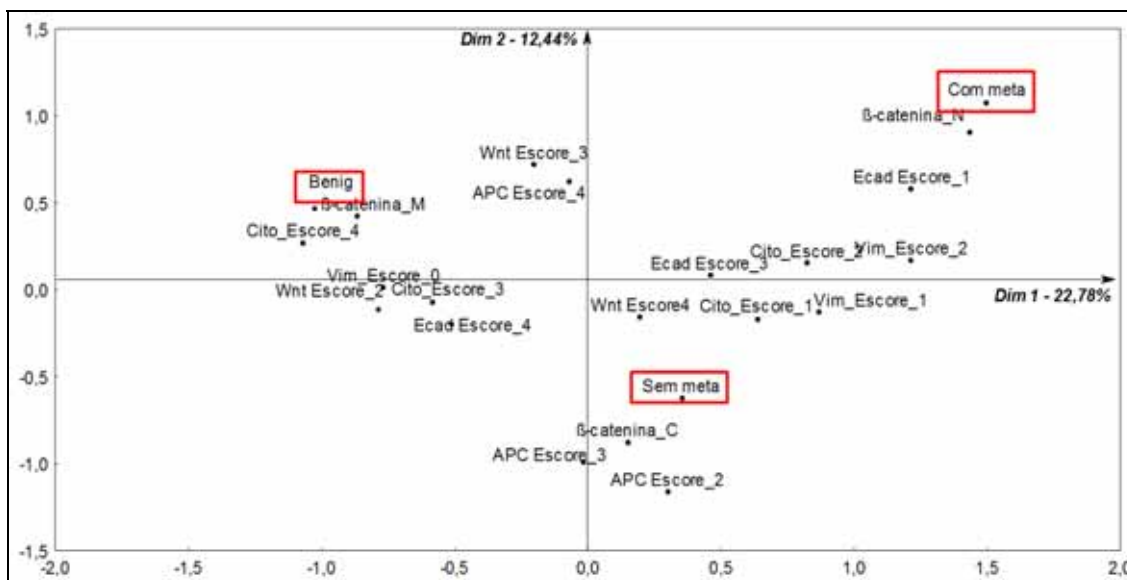


Figura 9. Mapa perceptual demonstrando as associações entre os grupos compostos por neoplasias benignas e outras alterações não malignas da glândula mamária canina (G2), o grupo dos carcinomas não metastáticos (G3) e o grupo dos carcinomas metastáticos (G4) com os escores de marcação de cada anticorpo e o padrão de localização celular da β -catenina.

Neste mapa perceptual também estão apresentadas as inércias de cada dimensão (Dim 1: 22,78% e Dim 2: 12,44%). Esta inércia é a variação total dos dados, sendo esta variação decomposta em cada eixo (ou dimensão) do gráfico. Assim, a inércia associada a cada dimensão do gráfico nos informa qual é a proporção da variação total que aquele eixo está explicando. A primeira dimensão do gráfico do mapeamento perceptual exibe a maior quantidade de inércia sendo o mais relevante, a segunda dimensão exibe a maior quantidade de inércia depois da primeira sendo o segundo mais importante.

Neste estudo, as variáveis que mais contribuíram com a inércia em cada dimensão foram, na Dimensão 1: Neoplasias Benignas (0,112) e β -catenina

nuclear (0,120) e na Dimensão 2: Neoplasias não metastáticas (0,105), APC Escores 2 (0,121), 3 (0,106) e 4 (0,130) e β -catenina citoplasmática (0,164).

Pelo mapa pode-se observar pela proximidade dos pontos que o grupo Benigno (G2) foi associado com Vimentina negativo ($\chi^2=3,645$), β -catenina em membrana ($\chi^2=2,945$), Wnt5a Escore 2 ($\chi^2=1,603$), Citoceratina Escore 4 ($\chi^2=1,472$) e Citoceratina Escore 3 ($\chi^2=1,456$). As variáveis a seguir apresentaram associações com o G2, mas estas não foram consideradas como associações fortes, pois os valores de Qui-quadrado foram abaixo de 1: E-caderina Escore 4 ($\chi^2=0,872$), Wnt5a Escore 3 ($\chi^2=0,742$) e APC escore 4 ($\chi^2=0,593$).

O grupo dos carcinomas não metastáticos (G3) foi fortemente associado apenas com APC Escore 2 ($\chi^2=2,500$) e as demais associações mais fracas foram: Vimentina Escore 2 ($\chi^2=0,900$), Citoceratina Escore 2 ($\chi^2=0,900$), β -catenina citoplasmática ($\chi^2=0,666$), Wnt5a Escore 4 ($\chi^2=0,595$), Vimentina Escore 1 ($\chi^2=0,250$), E-caderina Escore 1 ($\chi^2=0,100$) e Citoceratina Escore 1 ($\chi^2=0,045$).

Os carcinomas metastáticos (G4) foram fortemente associados com β -catenina nuclear ($\chi^2=6,050$), Vimentina Escore 1 ($\chi^2=3,504$), E-caderina Escore 1 ($\chi^2=2,666$) e Escore 3 ($\chi^2=1,219$). As variáveis Wnt5a Escore 2, Citoceratina Escore 2 e Vimentina Escore 2 apresentaram associações fracas com este grupo ($\chi^2=0,166$), além de APC escore 4 ($\chi^2=0,085$), APC Escore 3 ($\chi^2=0,050$) e Wnt5a Escore 4 ($\chi^2=0,014$).

Assim, estes dados mostram associações entre os grupos e as proteínas estudadas que estão representadas no mapa perceptual (Figura 10).

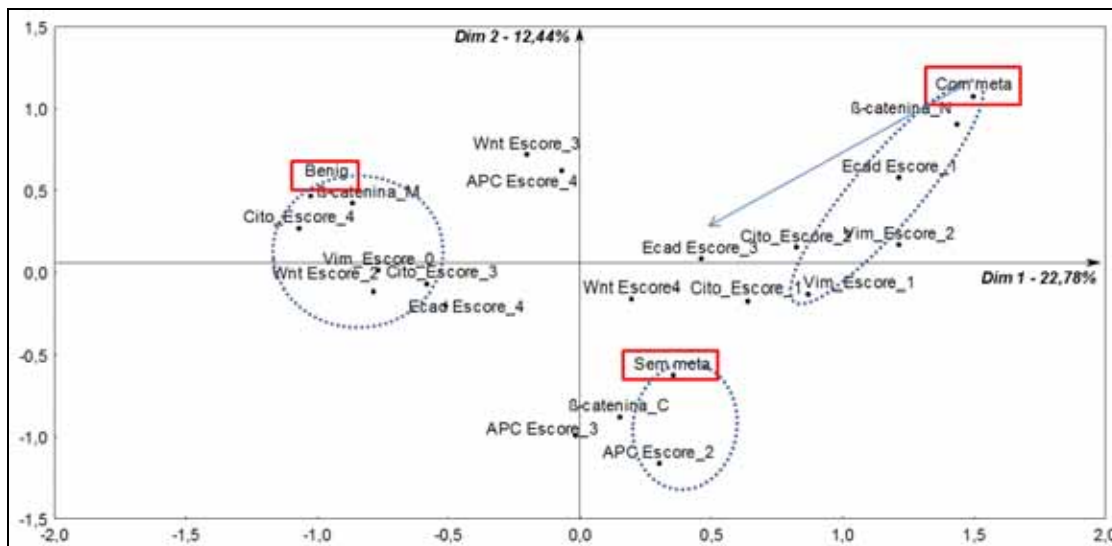


Figura 10. Mapa perceptual contendo as associações mais fortes (círculos e seta em azul) entre os grupos e as proteínas estudadas de acordo com a Análise de Correspondência Múltipla.

Para reconhecer as dependências entre uma variável e outra, análises dos fatores individuais foram realizadas pelo Teste Exato de Fisher entre os grupos que compuseram a ACM. Ou seja, foi aplicado este teste estatístico para analisar a dependência entre cada variável (Escore de Wnt5a, APC, E-caderina, Citoceratina e Vimentina e a localização celular da β -catenina) e os grupos (G2, G3 e G4).

Desta forma, o Teste Exato de Fisher mostrou independência entre as expressões proteicas de Wnt5a, APC, E-caderina, Citoceratina e os grupos, ou seja, cada uma destas variáveis, avaliadas individualmente, não mostrou diferença significativa entre os grupos que compuseram a ACM. Apesar deste fato, a ACM mostrou valores acima de 1 para o Qui-quadrado da associação entre alguns escores destas proteínas e os grupos, o que indica que esta associação não é aleatória e as categorias não devem ser consideradas completamente independentes (Tabelas 16 e 17).

Tabela 16. Número de amostras em cada grupo para os diferentes escores de marcação das proteínas Wnt5a e APC.

Grupo	Wnt5a			APC		
	Escore 2	Escore 3	Escore 4	Escore 2	Escore 3	Escore 4
G2	3 ¹	3	5	0	2	9
G3	1	1	13	5 ²	3	7
G4	0	1	3	0	1	3
Total (n)	4	5	21	5	6	19
Valor de p	p=0,199			p=0,170		

$$^1)\chi^2=1,603; ^2)\chi^2=2,500$$

Tabela 17. Número de amostras em cada grupo para os diferentes escores de marcação das proteínas E-caderina e Citoceratina.

Grupo	E-caderina			Citoceratina			
	Escore 1	Escore 3	Escore 4	Escore 1	Escore 2	Escore 3	Escore 4
G2	0	2	9	2	0	5 ³	4 ⁴
G3	3	3	9	6	4	3	2
G4	2 ¹	2 ²	0	3	1	0	0
Total (n)	5	7	18	11	5	8	6
Valor de p	p=0,054			p=0,089			

$$^1)\chi^2=2,666; ^2)\chi^2=1,219; ^3)\chi^2=1,456; ^4)\chi^2=1,472$$

Com relação às expressões de Vimentina e β -catenina, o Teste Exato de Fisher foi significativo reforçando a dependência entre estas variáveis e os grupos tumorais mostrada pela ACM. As associações mais expressivas foram encontradas entre Vimentina Escore 0 e neoplasias benignas e Vimentina Escore 1 e neoplasias metastáticas. Além destas, as demais associações foram entre β -catenina nuclear e carcinomas metastáticos e β -catenina em membrana e neoplasias benignas (Tabela 18).

Tabela 18. Número de amostras em cada grupo para as marcações das proteínas Vimentina e β -catenina.

Grupo	Vimentina			β -catenina		
	Negativo	Escore 1	Escore 2	M	C	N
G2	11 ¹	0	0	8 ³	3	0
G3	6	5	4	4	8	3
G4	0	3 ²	1	0	1	3 ⁴
Total (n)	17	8	5	12	12	6
Valor de p	p=0,0027			p=0,0051		

¹⁾ $\chi^2=3,645$; ²⁾ $\chi^2=2,945$; ³⁾ $\chi^2=3,504$; ⁴⁾ $\chi^2=6,050$

5.4. Expressão gênica

5.4.1. APC (*Adenomatous poliposis coli*)

Como citado anteriormente, devido ao baixo número amostral de carcinomas metastáticos, não foi possível a avaliação destes em separado e, desta forma estas neoplasias foram unidas às do grupo 2 para formar um único grupo de neoplasias malignas.

As expressões dos genes alvo (*APC* e *WNT5A*) em amostras de tecidos mamários com e sem alterações histopatológicas mostrou diferença para expressão do gene *APC* entre os grupos experimentais pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p=0,004$). A expressão deste gene foi significativamente maior entre as mamas normais quando comparadas às alterações mamárias benignas ($p=0,015$) e também entre as mamas normais com relação às neoplasias malignas ($p=0,01$) pelo Teste de Mann Whitney. Não houve diferença entre as neoplasias benignas e malignas pelo Teste de Mann Whitney ($p=0,54$), Figura 11.

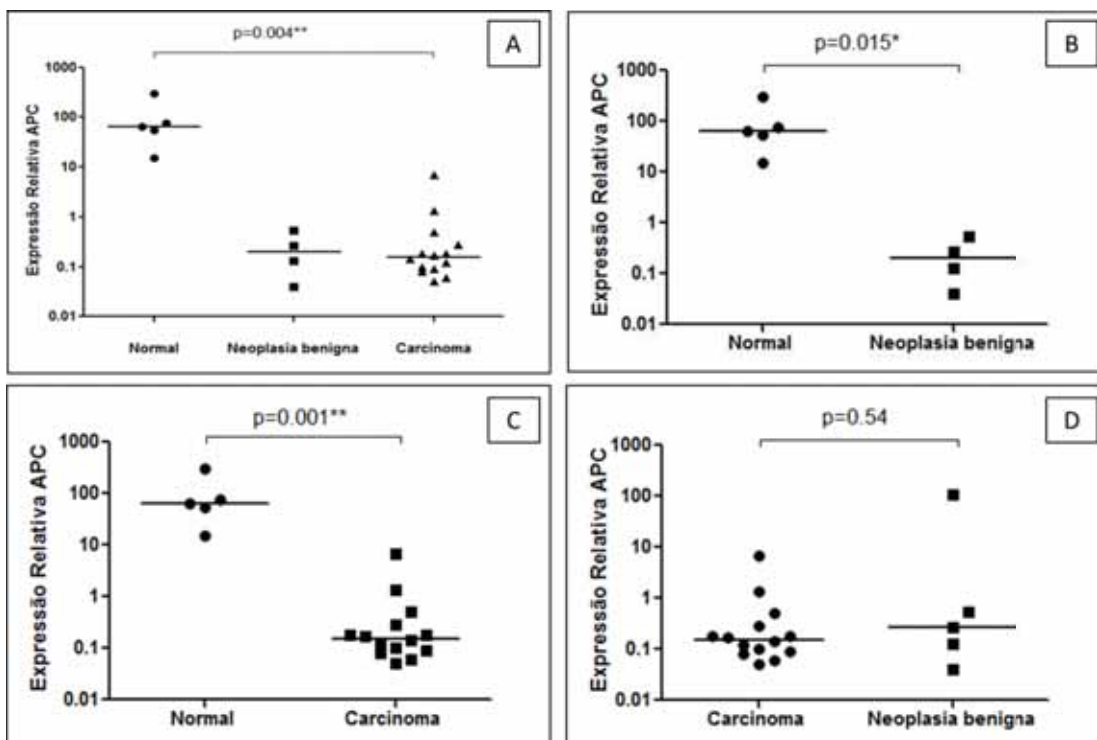


Figura 11. Expressão relativa do gene *APC* entre os grupos (A); Expressão significativamente maior entre as amostras de mama normal quando comparadas às neoplasias benignas (B) e às neoplasias malignas (C); Ausência de diferença entre as neoplasias benignas e malignas (D).

O número amostral de cada grupo, bem como seus respectivos valores de Ct para os genes alvo e endógeno, ΔCt , $\Delta\Delta Ct$ e QR estão apresentados na tabela 19.

Tabela 19. Ciclo de amplificação (Ct) de cada amostra para os genes alvo (*APC*) e endógeno (*ACTB*), diferença entre o Ct da amostra para o gene alvo e endógeno (Δ Ct), diferença entre o Δ Ct da amostra com o Δ Ct do controle positivo ($\Delta\Delta$ Ct) e nível de expressão gênica (QR) de cada uma das amostras dos grupos experimentais.

Grupo	Amostra	Ct do gene alvo (<i>APC</i>)	Ct do gene endógeno (<i>ACTB</i>)	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	QR
1	1	26.99	30.73	-3.74	-5.77	54.57
1	2	26.48	30.7	-4.22	-6.25	76.11
1	3	24.66	30.85	-6.19	-8.22	298.17
1	4	26.04	30	-3.96	-5.99	63.56
1	5	28.37	30.26	-1.89	-3.92	15.14
2	1	33.8	30.86	2.94	0.91	0.53
2	2	35.82	29.3	6.52	4.49	0.04
2	3	34.56	29.6	4.96	2.93	0.13
2	4	33.06	29.15	3.91	1.88	0.27
2	5	24.77	29.5	-4.73	-6.76	108.38
3	1	34.93	29.65	5.28	3.25	0.11
3	2	26.75	30.03	-3.28	-5.31	39.67
3	3	34.13	29.01	5.12	3.09	0.12
3	4	34.18	29.3	4.88	2.85	0.14
3	5	32.9	29.02	3.88	1.85	0.28
3	6	29.13	29.89	-0.76	-2.79	6.92
3	7	34.24	29.74	4.50	2.47	0.18
3	8	35.5	29.3	6.20	4.17	0.06
3	9	35.42	29.67	5.75	3.72	0.08
3	10	35.93	29.56	6.37	4.34	0.05
3	11	35.14	29.7	5.44	3.41	0.09
3	12	34.45	29.88	4.57	2.54	0.17
3	13	33.89	29.37	4.52	2.49	0.18
4	1	32.02	29	3.02	0.99	0.50
4	2	31.79	30.17	1.62	-0.41	1.33

5.4.2. *WNT5A*

Foi verificada diferença da expressão de transcritos do *WNT5A* entre os grupos pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p=0,003$). A expressão deste gene foi significativamente maior entre as amostras de mama normal quando comparadas às neoplasias benignas ($p=0,008$) e aos carcinomas ($p=0,002$) pelo Teste de Mann-Whitney. Não houve diferença significativa para o número

de transcritos do *WNT5A* entre as neoplasias benignas e os carcinomas pelo Teste de Mann Whitney ($p=0,49$) como apresentado na figura 12.

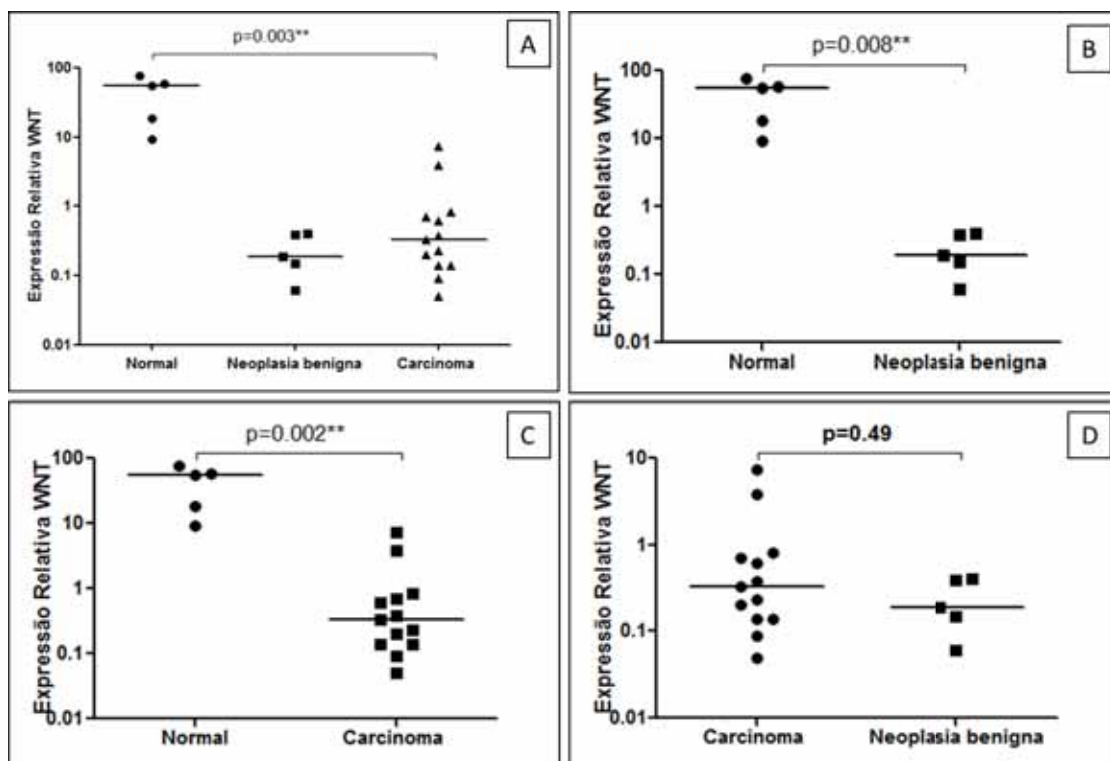


Figura 12. Expressão relativa do gene *WNT5A* entre os grupos (A); Expressão significativamente maior entre as amostras de mama normal quando comparadas às neoplasias benignas (B) e às neoplasias malignas (C); Ausência de diferença entre as neoplasias benignas e malignas (D).

O número de amostras em cada grupo, bem como seus respectivos valores de Ct para os genes alvo e endógeno, ΔCt , $\Delta\Delta Ct$ e QR estão apresentados na tabela 20.

Tabela 20. Ciclo de amplificação (Ct) de cada amostra para os genes alvo (*WNT5A*) e endógeno (*ACTB*), diferença entre o Ct da amostra para o gene alvo e endógeno (Δ Ct), diferença entre o Δ Ct da amostra com o Δ Ct do controle positivo ($\Delta\Delta$ Ct) e nível de expressão gênica (QR) de cada uma das amostras dos grupos experimentais.

Grupo	Amostra	Ct do gene alvo (<i>WNT5A</i>)	Ct do gene endógeno (<i>ACTB</i>)	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	QR
1	1	27.09	30.73	-3.64	-5.79	55.33
1	2	28.63	30.7	-2.07	-4.22	18.64
1	3	29.77	30.85	-1.08	-3.23	9.38
1	4	26.78	30.88	-4.10	-6.25	76.11
1	5	26.26	30	-3.74	-5.89	59.30
2	1	35.93	31	4.93	2.78	0.15
2	2	33.86	29.3	4.56	2.41	0.19
2	3	33.08	29.6	3.48	1.33	0.40
2	4	35.34	29.15	6.19	4.04	0.06
2	5	33.36	29.85	3.51	1.36	0.39
3	1	34.34	29.36	4.98	2.83	0.14
3	2	34.15	29.65	4.50	2.35	0.20
3	3	29.3	30.03	-0.73	-2.88	7.36
3	4	34.63	29.01	5.62	3.47	0.09
3	5	32.17	29.3	2.87	0.72	0.61
3	6	31.69	29.02	2.67	0.52	0.70
3	7	34.5	30.77	3.73	1.58	0.33
3	8	33.6	31.16	2.44	0.29	0.82
3	9	33.2	29.67	3.53	1.38	0.38
3	10	33.8	29.56	4.24	2.09	0.23
3	11	35.71	29.37	6.34	4.19	0.05
4	1	27.12	29	-1.88	-4.03	16.34
4	2	30.08	29.89	0.19	-1.96	3.89
4	3	34.03	29	5.03	2.88	0.14

5.5. Análise da sobrevida global das pacientes

Para avaliar o valor prognóstico da expressão protéica dos marcadores e dos genes do presente estudo foi avaliada a sobrevida em número de dias das pacientes com relação aos escores de marcação do APC, Wnt5a, E-caderina, Citoceratina, Vimentina e também quanto à localização celular da β -catenina, separadas entre as neoplasias com e sem metástase. As cadelas foram acompanhadas por um período mínimo de 322 e máximo de 620 dias.

Não houve diferença significativa entre os escores de marcação das proteínas APC e Wnt5a para a sobrevida global das pacientes (Figuras 13 e 14).

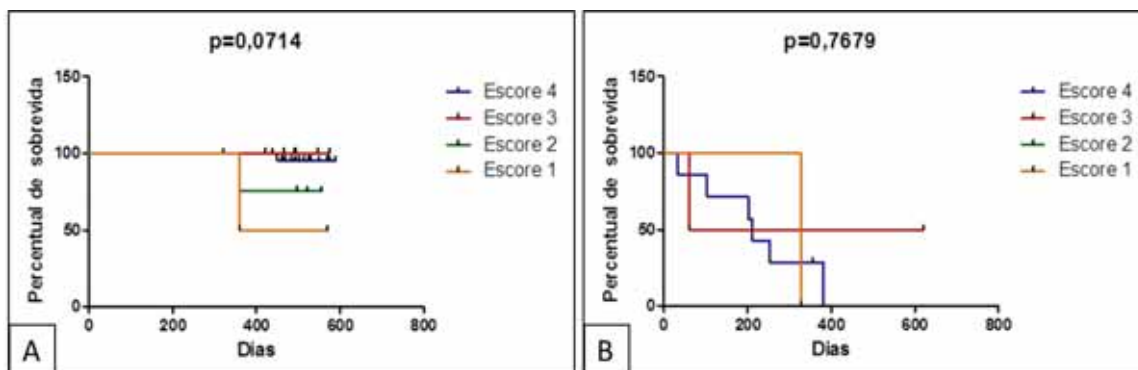


Figura 13. Análise da sobrevida global das pacientes (em dias) com relação ao escore de marcação do APC. (A) Ausência de diferença significativa entre os carcinomas não-metastáticos, G3 e (B) e entre os carcinomas metastáticos, G4. Log-rank Test, $p < 0,05$.

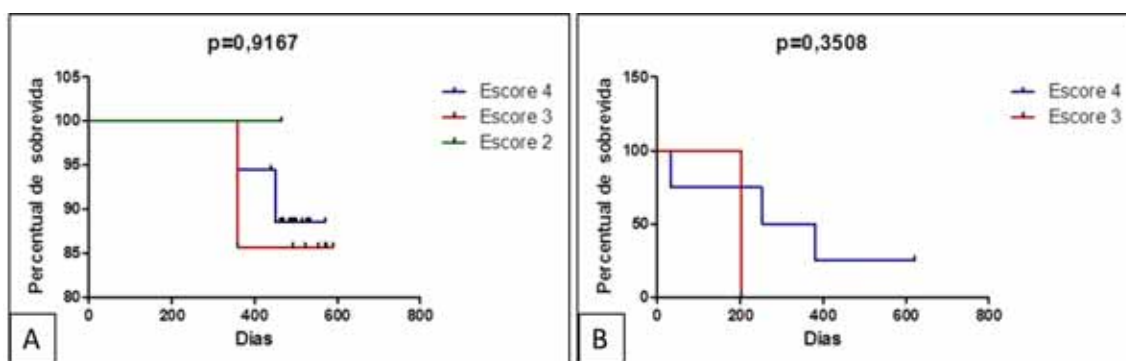


Figura 14. Análise da sobrevida global das pacientes (em dias) com relação ao escore de marcação do Wnt5a. (A) Ausência de diferença significativa entre os carcinomas não-metastáticos, G3 e (B) e entre os carcinomas metastáticos, G4. Log-rank Test, $p < 0,05$.

Não houve diferença significativa entre os escores de marcação das proteínas E-caderina e Citoceratina para com a sobrevida global das pacientes envolvidas neste estudo (Figuras 15 e 16).

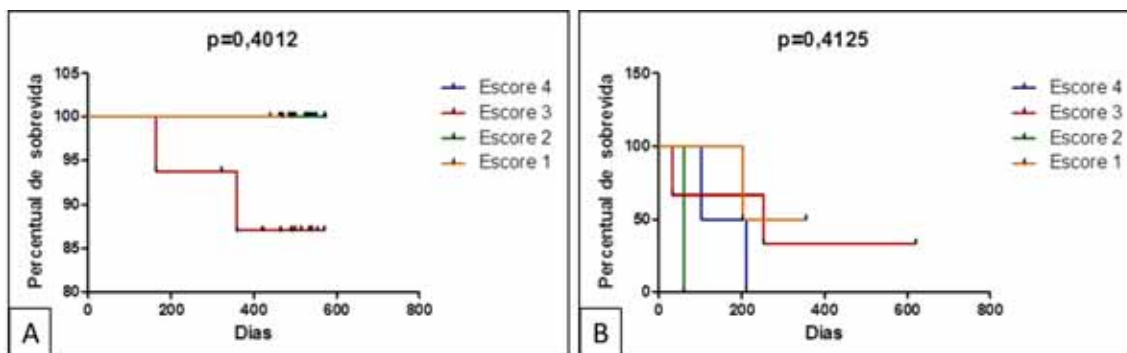


Figura 15. Análise da sobrevida global das pacientes (em dias) com relação ao escore de marcação da E-caderina. (A) Ausência de diferença significativa entre os carcinomas não-metastáticos, G3 e (B) e entre os carcinomas metastáticos, G4. Log-rank Test, $p < 0,05$.

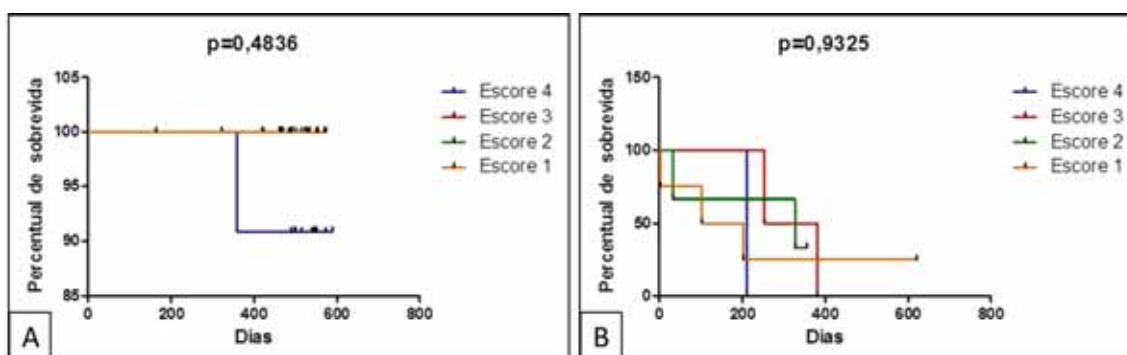


Figura 16. Análise da sobrevida global das pacientes (em dias) com relação ao escore de marcação da Citoceratina. (A) Ausência de diferença significativa entre os carcinomas não-metastáticos, G3 e (B) e entre os carcinomas metastáticos, G4. Log-rank Test, $p < 0,05$.

Não houve diferença entre as diferentes localizações da marcação da β -catenina e a sobrevida global das pacientes (Figura 17).

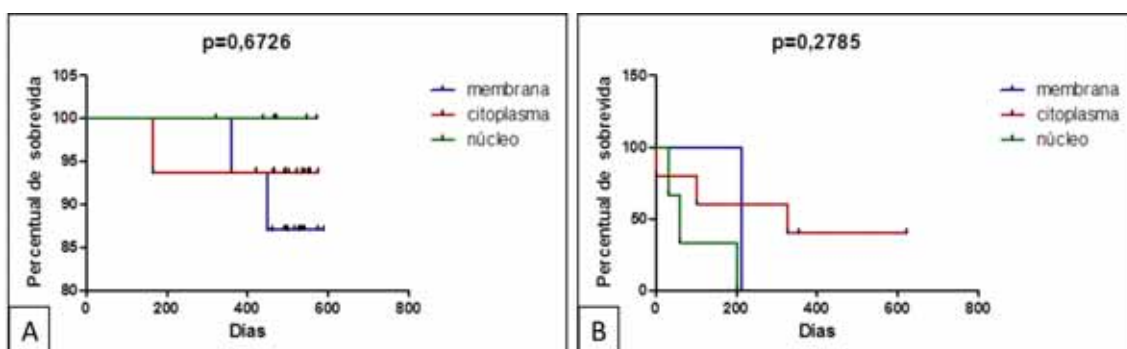


Figura 17. Análise da sobrevida global das pacientes (em dias) com relação a localização da marcação da β -catenina. (A) Ausência de diferença significativa entre os carcinomas não-metastáticos, G3 e (B) e entre os carcinomas metastáticos, G4. Log-rank Test, $p < 0,05$.

Para os escores de marcação da vimentina houve diferença significativa entre as amostras do G4, nos carcinomas metastáticos, porém não houve diferença entre as amostras do G3 (Figura 18).

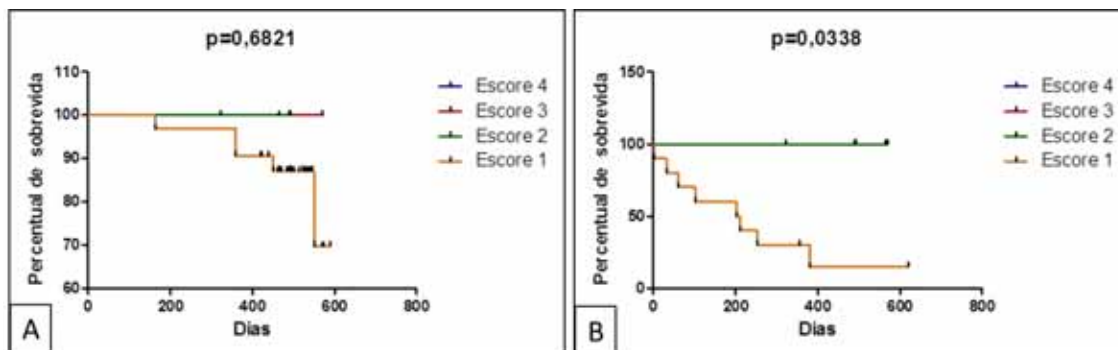


Figura 18. Análise da sobrevida global das pacientes (em dias) com relação ao escore de marcação da vimentina. (A) Ausência de diferença significativa entre os carcinomas não-metastáticos, G3 e (B) diferença significativa entre os carcinomas metastáticos, G4. Log-rank Test, $p < 0,05$.

Não houve diferença para a sobrevida global das pacientes e o nível de RNAm de cada um dos genes avaliados neste estudo (Figura 19).

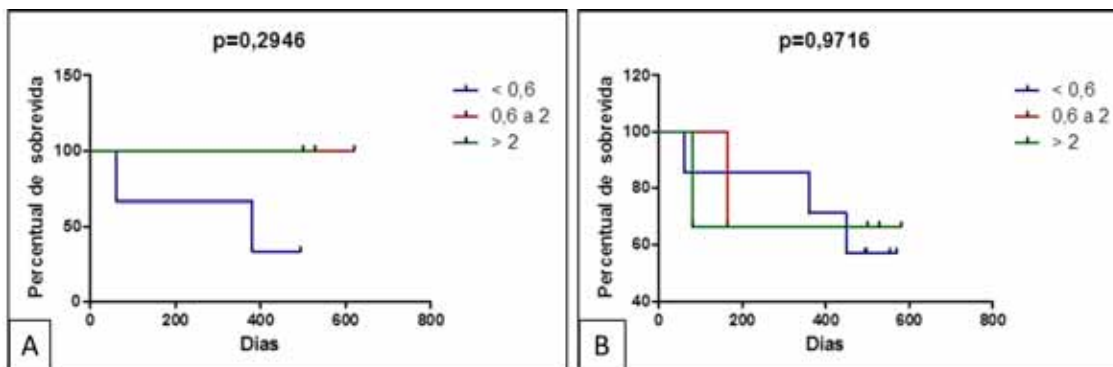


Figura 19. Análise da sobrevida global das pacientes (em dias). (A) Sobrevida global com relação ao nível de RNAm do APC para QR < 0,6 (gene negativamente regulado, QR entre 0,6 e 2 (expressão normal) e QR > 2 (gene positivamente regulado); (B) Sobrevida global com relação ao nível de RNAm do WNT5A. Os valores de QR são os mesmos para o gene APC. Log-rank Test, $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

Apesar de terem sido observados, neste estudo, animais com neoplasias mamárias com idades entre 5 e 16 anos, tal como descrito por Lana et al. (2007) e De Nardi et al. (2008), as cadelas na faixa etária de 7 a 12 anos (média de 10 anos) foram as mais acometidas pelas neoplasias mamárias.

Com relação às raças dos animais a maioria eram animais SRD, seguida de Poodle e Cocker Spaniel, além de outras em menor quantidade, similar ao observado por Horta et al. (2014). Este resultado pode ter sido influenciado pelo fato de que grande parte dos cães atendidos no Hospital Escola da UNESP, campus de Jaboticabal, local onde foi desenvolvido este estudo, são usualmente animais SRD, além de, segundo Zuccari (1999), haver predomínio dos cães mestiços em nosso país como um todo. Soma-se a isto o recente avanço das campanhas de adoção que estão popularizando ainda mais os animais SRD.

No entanto, Sorenmo (2003) relata que algumas raças possuem um risco mais elevado para o desenvolvimento de neoplasias mamárias, citando o Poodle como raça predisposta, embora, segundo a própria autora, as raças possam variar de acordo com o estudo e a região geográfica. Além disto, a mesma autora sugere que o fato de certas raças serem mais predispostas pode revelar um possível envolvimento genético na etiologia da neoplasia mamária em cadelas.

A expressão do gene supressor tumoral *APC* já foi extensivamente estudada em razão do seu papel nas neoplasias colorretais em humanos (GRODEN et al., 1991; KINZLER et al., 1991; NARAYAN; ROY, 2003; KWONG; DOVE, 2009). Além das mutações e perda de heterozigose vista nestes tumores, o *APC* é um componente essencial da via do Wnt/ β -catenina já que este gene codifica uma proteína responsável pela degradação da β -catenina, impedindo seu deslocamento ao núcleo para agir como um fator transcricional, fato incriminado na tumorigênese de vários neoplasmas.

Os níveis de RNAm para o *APC* foram significativamente maiores entre as mamas normais quando comparadas às neoplasias benignas e malignas. Embora não haja descrição do padrão de expressão deste gene em neoplasias

mamárias caninas, estudos em linhagens celulares humanas mostraram que não houve redução significativa no nível de RNAm do APC do tecido mamário normal para as linhagens neoplásicas (YANG et al., 2006).

A maioria dos estudos com relação à este gene concentram-se na avaliação de suas mutações e metilações frequentemente encontradas no câncer colorretal e de mama humanos (PROSPERI; GOSS, 2010; ODENWALD; PROSPERI; GOSS, 2013). Youmans et al. (2012) mostraram que o APC foi o gene mais frequentemente mutado em adenomas e carcinomas colorretais caninos dentre 11 genes avaliados. Tal fato ressalta o papel do APC como um supressor tumoral uma vez que as alterações devem ocorrer em estados precoces da carcinogênese para promover o crescimento tumoral.

O presente estudo não objetivou avaliar as alterações estruturais ou epigenéticas do gene *APC*, porém, é possível suspeitar que elas ocorram também entre as neoplasias mamárias caninas. Muitos estudos recentes tem demonstrado a elevada similaridade entre os carcinomas de mama da cadela e da mulher no que diz respeito à aparência histológica, comportamento biológico, além da genética tumoral e dos alvos moleculares.

Van der Auwera et al. (2008) avaliaram as metilações no gene APC nos carcinomas inflamatórios e não inflamatórios da mama de mulheres e observaram que os níveis de RNAm e de proteína nestes tumores não foram associados aos níveis de metilação deste mesmo gene.

Como as metilações e mutações podem interferir na transcrição do DNA em RNA, uma delas ou ambas podem estar ocorrendo e interferindo nos níveis de RNAm do APC aqui observados, no entanto, estas metilações podem atingir apenas um alelo fazendo com que o outro mantenha os níveis normais de transcrição. Ainda, estas alterações podem não ser homogêneas em todo o tumor, o que pode manter os níveis de RNAm normais no resultado da RT-qPCR. Assim, testes específicos para a detecção de mutações e metilações são necessários para atestar a sua ocorrência nas neoplasias mamárias caninas. Tal fato abre espaço para novas linhas de pesquisa com relação ao gene *APC* nestes tumores visto sua alta incidência entre as fêmeas da espécie canina e também o seu valor como modelo experimental para o câncer de mama em mulheres.

Com relação à expressão da proteína codificada pelo gene APC, esta foi significativamente menor entre as neoplasias de grau III quando comparadas às de grau I e II, corroborando os achados de Restucci et al. (2007) Estes autores observaram que nas neoplasias mamárias caninas de grau III o APC foi fracamente expresso por cerca de 20% das células.

Não houve diferença entre as neoplasias benignas e malignas (com e sem metástase), tanto para escore como para intensidade de marcação. Embora não tenha sido realizada a correlação entre as expressões gênica e proteica do APC no presente estudo, ambas as expressões seguiram o mesmo padrão, ou seja, sem diferença entre as neoplasias benignas e malignas. Tal fato ressalta o papel de supressor tumoral do APC e mostra que alterações na sua expressão, tanto gênica como protéica, devem ocorrer em estados iniciais da carcinogênese, já nas neoplasias benignas, para promover o crescimento tumoral.

Diferente do observado para a expressão do gene APC, não houve diferença significativa em sua expressão protéica das mamas normais para os demais grupos. Todavia, Restucci et al. (2009) observaram redução progressiva na expressão proteica do APC das amostras não neoplásicas para os carcinomas colorretais caninos pobremente diferenciados, o que difere do aqui observado.

As amostras de mamas normais utilizadas neste estudo foram coletadas de animais eutanasiados por terem diagnóstico de Leishmaniose visceral canina. O motivo para a escolha destes animais foi a facilidade da obtenção de um número ideal de amostras para as análises de RNAm, uma vez que estas foram coletadas imediatamente após a eutanásia do animal, preservando assim a qualidade do material genético. Diante desta situação, não foram encontrados trabalhos na literatura que indicassem a interferência da *Leishmania spp* com os genes e as proteínas pesquisadas neste estudo.

O papel do gene *WNT5A* na carcinogênese é bastante controverso. A literatura mostra que o mesmo pode agir tanto como oncogene como supressor tumoral dependendo do seu contexto de expressão (LERIS et al., 2005; ROARTY et al., 2009; BAUER et al., 2013).

Este estudo é pioneiro na avaliação da expressão do gene *WNT5A* em neoplasias mamárias caninas. A expressão deste gene entre os tecidos

neoplásicos da mama canina foi significativamente menor quando comparada às mamas normais, semelhante ao observado em estudos prévios com neoplasias mamárias humanas e também em linhagens celulares de tumores mamários (LERIS et al., 2005; BENHAJ; AKCALI; OZTURK, 2006).

Roarty et al. (2009) demonstraram com o uso de células epiteliais oriundas de animais transgênicos *Wnt5a*^{-/-}, a presença de β -catenina intracelular e seu acúmulo no núcleo, mesmo na ausência do *Wnt5a*. Eles sugeriram que a expressão do *Wnt5a* é regulada pelo TGF β , com potencial de inibir a via de sinalização do Wnt/ β -catenina e que o mesmo é necessário para a maioria dos efeitos do TGF β no desenvolvimento da glândula mamária. Ainda, a ausência do *Wnt5a* promoveria a estabilização da β -catenina intracelular e redirecionaria a formação de neoplasias através desta via de sinalização, levantando a participação do *Wnt5a* como um antagonista da via do Wnt/ β -catenina, visto que na sua total ausência o crescimento tumoral foi até duas vezes maior.

O *Wnt5a* é capaz de antagonizar a via do Wnt/ β -catenina também em outros tipos celulares. Pourreyron et al. (2012) demonstraram que o aumento da expressão do *Wnt5a* nos carcinomas espinocelulares da pele de humanos foi acompanhada pela repressão da via canônica de sinalização do Wnt/ β -catenina.

Assim, estes achados são válidos para justificar a elevada expressão deste gene entre as mamas normais aqui observados e, neste contexto, o gene *WNT5A* poderia estar agindo como um supressor tumoral e suprimindo a ativação da via de sinalização do Wnt/ β -catenina.

O gene *WNT5A* codifica uma das 19 proteínas que são membros da família de ligantes WNT que, por exercerem diferentes funções no organismo, estas aparentemente podem modular tanto a via canônica de sinalização do Wnt/ β -catenina, bem como várias outras vias não-canônicas ou β -catenina independentes a depender do repertório de receptores disponíveis (LERIS et al., 2005; MIKELS; NUSSE, 2006; BAUER et al., 2013).

Apesar de não ter sido observada diferença para o escore de marcação da proteína entre os grupos, a intensidade de marcação do *Wnt5a* foi

significativamente maior entre os carcinomas quando comparados às neoplasias benignas, sem diferença entre as neoplasias com e sem metástase.

Nas neoplasias prostáticas humanas, a expressão proteica do Wnt5a também foi significativamente menor nas neoplasias benignas quando comparadas às malignas, sendo que pacientes com maiores expressões de Wnt5a apresentaram melhor prognóstico no que diz respeito à recidiva pela mensuração do PSA (antígeno prostático específico) sérico (KHAJA et al., 2011).

Opostamente, nos carcinomas mamários ductais invasivos da mulher, a perda da expressão proteica do Wnt5a foi significativamente associada com tumores de pior prognóstico, que possuíam elevado grau histopatológico e ausência de receptores de estrógeno e progesterona. No entanto, esta baixa expressão não foi relacionada com metástase em linfonodo (JÖNSSON et al., 2002).

O mesmo grupo de pesquisa (JÖNSSON et al., 2002) observou associação entre baixa expressão proteica do Wnt5a e fatores prognósticos negativos apenas entre os carcinomas ductais invasivos, sem associação entre os lobulares invasivos. Como, neste estudo, não foram selecionados tipos histológicos específicos, futuros estudos envolvendo apenas um tipo histológico ou diversos tipos, porém separados em grupos com elevado número amostral podem trazer à tona as diferenças na expressão desta proteína e a suas semelhanças ou diferenças com os tipos histológicos do carcinoma de mama da mulher.

O delineamento experimental de Khaja et al. (2011) se assemelha ao do presente estudo pois comparou a expressão da proteína Wnt5a apenas entre lesões benignas e malignas da próstata, sem contudo considerar o tipo histológico do tumor, obtendo resultados semelhantes aos aqui apresentados.

Outra situação a ressaltar foi a descoberta recente de que o gene *WNT5A* codifica duas isoformas da proteína Wnt5a e que, apesar das diferenças nas porções amino-terminais de ambas, as duas proteínas potencialmente antagonizam a via de sinalização do Wnt/ β -catenina e são diferencialmente expressas no carcinoma mamário humano (BAUER et al., 2013). Não é possível afirmar que o mesmo aconteça entre as neoplasias mamárias caninas devido à falta de estudos acerca deste tema em medicina

veterinária, o que dificulta a comparação dos resultados. Ademais o anticorpo utilizado neste estudo para a marcação da proteína não é específico para uma ou outra isoforma, sendo que uma delas ou ambas as formas podem estar sendo marcadas.

Adicionalmente, diversos pesquisadores já afirmaram o papel controverso como supressor tumoral e oncogene do Wnt5a. Aparentemente sua função é dependente do seu contexto de expressão e do repertório de receptores disponíveis. No presente estudo, não foram avaliados os receptores do Wnt, tornando difícil a avaliação do contexto de expressão desta proteína.

A maior expressão deste gene entre as mamas normais leva a crer que ele atue como um gene supressor tumoral na mama canina, potencialmente agindo como antagonista da via do Wnt/ β -catenina, uma vez que nas mamas normais a marcação para β -catenina foi observada apenas na membrana celular. No entanto, a ausência de diferença significativa entre os grupos para a sobrevida global das pacientes, com relação às expressões gênica e proteica do Wnt5a, justifica a realização de estudos envolvendo um maior número de pacientes para atestar seu funcionamento como supressor tumoral. O fato de não ter havido diferença para a expressão deste gene entre neoplasias benignas e malignas mostra que, semelhante ao gene *APC*, sua redução na expressão deva ser um evento que ocorre precocemente na carcinogênese e se mantenha durante o processo para facilitar a proliferação e migração celular.

A β -catenina possui importante função na regulação do desenvolvimento da glândula mamária e também em sua tumorigênese. Na membrana plasmática, esta proteína se acopla às caderinas promovendo a manutenção da integridade do epitélio mamário. No núcleo, ela regula a expressão de alguns genes que, dentre outras consequências, induzem a transição epitélio-mesênquima, predispondo ao aparecimento do câncer (INCASSATI et al., 2010).

Como a β -catenina possui papel central na via do Wnt/ β -catenina, sua estabilização e consequentes acumulação no citoplasma e deslocamento ao núcleo são características da ativação desta via de sinalização. Neste estudo, a marcação em membrana para β -catenina foi significativamente maior entre as neoplasias benignas quando comparadas aos carcinomas com e sem metástase. Houve ainda diferença significativa para a localização desta

proteína entre os carcinomas metastáticos e não metastáticos. Restucci et al. (2007) também observaram maior expressão de β -catenina na membrana de neoplasias mamárias caninas benignas quando comparadas às demais, porém eles não avaliaram a diferença entre carcinomas com e sem metástase.

Da mesma forma, entre os carcinomas do subtipo basal, o tipo mais agressivo de neoplasias mamárias nas mulheres, Khramtsov et al. (2010) encontraram maior presença de β -catenina citoplasmática e nuclear entre estes tumores e uma redução progressiva da marcação em membrana para esta proteína conforme a progressão tumoral.

Outro estudo também mostrou predominância de marcação citoplasmática em amostras de osteossarcomas caninos, neoplasia altamente maligna na espécie, entretanto este padrão de marcação não se relacionou ao tempo de sobrevida das pacientes (STEIN et al., 2011). Similarmente, no presente estudo, a marcação citoplasmática foi a mais frequente entre as neoplasias malignas, tendo sido observada em 42% dos casos (23/55), seguido por 37,5% (21/55) de marcação em membrana e 20,5% de localização nuclear (11/55) e, da mesma forma este padrão de marcação não foi relacionado ao tempo de sobrevida global das pacientes. Estes autores afirmam que a ausência de relação com o tempo de sobrevida das pacientes pode ser justificado pelo baixo número amostral do estudo e, da mesma forma, o mesmo pode ter aqui ocorrido.

Segundo os presentes resultados, apesar da não significância entre a localização da β -catenina e a sobrevida global das pacientes, o achado de que a localização foi relacionada ao grupo tumoral, abre perspectivas para a investigação desta proteína como um marcador prognóstico bastante acessível para uso em neoplasias mamárias caninas, uma vez que atualmente a disponibilidade de anticorpos e a acessibilidade às análises imuno-histoquímicas já são uma realidade na medicina veterinária.

Por sua vez, a E-caderina pode ser considerada um regulador negativo da via de sinalização do Wnt/ β -catenina e conseqüentemente da transição epitélio-mesênquima por capturar a β -catenina ao complexo de adesão celular. Adicionalmente, além de participar desta via de sinalização, a E-caderina é peça fundamental na adesão célula-célula e sua reduzida expressão protéica

nas mais variadas neoplasias humanas e caninas já foi demonstrada por diversos autores (RESTUCCI et al., 2009; HONG et al., 2011; GALERA-RUIZ et al., 2011; HASHIMOTO et al., 2012).

A marcação de membrana da E-caderina foi significativamente maior entre as neoplasias benignas em relação aos carcinomas metastáticos e não metastáticos, porém sem diferença entre estes últimos. Similarmente, Gama et al. (2008) observaram diminuição da expressão desta proteína, acompanhada pelo aumento do grau histopatológico e da diminuição da sobrevida global nas pacientes. Ademais estes mesmos autores observaram diferença para a expressão desta proteína entre mamas normais e neoplasias mamárias malignas. Apesar de um maior número amostral, no presente estudo não foi observada diferença na sobrevida global e entre os diferentes graus de malignidade para a expressão de E-caderina. Também não foi observada diferença para expressão desta proteína nas mamas normais, o que poderia justificar-se pelo número amostral de mamas normais aqui utilizadas (n=4), já que problemas na fixação do material às lâminas para a realização das análises de imuno-histoquímica impediram a utilização de um maior número amostral. Tal fato deveu-se à elevada quantidade de gordura presente nas amostras de mamas normais que, mesmo com o uso de lâminas carregadas, não apresentaram boa aderência ao material. Entretanto, Gama et al. (2008) não informam o número de mamas normais utilizadas, dificultando a comparação dos resultados.

A associação entre metástase em linfonodo e baixa expressão de E-caderina foi demonstrada por estudos prévios em neoplasias mamárias caninas (DE MATOS et al., 2007; GAMA et al., 2008), diferentemente do aqui observado já que não houve diferença para a expressão desta proteína entre as neoplasias com e sem metástase. De acordo com Chao, Shepard e Wells (2010), a perda da expressão proteica da E-caderina é um pré-requisito para a disseminação metastática e pode ser causada por uma temporária diminuição em sua expressão durante uma fase precoce do processo metastático. No entanto, quando concluído o processo estas células podem voltar a expressar E-caderina, inclusive nos seus sítios de metástase, o que poderia justificar a ausência de diferença entre os carcinomas metastáticos e não metastáticos deste estudo. Adicionalmente, o caráter temporário desta diminuição citado

pelos autores dificulta determinar, através de análise imuno-histoquímica, em qual etapa exatamente do processo metastático esta diminuição poderia ocorrer, evidenciando apenas a associação entre diminuição da expressão de E-caderina e neoplasias malignas.

Em somatória ao caráter temporário desta diminuição da expressão, pesquisas recentes têm levantado a hipótese de a E-caderina exercer uma função paradoxal na progressão tumoral. Além de mediar a adesão física entre as células para facilitar a colonização metastática, a expressão de E-caderina também é associada à sobrevivência celular. A expressão desta proteína em cultivos celulares de hepatócitos os protege da morte celular mediada por *anoikis* de uma forma caspase-independente (LUEBKE-WHEELER et al., 2009), desta forma, as células de neoplasias agressivas ou metastáticas seriam beneficiadas pela expressão de E-caderina. Estudos em tipos de carcinomas, inclusive os inflamatórios da mama, têm mostrado que nestes tumores a perda de E-caderina nem sempre está associada com aumento do caráter invasivo destas neoplasias e que a manutenção da expressão não suprime a invasão e a metástase (COLPAERT et al., 2003; LEWIS-TUFFIN et al., 2010; CHU et al., 2013).

Assim, atualmente, outras funções para esta proteína na progressão tumoral têm sido observadas (RODRIGUEZ; LEWIS-TUFFIN; ANASTASIADIS, 2012). Neste contexto, alguns autores observaram a presença de E-caderina no citoplasma das células epiteliais tumorais de neoplasias mamárias caninas (SARLI et al., 2004; BRUNETTI et al., 2003; GAMA et al., 2008). Apesar de a marcação citoplasmática estar prevista na bula do anticorpo primário para E-caderina aqui utilizado, este padrão de marcação foi maior entre as neoplasias malignas (com e sem metástase) quando comparadas às neoplasias benignas e mamas normais. Da mesma forma, Sarli et al. (2004) observaram maior frequência de marcação citoplasmática entre as neoplasias malignas quando comparadas às mamas normais e às lesões benignas da glândula mamária canina e concluíram que esta localização anormal era causada pela perda da ligação entre os domínios transmembrana e citoplasmático desta proteína, que afetaria o correta localização em membrana e ocasionaria a diminuição da adesão celular.

Nos carcinomas nasofaríngeais de humanos, Luo et al. (2012) observaram elevado percentual de neoplasias malignas com marcação citoplasmática para E-caderina (37,7% dos casos), sendo que este padrão de marcação foi fortemente associado à presença de metástase em linfonodo e elevado grau histopatológico. Neste estudo o percentual de amostras com marcação citoplasmática para E-caderina foi de 47,7% dos casos, porém, apesar de ter havido diferença entre os grupos para a localização anormal desta proteína, não houve diferença significativa entre os graus de malignidade.

Em uma das vias não canônicas do Wnt (Wnt/Ca²⁺), importante para migração celular durante o desenvolvimento embrionário, quando o Wnt se liga aos seus receptores de membrana é desencadeada uma cascata de ações que leva à liberação de cálcio do armazenamento intracelular (CLARK; NOURSE; COOPER, 2012). O aumento dos níveis intracelulares de cálcio induz a clivagem da E-caderina coordenada pela Presenilina-1 (PS-1). Esta clivagem ocorre na interface entre a membrana e o citoplasma, desfazendo o complexo de adesão celular e liberando tanto a porção citosólica da E-caderina como a β -catenina para o citoplasma (MARAMBAUD et al., 2002). Além disto, Thrasivoulou, Millar e Ahmed (2013) demonstraram que o aumento de cálcio intracelular facilita a passagem da β -catenina pela membrana nuclear levantando a hipótese da interdependência entre as vias canônica e não-canônica do Wnt.

Assim é possível que o anticorpo esteja marcando esta porção da proteína livre no citoplasma. De qualquer forma não é possível afirmar se esta porção faz parte de alguma via de sinalização semelhante à β -catenina, porém a diferença na marcação citoplasmática desta proteína entre as neoplasias malignas abre espaço para investigações quanto ao papel prognóstico desta localização da E-caderina.

Também em relação à migração celular, as citoqueratinas são proteínas importantes na manutenção da polaridade ápico-basal das células epiteliais e, quando da ocorrência da transição epitélio-mesênquima, estas são substituídas por filamentos de vimentina que facilitam a migração celular e a disseminação metastática (MICALIZZI; FARABAUGH; FORD, 2010). Ainda, citoqueratinas

são marcadores específicos de células epiteliais bastante utilizados na rotina diagnóstica para diferenciação tumoral (PAINTER; CLAYTON; HERBERT, 2010). Frente a isto é esperado que quanto mais indiferenciado for um carcinoma, menor será a expressão de citoqueratina, além disto, a baixa expressão de citoqueratinas pode indicar uma célula em EMT.

De maneira semelhante, os filamentos de vimentina são marcas registradas de uma célula mesenquimal, sendo esta proteína também bastante utilizada para diagnóstico e diferenciação celular. Entretanto, em alguns tumores, em particular nos carcinomas de mama, a vimentina é co-expressa com as queratinas, apresentando assim um fenótipo indiferenciado ou de interconversão entre epitelial e mesenquimal (HENDRIX et al., 1997).

No presente estudo, a intensidade da marcação da citoqueratina foi significativamente menor nos carcinomas metastáticos quando comparados aos não metastáticos e às neoplasias benignas. Somando-se a isso, o escore de marcação desta proteína foi significativamente maior nas neoplasias de grau I quando comparadas aos graus II e III, mostrando redução progressiva na intensidade desta proteína das neoplasias benignas para as demais e também entre os graus de malignidade, acompanhando o processo de indiferenciação celular. Estes resultados mostram a importância da utilização das citoqueratinas não só como ferramenta diagnóstica, mas também como marcador prognóstico, de acordo com o exposto por Karantza (2011) que ressalta a importância do uso das citoqueratinas como auxiliares na determinação do prognóstico das mais diversas neoplasias.

A expressão de vimentina nas células epiteliais foi significativamente maior entre as neoplasias malignas (com e sem metástase) quando comparadas às neoplasias benignas. Estas últimas apresentaram uma única amostra positiva para vimentina, porém de baixo escore, sendo que as amostras restantes deste grupo foram negativas (n=22). Similarmente, Calaf et al. (2014) demonstraram que a expressão de vimentina foi negativa nas hiperplasias ductais e lobulares e nos carcinomas ductais não invasivos da mama da mulher. Em contraste, esta expressão foi positiva nas amostras de neoplasias mamárias com características mais agressivas e foi detectada em 21% dos casos avaliados. Aqui a porcentagem de amostras positivas para vimentina foi cerca de 50% dos casos. Corroborando estes resultados, outros

autores já demonstraram a associação entre a expressão de vimentina e carcinomas mamários mais agressivos (HENDRIX et al., 1997; KUSINSKA et al., 2009).

No presente estudo a sobrevida global das pacientes com escore 1 de marcação no grupo das neoplasias metastáticas foi significativamente menor que a das pacientes com os demais escores, discordando do observado por Kusinska et al. (2009), já que estes autores não conseguiram estabelecer relação entre a expressão de vimentina e a sobrevida global das pacientes com câncer de mama, mesmo avaliando um número amostral superior ao aqui utilizado.

A análise multivariada foi utilizada com o objetivo de avaliar, através da Análise de Correspondência Múltipla (ACM), a associação entre os marcadores e os grupos experimentais e o possível estabelecimento do fenótipo de EMT. Assim, as neoplasias benignas foram fortemente associadas à presença de β -catenina em membrana, vimentina negativa, citoceratina escore 3 e 4 e Wnt5a escore 2. Os carcinomas não metastáticos foram associados apenas à APC escore 2 e os carcinomas metastáticos foram fortemente associados à presença de β -catenina nuclear, vimentina escore 1, além de E-caderina escores 1 e 3.

Nemeth et al. (2007) afirmam que a presença de β -catenina não é esperada sem a ativação da via canônica do Wnt/ β -catenina, indicando assim a ativação desta via entre os carcinomas mamários metastáticos da cadela. Na ativação da via do Wnt/ β -catenina, a perda da expressão do APC é responsável pelo acúmulo citoplasmático de β -catenina e seu consequente deslocamento ao núcleo. Assim, a diminuição da expressão do APC foi identificada entre os carcinomas não metastáticos e a β -catenina nuclear aparece já atuando como um fator transcricional no núcleo entre as neoplasias metastáticas.

Como citado anteriormente, a ativação aberrante da via do Wnt/ β -catenina leva à indução da transição epitélio-mesênquima. O fenótipo de EMT, que é caracterizado pela perda dos marcadores epiteliais e a aquisição de vimentina também foi aqui demonstrado, uma vez que as neoplasias benignas

apresentaram maior expressão de citoceratina e os carcinomas metastáticos se associaram à positividade para vimentina.

A expressão de E-caderina também tem relação com o fenótipo de EMT. Neste estudo a associação entre E-caderina escore 4 e neoplasias benignas foi positiva, porém de fraca intensidade ($\chi^2 < 1,0$). Os carcinomas metastáticos apresentaram forte associação com E-caderina escore 1 e 3. Os resultados matemáticos mostram que a associação entre estes carcinomas e o baixo escore de E-caderina foi ainda mais forte que a associação com o escore 3. Por outro lado, foi aqui mencionada a recente investigação da expressão da E-caderina em tumores mais agressivos (COLPAERT et al., 2003), visto que muitos destes não apresentam diminuição da expressão desta proteína. O achado de a associação entre neoplasias metastáticas e E-caderina escore 3 ter sido mais forte do que a associação entre neoplasias benignas e E-caderina escore 4, mostra que nem sempre tumores agressivos vão apresentar perda ou diminuição da expressão desta proteína. Entretanto, mais estudos neste tema são necessários para compreender melhor o comportamento desta proteína na progressão destas neoplasias.

A única associação observada para o Wnt5a, foi com relação à marcação de escore 2 para esta proteína e o grupo de neoplasias benignas. Na análise univariada dos dados, a intensidade de marcação para esta proteína já havia se mostrado menor entre as amostras de neoplasias benignas, porém os escores de marcação não haviam apresentado diferença entre os grupos. Esta associação reforça o exposto sobre os achados da expressão desta proteína e as lesões benignas e malignas da próstata humana (KHAJA et al., 2011). Além disto, maiores escores de marcação para o Wnt5a (escores 3 ou 4) não apresentaram associações com os demais grupos, e, pelo mapa perceptual é possível observar que estas variáveis encontram-se bem próximas do eixo central. Esta localização no mapa perceptual, além de mostrar que estas variáveis não estão associadas à nenhuma categoria, deixa claro também que provavelmente elas não estejam envolvidas no fenótipo de EMT aqui identificado e na ativação da via do Wnt/ β -catenina, demonstrada pela presença de β -catenina nuclear.

A ativação aberrante da via do Wnt/ β -catenina faz com que seja induzida a transição epitélio-mesênquima. A EMT é essencial para o desenvolvimento embrionário e tem sido incriminada em facilitar a disseminação metastática já que promove a desagregação celular e a aquisição de um fenótipo móvel pelas células neoplásicas. Como a metástase é a principal causa de morte entre os portadores de câncer, este fenômeno tem sido amplamente estudado nos mais diversos tipos tumorais em medicina humana, inclusive com a busca de alvos terapêuticos que possam inibir esta via e conseqüentemente inibir a progressão tumoral.

A demonstração da ocorrência da transição epitélio-mesênquima e da ativação aberrante da via do Wnt/ β -catenina entre também entre as neoplasias mamárias caninas abre campo para mais pesquisas nesta área também em medicina veterinária, visto que a incidência desta neoplasia é bastante elevada entre nossos pacientes.

7. Considerações finais

Este estudo é pioneiro na investigação da expressão do gene WNT5A e mostrou que este deve agir como um gene supressor tumoral possivelmente funcionando como um regulador negativo da via de sinalização do Wnt/ β -catenina. Ainda, este ligante deve fazer parte da via não-canônica de sinalização do Wnt ou β -catenina independente também nas neoplasias mamárias caninas.

A via de sinalização do Wnt/ β -catenina é incriminada em induzir a EMT. Quando da ativação desta via, a perda ou redução da expressão de E-caderina libera moléculas do complexo de adesão como a β -catenina para o citoplasma da célula. Falhas no complexo de destruição desta proteína, como por exemplo no APC, fazem com que esta se acumule no citoplasma e vá ao núcleo agir como um fator transcricional, onde ativa genes responsáveis por desencadear a EMT e a presença de β -catenina nuclear é característica da ativação aberrante desta via.

A transição epitélio-mesênquima favorece a progressão tumoral facilitando a disseminação metastática já que confere às células epiteliais características de uma célula mesenquimal. Estas características são: redução ou perda na expressão de moléculas de adesão celular como a E-caderina e a substituição de citoqueratina por vimentina conferindo desagregação e mobilidade à estas células tumorais. Assim, é possível notar que a via do Wnt/ β -catenina está aberrantemente ativada entre as neoplasias mamárias caninas e que o processo de EMT está ocorrendo visto a transformação das células epiteliais das neoplasias benignas em um fenótipo mesenquimal como o observado nas neoplasias metastáticas.

8. Conclusões

Nas condições em que foi realizado este estudo é possível concluir que:

A localização celular da β -catenina parece ter relação com o comportamento biológico das neoplasias mamárias caninas, porém a relação entre a localização desta proteína e a sobrevida das cadelas com neoplasia mamária não foi observada.

A vimentina se mostrou um bom marcador prognóstico, já que mostrou diferença para a sobrevida global destas pacientes no grupo de neoplasias metastáticas.

A via do Wnt/ β -catenina está ativada de forma aberrante entre as neoplasias mamárias caninas e tem relação com o comportamento biológico destes tumores.

A transição epitélio-mesênquima foi observada entre as neoplasias mamárias caninas, haja visto a identificação de células tumorais com o fenótipo de EMT.

O Wnt5a aparentemente faz parte da via de sinalização não-canônica do Wnt e deve agir como um supressor tumoral inibindo a via canônica de sinalização do Wnt/ β -catenina também nas neoplasias mamárias caninas.

9. Perspectivas futuras

Atualmente existe uma busca incessante pela identificação de alvos terapêuticos que forneçam tratamentos personalizados com maior chance de cura para os pacientes com câncer. Como a via de sinalização do Wnt/ β -catenina e a EMT já estão sendo exploradas há algum tempo na medicina, o reconhecimento destes alvos em medicina veterinária pode trazer melhor conhecimento sobre a progressão das neoplasias mamárias caninas e ainda gerar novos dados para a pesquisa do câncer já que a cadela também é um modelo para o estudo do câncer de mama da mulher. Além disto, poderão ser identificadas novas oportunidades de tratamento também para nossos pacientes, bem como a adição de marcadores prognósticos ao repertório já existente.

Neste trabalho, a vimentina e a β -catenina se mostraram marcadores prognósticos promissores para as neoplasias mamárias caninas no que diz respeito ao seu comportamento biológico, porém apenas a vimentina foi relacionada à sobrevida das pacientes. Da mesma forma, a expressão gênica do Wnt5a não foi totalmente correspondente à sua expressão protéica e, foi aqui demonstrado apenas os níveis de RNAm do APC, sem a identificação de possíveis mutações ou metilações que possam comprometer a expressão deste gene. Soma-se a isto a identificação e relação da marcação citoplasmática da E-caderina com as neoplasias mamárias malignas. Todos estes resultados abrem novos campos de estudo com relação à estes genes e proteínas e sua função nas neoplasias mamárias caninas.

Assim, a identificação do envolvimento da via de sinalização do Wnt/ β -catenina na promoção da EMT entre as neoplasias mamárias caninas e os resultados gerados pelo presente estudo abrem um leque de mecanismos a serem investigados. Exemplos são a ocorrência de mutações e outros mecanismos epigenéticos que possam estar interferindo com a expressão destes genes, o verdadeiro valor prognóstico das proteínas aqui estudadas e o envolvimento destas não só com a via de sinalização do Wnt/ β -catenina e a ocorrência de EMT bem como a sua relação com outros processos que

possam estar ocorrendo não apenas entre os tumores de mama das cadelas, mas também entre outros carcinomas na medicina veterinária e humana.

10. REFERÊNCIAS

ANDRADE, F. H. E.; FIGUEIROA, F. C.; BERSANO, P. R. O.; BISSACOT, D. Z.; ROCHA, N. S. Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. **Diagnostic Pathology**, v. 5, n. 45, 2010.

AOKI, K.; TAKETO, M. M. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. 19, p. 3327-3335, 2007.

ARGYLE, D. J.; KHANNA, C. Tumor Biology and Metastasis. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. (Eds.). **Small Animal Clinical Oncology**. St. Louis: Elsevier, 2007. p. 31-53.

BARANWAL, S.; ALAHARI, S. K. Molecular mechanisms controlling E-cadherin expression in breast cancer. **Biochemical and Biophysical research communications**, v. 384, p. 6-11, 2009.

BAUER, M.; BÉNARD, J.; GAASTERLAND, T.; WILLERT, K.; CAPPELLEN, D. WNT5A Encodes Two Isoforms with Distinct Functions in Cancers. **PLOS One**, v. 8, n. 11, 2013.

BENHAJ, K.; AKCALI, K. C.; OZTURK, M. Redundant expression of canonical Wnt ligands in human breast cancer cell lines. **Oncology Reports**, v. 15, p. 701-707, 2006.

BENZÉCRI, J.P. Correspondence analysis handbook. New York, Marcel Decker, 1992. 665p.

BRINKHOF, B.; SPEE, B.; ROTHUIZEN, J.; PENNING, L. C. Development and evaluation of canine reference genes for accurate quantification of gene expression. **Analytical Biochemistry**, v. 356, n.1, p. 36-43, 2006.

BRODEY, R. S.; GOLDSCHIMIDT, M. H.; ROSZEL, J. R. Canine mammary gland neoplasms. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.19, p. 61-69, 1983.

BRUNETTI, B.; SARLI, G.; PREZIOSI, S.; LEPROTTI, S.; BENAZZI, C. E-cadherin Expression in Canine Mammary Carcinomas with Regional Lymph Node Metastases. **Journal of Veterinary Medical Association**, v. 50, p. 496-500, 2003.

CALAF, G. M.; BALAJEE, A. S.; MONTALVO-VILLAGRA, M. T.; LEON, M.; NAVARRETE, D.; ALVAREZ, R. G.; ROY, D.; NARAYAN, G.; ABARCA-QUINONES, J. Vimentin and Notch as biomarkers for breast cancer progression. **Oncology Letters**, v. 7, p. 721-727, 2014.

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

CHAO, Y. L.; SHEPARD, C. R.; WELLS, A. Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. **Molecular Cancer**, v. 9, n. 179, 2010.

CHU, K.; BOLEY, K. M.; MORAES, R.; BARSKY, S. H.; ROBERTSON, F. M. The Paradox of E-Cadherin: Role in response to hypoxia in the tumor microenvironment and regulation of energy metabolism. **Oncotarget**, v. 4, n. 3, p. 446-462, 2013.

CLARK, C. E. J.; NOURSE, C. C.; COOPER, H. M. The Tangled Web of Non-Canonical Wnt Signalling in Neural Migration. **NeuroSignals**, v. 20, p. 202-220, 2012.

CLEVERS, H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. **Cell**, v. 127, p. 469-480, 2006.

CLOHESSY, J. G.; PANDOLFI, P. P. β -tting on p63 as a metastatic suppressor. **Cell**, v. 137, p.28-30, 2009.

COLPAERT, C. G.; VERMEULEN, P. B.; BENOY, I.; SOUBRY, A.; VAN ROY, F.; VAN BEEST, P.; GOOVAERTS, G.; DIRIX, L. Y.; VAN DAM, P.; FOX, S. B.; HARRIS, A. L.; VAN MARCK, E. A. Inflammatory breast cancer shows angiogenesis with high endothelial proliferation rate and strong E-cadherin expression. **British Journal of Cancer**, v. 88, p. 718-725, 2003.

DA FORNO, P. D.; PRINGLE, J. H.; HUTCHINSON, P.; OSBORN, J.; HUANG, Q.; POTTER, L.; HANCOX, R. A.; FLETCHER, A.; SALDANHA, G. S. WNT5A expression increases during melanoma progression and correlates with outcome. **Clinical Cancer Research**, v. 14, p. 5825–5832, 2008.

DALECK, C. R.; FRANCESCHINI, P. H.; ALESSI, A. C.; SANTANA, A. E.; MARTINS, M. I. M. Aspectos clínico e cirúrgico do tumor mamário canino. **Ciência Rural**, v. 28, p. 95-100, 1998.

DE MATOS, A. J. F.; LOPES, C. C. C.; FAUSTINO, A. M. R.; CARVALHEIRA, J. G. V.; RUTTEMAN, G. R.; GÄRTNER, M. F. R. M. E-cadherin, β -catenin, invasion and lymph node metástases in canine malignant mammary tumours. **APMIS**, v. 115, p. 327-334, 2007.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; ROCHA, N. S.; FERNANDES, S. C. Neoplasias Mamárias. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. (Eds.) **Oncologia em Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, 2008, cap. 25, p. 372-383.

DESTEXHE, E.; LESPAGNARD, L.; DEGEYTER, M.; HEYMANN, R.; COIGNOUL, F. Immunohistochemical identification of myoepithelial, epithelial and connective tissue cell in canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.30, n.2, p. 146-154, 1993.

DOLLED-FILHART, M.; MCCABE, A.; GILTNANE, J.; CREGGER, M.; CAMP, R. L.; RIMM, D. L. Quantitative in situ analysis of beta-catenin expression in

breast cancer shows decreased expression is associated with poor outcome. **Cancer Research**, v. 66, p. 5487-5494, 2006.

ELLIS, I. O.; ELSTON, C. W. Tumors of the breast. In: FLETCHER, C. D. M. (Ed.) **Diagnostic histopathology of tumors**. Hong Kong: Pearson Professional Limited, 1995, v. 1, cap. 16, p. 635-689.

FONSECA, C. S.; DALECK, C. R. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovariectomia como terapia adjuvante. **Ciência Rural**, v. 30, N. 4, p. 731-735, 2000.

FOSSUM, T. W. Cirurgia dos Sistemas Reprodutivo e Genital. In: _____. (Ed.). **Cirurgia de Pequenos Animais**. 2ª. Edição. São Paulo: Roca, 2005, p. 631-637.

GALERA-RUIZ, H.; RÍOS, M. J.; GONZÁLEZ-CÁMPORA, R.; DE MIGUEL, M.; CARMONA, M. I.; MORENO, A. M.; GALERA-DAVIDSON, H. The cadherin-catenin complex in nasopharyngeal carcinoma. **European Archives of Otorhinolaryngology**, v. 268, p. 1335-1341, 2011.

GAMA, A.; PAREDES, J.; GÄRTNER, F.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Expression of E-cadherin, P-cadherin and β -catenin in canine malignant mammary tumours in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. **The Veterinary Journal**, v. 177, p. 45-53, 2008.

GASPAR, C.; FRANKEN, P.; MOLENAAR, L.; BREUKEL, C.; VAN DER WALK, M.; SMITS, R.; FODDE, R. A Targeted Constitutive Mutation in the Apc Tumor Suppressor Gene Underlies Mammary But Not Intestinal Tumorigenesis. **PLOS Genetics**, v. 5, n. 7, 2009.

GHELDOLF, A.; BERX, G. Chapter Fourteen – Cadherins and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 116, p. 317-336, 2013.

GILLES, C; POLETTE, M.; METSDAGT, M.; NAWROCKI-RABY, B.; RUGGERI, P.; BIREMBAUT, P.; et al. Transactivation of Vimentin by β -catenin in human breast cancer cells. **Cancer Research**, v. 63, p. 2658-2664, 2003.

GILLES, C; POLETTE, M.; ZAHM, J. M.; TOURNIER, J. M.; VOLDERS, L.; FOIDART, J. M.; BIREMBAUT, P. Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration. **Journal of cell science**, v. 112, p. 4615-4625, 1999.

GREENACRE, M. J.; HASTIE, T. The geometric interpretation of correspondence analysis. **Journal of the American Statistical Association**, v. 82, p. 437-447, 1987.

GRODEN, J.; THLIVERIS, A.; SAMOWITZ, W.; CARLSON, M.; GELBERT, L.; ALBERTSEN, H.; JOSLYN, G.; STEVENS, J.; SPIRIO, L.; ROBERTSON, M.; SARGEANT, L.; KRAPCHO, K.; WOLFF, E.; BURT, R.; HUGHES, J. P.; WARRINGTON, J.; MCPHERSON, J.; WASMUTH, J.; LE PASLIER, D.; ABDERRAHIM, H.; COHEN, D.; LEPPERT, M.; WHITE, R. Identification and

characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. **Cell**, v. 66, n. 3, p. 589-600, 1991.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HASHIMOTO, T.; SOENO, Y.; MAEDA, G.; TAYA, Y.; AOBA, T. NASU, M.; KAWASHIRI, S.; IMAI, K. Progression of Oral Squamous Cell Carcinoma Accompanied with Reduced E-Cadherin Expression but not Cadherin switch. **Plos One**, v. 7, n. 10, 2012.

HAY, E. D., An overview of epithelio-mesenchymal transformation. **Acta Anatomica**, v. 154, n. 1, p. 8-20, 1995.

HENDRIX, M. J. C.; SEFTOR, E. A.; SEFTOR, R. E. B.; TREVOR, K. T. Experimental Co-Expression of Vimentin and Keratin Intermediate Filaments in Human Breast Cancer Cells Results in Phenotypic Interconversion and Increased Invasive Behavior. **American Journal of Pathology**, v. 150, n. 2, p. 483-495, 1997.

HOLLIER, B. G.; EVANS, K.; MANI, S. A. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cells: A coalition against cancer therapies. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 14, p. 29-43, 2009.

HONG, S.; LI, A.; OLINO, K.; WOLFGANG, C. L.; HERMAN, J. M.; SCHULICK, R. D.; LACOBUZIO-DONAHUE, C.; HRUBAN, R. H.; GOGGINS, M. Loss of E-Cadherin Expression and Outcome among Patients with Resectable Pancreatic Adenocarcinomas. **Modern Pathology**, v. 24, n. 9, p. 1237-1247, 2011.

HORTA, R. S.; LAVALLE, G. E.; CUNHA, R. M. C.; MOURA, L. L.; ARAÚJO, R. B.; CASSALI, G. D. Influence of surgical technique on overall survival, disease free interval and new lesion development interval in dogs with mammary tumors. **Advances in breast cancer research**, v. 3, p. 38-46, 2014.

HOWE, L. R.; BROWN, A. M. C. Wnt signaling and breast cancer. **Cancer Biology & Therapy**, v. 3, n. 1, p. 36-41, 2004.

HULPIAU, P.; ROY, F. V. Molecular evolution of the cadherin superfamily. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, p. 349-369, 2009.

INCASSATI, A.; CHANDRAMOULI, A.; EELKEMA, R.; COWIN, P. Key signaling nodes in mammary gland development and cancer: β -catenin. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 213, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. **Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama. Acesso em: 9 de janeiro de 2014.

JÖNSSON, M.; DEJMEK, J.; BENDAHL, P.; ANDERSSON, T. Loss of Wnt-5a Protein Is Associated with Early Relapse in Invasive Ductal Breast Carcinomas. **Cancer Research**, v. 62, p. 409-416, 2002.

JOYCE, J. A. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. **Cancer Cell**, v. 7, p. 513-520, 2005.

KALLURI, R. EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1417-1419, 2009.

KARANTZA, V. Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. **Oncogene**, v. 30, n. 2, p. 127-138, 2011.

KHAJA, A. S. S.; HELCZYNSKI, L.; EDSJÖ, R.; EHRNSTRÖM, R.; LINDGREN, A.; ULMERT, D.; ANDERSSON, T.; BJARTELL, A. Elevated Level of Wnt5a Protein in Localized Prostate Cancer Tissue Is Associated with Better Outcome. **Plos One**, v. 6, n. 10, 2011.

KHANNA, C.; HUNTER, K. Modelling metastasis in vivo. **Carcinogenesis**, v. 26, p. 513-523, 2005.

KHRAMTSOV, A. I.; KHRAMTSOVA, G. F.; TRETIAKOVA, M.; HUO, D.; OLOPADE, O. I.; GO, K. H. Wnt/ β -Catenin Pathway Activation Is Enriched in Basal-Like Breast Cancers and Predicts Poor Outcome. *The American Journal of Pathology*, v. 176, n. 6, p. 2911-2920, 2010.

KIM, J. H.; JANG, Y. S.; EOM, K. S.; HWANG, Y. I.; KANG, H. R.; JANG, S. H.; et al. Transforming growth factor beta1 induces epithelial-to-mesenchymal transition of A549 cells. **Journal of Korean Medical Science**, v. 22, n. 5, p. 898-904, 2007.

KINZLER, K. W.; NILBERT, M. C.; SU, L. K.; VOGELSTEIN, B.; BRYAN, T. M.; LEVY, D. B.; SMITH, K. J.; PREISINGER, A. C.; HEDGE, P.; MCKECHNIE, D.; et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. **Science**, v. 253, n. 5020, p. 661-665, 1991.

KLOPFLEISCH, R.; GRUBER, A. D. Differential expression of cell cycle regulators p21, p27 and p53 in metastasizing canine mammary adenocarcinomas versus normal mammary glands. **Research in Veterinary Science**, v. 87, p. 91-96, 2009.

KURAGUSHI, M.; OHENE-BAAH, N. Y.; SONKIN, D.; BRONSON, R. T.; KUCHERLAPATI, R. Genetic Mechanisms in Apc-Mediated Mammary Tumorigenesis. **PLOS Genetics**, v. 5, n. 2, 2009.

KURAYOSHI, M.; OUE, N.; YAMAMOTO, H.; KISHIDA, M.; INOUE, A.; ASAHARA, T.; YASUI, W.; KIKUCHI, A. Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion. **Cancer Research**, v. 66, n. 21, p. 10439-10448, 2006.

KUSINSKA, R. U.; KORDEK, R.; PLUCIENNIK, E.; BEDNAREK, A. K.; PIEKARSKI, J. H.; POTEMSKI, P. Does vimentin help to delineate the so-called 'basal type breast cancer'? **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 28, n. 118, 2009.

KWONG, L. N.; DOVE, W. F. APC and its modifiers in colon cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 656, p. 85-106, 2009.

LACROIX-TRIKI, M.; GEYER, F. C.; LAMBROS, M. B.; SAVAGE, K.; O ELLIS, I.; LEE, A. H. S.; REIS-FILHO, J. S. β -catenin/Wnt signalling pathway in fibromatosis, metaplastic carcinomas and phyllodes tumours of the breast. **Modern Pathology**. doi:10.1038/modpathol.2010.141, 2010.

LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J. Tumors of the Mammary Gland. In: **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 4a. Edição. St. Louis: Saunders, Elsevier, 2007, p. 619-636.

LERIS, A. C. A.; ROBERTS, T. R.; JIANG, W. G.; NEWBOLD, R. F., MOKBEL, K. WNT5A Expression in Human Breast Cancer. **Anticancer Research**, v. 25, p. 731-734, 2005.

LEWIS-TUFFIN, L. J.; RODRIGUEZ, F.; GIANNINI, C.; SCHEITHAUER, B.; NECELA, B. M.; SARKARIA, J. N.; ANASTASIADIS, P. Z. Misregulated E-Cadherin Expression Associated with an Aggressive Brain Tumor Phenotype. **Plos One**, v. 5, n. 10, 2010.

LINDBLAD-TOH, K.; WADE, C. M.; MIKKELSEN, T. S.; KALRSSON, E. K.; JAFFE, D. B.; KAMAL, M.; et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. **Nature**, v. 438, 803-819, 2005.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LÓPEZ-KNOWLES, E.; ZARDAWI, S. J.; McNEIL, C. M.; MILLAR, E. K. A.; CREA, P.; MUSGROVE, E. A.; SUTHERLAND, R. L.; O'TOOLE, S. A. Cytoplasmic localization of β -catenin is a marker of poor outcome in breast cancer patients. **Cancer, Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 19, n. 1, p.301-309, 2010.

LORHISCH, C.; PICCART, M. Câncer de mama. In: **Manual de Oncologia Clínica da UICC**. 8ª Edição. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, p. 505-36, 2006.

LUEBKE-WHEELER, J. L.; NEDREDAL, G.; YEE, L.; AMIOT, B. P.; NYBERG, S. L. E-Cadherin Protects Primary Hepatocyte Spheroids From Cell Death by a Caspase-Independent Mechanism. **Cell Transplantation**, v. 18, n. 12, p. 1281-1287, 2009.

LUO, W.; FANG, W.; LI, S.; YAO, K. Aberrant expression of nuclear vimentin and related epithelial-mesenchymal transition markers in nasopharyngeal carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 131, p. 1863-1873, 2012.

MARAMBAUD, P.; SHIOI, J.; SERBAN, G.; GEORGAKOPOULOS, A.; SARNER, S.; NAGY, V.; BAKI, L.; WEN, P.; EFTHIMIOPOULOS, S.; SHAO, Z.; WISNIEWSKI, T.; ROBAKIS, N. K. A presenelin-1/ γ -secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 8, p. 1948-1956, 2002.

MARKIEWICZ, A.; AHRENDTS, T.; WEŁNICKA-JAŚKIEWICZ, M.; SEROCZYŃSKA, B.; SKOKOWSKI, J.; JAŚKIEWICZ, J.; SZADE, J.; BIERNAT, W.; ZACZEK, A. J. Expression of epithelial to mesenchymal transition-related markers in lymph node metastases as a surrogate for primary tumor metastatic potential in breast cancer. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, 2012.

MATOS, A. J. F.; LOPES, C.; CARVALHEIRA, J.; SANTOS, M.; RUTTEMAN, G. R.; GÄRTNER, F. E-cadherin expression in canine malignant mammary tumours: relationship to other clinic-pathological variables. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, p. 182-189, 2006.

MICALIZZI, D. S.; FARABAUGH, S. M.; FORD, H. L. Epithelial-Mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 15, n. 2, p. 117-134, 2010.

MIKELS, A. J.; NUSSE, R. Purified Wnt5a Protein Activates or Inhibits β -Catenin–TCF Signaling Depending on Receptor Context. **Plos Biology**, v. 4, n. 4, 2006.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D. J. (Ed.). **Tumors in Domestic Animals**. 4a Edição. Ames: Iowa State Press, p. 575-606, 2002.

MORRIS, J. Improving the diagnoses and treatment of canine mammary tumors: immunohistochemical markers as prognostic tools. **The Veterinary Journal**, v. 184, p. 3-4, 2010.

NARAYAN, S.; ROY, D. Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. **Molecular Cancer**, v. 2, n. 41, 2003.

NEMETH, M. J.; TOPOL, L.; ANDERSON, S. M.; YANG, Y.; BODINE, B. D. Wnt5a inhibits canonical Wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, V. 104, p. 15436–15441, 2007.

NODA, T.; NAGANO, H.; TAKEMASA, I.; YOSHIOKA, S.; MURAKAMI, M.; WADA, H.; KOBAYASHI, S.; MARUBASHI, S.; TAKEDA, Y.; DONO, K.; UMESHITA, K.; MATSUURA, N.; MATSUBARA, K.; DOKI, Y.; MORI, M.; MONDEN, M. Activation of Wnt/b-catenin signalling pathway induces chemoresistance to interferon- α /5-fluorouracil combination therapy for hepatocellular carcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 100, p. 1647-1658, 2009.

NOVOSAD, C.A. Principles of treatment for mammary gland tumors. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 18, n. 2, p. 107-109, 2003.

ODENWALD, M. A.; PROSPERI, J. R.; GOSS, K. H. APC/ β -catenin-rich complexes at membrane protrusions regulate mammary tumor cell migration and mesenchymal morphology. **BMC Cancer**, v. 13, n. 12, 2013.

ONDER, T. T.; GUPTA, P. B.; MANI, S. A.; YANG, J.; LANDER, E. S.; WEINBERG, R. A. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. **Cancer Research**, v. 68, n. 10, p. 3645-3654, 2008.

OWEN, L. N. Classification of Tumors in Domestic Animals. **World Health Organization, Geneva**, 1980.

PAINTER, J. T.; CLAYTON, N. P.; HERBERT, R. A. Useful Immunohistochemical Markers of Tumor Differentiation. **Toxicologic Pathology**, v. 38, n. 1, p. 131-141, 2010.

PANG, L. Y.; ARGYLE, D. J. Using naturally occurring tumours in dogs and cats to study telomerase and cancer stem cell biology. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1792, p. 380-391, 2009.

PEINADO, H.; OLMEDA, D.; CANO, A. Snail, ZEB and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? **Nature reviews – Cancer**, v. 7, p. 415-428, 2007.

PHILLIPS, J.; EBERWINE, J. H. Antisense RNA amplification: a linear amplification method for analyzing the mRNA population from single living cells. **Methods**, v. 10, p. 283-288, 1996.

POURREYRON, C.; REILLY, L.; PROBY, C.; PANTELEYEV, A.; FLEMING, C.; MCLEAN, K.; SOUTH, A. P.; FOERSTER, J. Wnt5a is strongly expressed at the leading edge in non-melanoma skin cancer, forming active gradients, while canonical wnt signalling is repressed. **Plos One**, v. 7, n. 2, 2012.

PROSPERI J. R.; GOSS, K. H. A Wnt-ow of opportunity: targeting the Wnt/ β -catenin pathway in breast cancer. **Current Drug Targets**, v. 11, n. 9, p. 1074-1088, 2010.

RESTUCCI, B.; MAIOLINO, P.; MARTANO, M.; ESPOSITO, G.; FILIPPIS, D.; BORZACCHIELLO, G.; LO MUZIO, L. Expression of β -catenin, E-cadherin and APC in Canine Mammary Tumors. **Anticancer Research**, v. 27, p. 3083-3090, 2007.

RESTUCCI, B.; MARTANO, M.; DE VICO, G.; LO MUZIO, L.; MAIOLINO, P. Expression of E-cadherin, β -catenin and APC protein in Canine Colorectal Tumors. **Anticancer Research**, v. 29, p. 2919-2926, 2009.

RIPKA S, KÖNIG A, BUCHHOLZ M, WAGNER M, SIPOS B et al. WNT5A--target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer. **Carcinogenesis**, v. 28, p. 1178–1187, 2007.

ROARTY, K.; BAXLEY, S. E.; CROWLEY, M. R.; FROST, A. R.; SERRA, R. Loss of TGF- β or Wnt5a results in an increase in Wnt/ β -catenin activity and redirects mammary tumour phenotype. **Breast Cancer Research**, v. 11, n. 2, 2009.

RODASKI, S.; PIEKARZ, C. H. Epidemiologia e Etiologia do Câncer. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. (Eds.). **Oncologia em Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, 2008, cap. 1. p. 1-22.

RODRIGUEZ, F. J.; LEWIS-TUFFIN, L. J.; ANASTASIADIS, P. Z. E-cadherin's dark side: possible role in tumor progression. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1826, n. 1, p. 23-31, 2012.

SARLI, G.; PREZIOSI, R.; DE TOLLA, L.; BRUNETTI, B.; BENAZZI C. E-cadherin immunoreactivity in canine mammary tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, n. 6, p. 542-547, 2004.

SCHMALHOFER, O.; BRABLETZ, S.; BRABLETZ, T. E-cadherin, β -catenin and ZEB1 in malignant progression of cancer. **Cancer and metastasis review**, v. 28, p. 151-66, 2009.

SCHOLER-DAHIREL, A.; SCHLABACH, M. R.; LOO, A.; BAGDASARIAN, L.; MEYER, R.; GUO, R.; WOOLFENDEN, S.; YU, K. K.; MARKOVITS, J.; KILLARY, K.; SONKIN, D.; YAO, Y.; WARMUTH, M.; SELLERS, W. R.; SCHLEGEL, R.; STEGMEIER, F.; MOSHER, R. E.; McLAUGHLIN, M. E. Maintenance of adenomatous polyposis coli (APC)-mutant colorectal cancer is dependent on Wnt/ β -catenin signaling. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, v. 108, n. 41, p. 17135-17140, 2011.

SERRA, R.; EASTER, S. L.; JIANG, W.; BAXLEY, S. E. Wnt5a as an Effector of TGF β in Mammary Development and Cancer. **Journal of Mammary gland biology and neoplasia**, v. 16, n. 2, p. 157-167, 2011.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumours. **Veterinary Clinics of Small Animal Practice**, v. 33, p. 573-596, 2003.

STEIN, T. J.; HOLMES, K. E.; MUTHUSWAMY, A.; THOMPSON, V.; HUELSMEYER, M. K. Characterization of β -catenin expression in canine osteosarcoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 9, n. 1, p. 65-73, 2011.

STRATMANN, N.; FAILING, K.; RICHTER, A.; WEHREND, A. Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. **Veterinary Surgery**, v. 37, n. 1, p. 82-86, 2008.

TAYLOR, M. A.; PARVANI, J. G.; SCHIEMANN, W. P. The pathophysiology of epithelial-mesenchymal transition induced by Transforming Growth Factor- β in normal and malignant mammary epithelial cells. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**. DOI 10.1007/s10911-010-9181-1, 2010.

TOMASKOVIC-CROOK, E.; THOMPSON, E. W.; THIERY, J. P. Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 11, n. 213, 2009.

THRASIVOULOU, C.; MILLAR, M.; AHMED, A. Activation of intracellular calcium by multiple Wnt ligands and translocation of β -catenin into the nucleus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 50, p. 35651-35659, 2013.

VAN DER AUWERA, I.; VAN LAERE, S. J.; VAN DEN BOSCH, S. M.; VAN DEN EYNDEN, G. G.; TRINH, B. X.; VAN DAM, P. A.; COLPAERT, C. G.; VAN ENGELAND, M.; VAN MARCK, E. A.; VERMEULEN, P. B.; DIRIX, L. Y. Aberrant methylation of the *Adenomatous polyposis coli* (APC) gene promoter is associated with the inflammatory breast cancer phenotype. **British Journal of Cancer**, v. 99, p. 1735-1742, 2008.

WEERARATNA, A. T.; JIANG, Y.; HOSTETTER, G.; ROSENBLATT, K.; DURAY, P.; et al. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. **Cancer Cell**, v. 1, p. 279–288, 2002.

WENG, W.; YIN, J.; ZHANG, Y.; QIU, J.; WANG, X. Metastasis-associated protein 1 promotes tumor invasion by downregulation of E-cadherin. **International Journal of Oncology**, 2014. Disponível em: < doi: 10.3892/ijo.2014.2253.

WHITE, B. D.; CHIEN, A. J.; DAWSON, D. W. Dysregulation of Wnt/ β -catenin Signaling in Gastrointestinal Cancers. **Gastroenterology**, v. 142, n. 2, p. 219-232, 2012.

WIDAKOWICH, C; AZAMBUJA, E; GIL, T; CARDOSO, F; DINH, P; AWADA, A; PICCART-GEBHART, M. Molecular targeted therapies in breast cancer: Where are we now? **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 1375-1387, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Cancer Report, 2008. International Agency for Research on Cancer.

WRIGHT, J. A.; RICHER, J. K.; GOODALL, G. J. microRNAs and EMT in mammary cells and breast cancer. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**. Doi 10.1007/s10911-010-9183-z, 2010.

YILMAZ, M.; CHRISTOFORI, G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. **Cancer and metastasis review**, v. 28, p. 15-33, 2009.

YING, Y.; TAO, C. Epigenetic disruption of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in human cancers. **Epigenetics**, v. 4, n. 5, p. 307-312, 2009.

YOUMANS, L.; TAYLOR, C.; SHIN, E.; HARRELL, A.; ELLIS, A. E.; SÉGUIN, B.; JI, X.; ZHAO, S. Frequent Alteration of the Tumor Suppressor Gene APC in Sporadic Canine Colorectal Tumors. **PLOS One**, v. 7, n. 12, 2012.

ZAIDAN-DAGLI, M. L., The search for suitable prognostic markers for canine mammary tumors: A promising outlook. **The Veterinary Journal**, v. 177, p. 3-5, 2008.

ZUCCARI, D. A. P. C. Contribuição ao estudo imunoistoquímico dos tumores mamários em cadelas. Jaboticabal – SP, Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Jaboticabal, 1999. 121 p. Dissertação de mestrado, Patologia Animal.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

ESTUDO SOBRE NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS

Nome do Animal:

RG HV:

Idade:

Raça:

Proprietário:

Telefone:

Cidade:

Castrada: () Sim () Não

Tempo de Evolução:

Ulcerado: () Sim () Não

Metastáse: () Sim () Não

Local:

Recidiva: () Sim () Não

Uso prévio de contraceptivos: () Sim () Não

Conformação (estado corporal):

() Magro () Normal () Sobrepeso

Ciclo estral:

() 6/6 meses

() Menor que 6 meses

() Maior que 6 meses

() Não observado

Obs.

Duração do estro (dias):

Número de partos:

Número médio de filhotes por parto:

Tipo de parto:

Normal Cesariana

Alterações patológicas com fetos (filhotes):

Não Sim. Qual?.....

Apresentação de pseudociese:

Não Sim. Frequência:

Em caso de pseudociese:

Com produção láctea

Sem produção láctea

Mastite clinica:

Não diagnosticada

Uma vez

Duas vezes

Três ou mais vezes

Outros.....

Presença de secreção mamária:

Presença de outros tumores:Local:.....

Alteração comportamental após a observação do tumor:.....

Ocorrência de tumor mamário em ascendentes ou descendentes com tumor mamário:

Sim. Quem?.....

Não

Não sabe informar

Ocorrência de ascendentes ou descendentes com outros tipos de tumores:

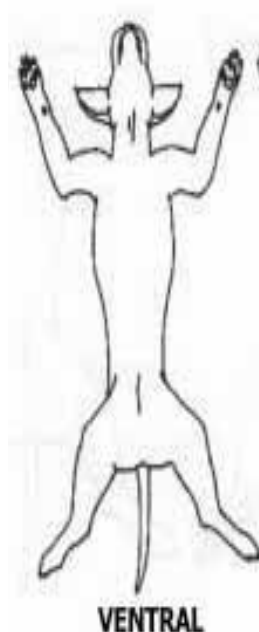
() Sim. Quem e tipo:.....

() Não

() Não sabe informar

Obs.

ESQUERDA



Esquerda

M1:

M2:

M3:

M4:

M5:

Linfonodo:

TAMANHO

Direita

M1:

M2:

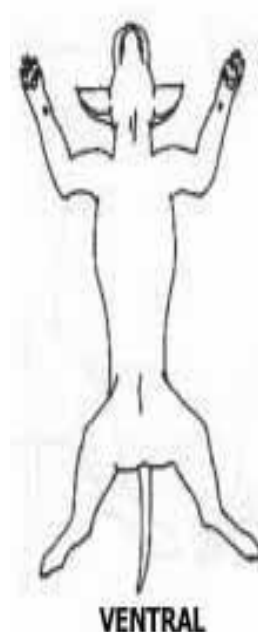
M3:

M4:

M5:

Linfonodo:

DIREITA



DATA:

PÓS-GRUANDO RESPONSÁVEL PELA COLETA:

APÊNDICE 2

Protocolo de Amplificação de RNA

1. 1º Round

1.1- Síntese da primeira fita de cDNA

(Tubo de 0,5 mL ou 0,2 mL) - **NO GELO**.

1º Reação:

-1,5µg RNA total eluído (Volume total de 8µL)

-Adicionar 1µL de 0,3µg/µL Oligo dT (24)-T7 Primer
(Vf=9 µL)

Termociclador: (AMP1)

Incubar 70°C por 10 minutos
4°C

2º Reação: (Mix para reação da 1º fita de cDNA)

9 µL c/t	{	4µL 5x First Strand Buffer	x12	48 µL
		2µL DTT (0,1 M)	x12	24 µL
		2µL dNTP (10mM)	x12	24 µL
		2µL RNase In	x12	12 µL

2µL Superscript II (Em cada tubo). Total (Mix) 108 µL
(Vf=20 µL)

Termociclador: (AM ou AMP2)

Incubar a 42 °C por 2 horas
4°C ∞

1.2- Síntese da segunda fita de cDNA

(Adicionar aos tubos da reação anterior) -**NO GELO**.

1º Reação: (Mix para reação da 2º fita de cDNA)

28 µL c/t	{	16,2 µL H ₂ O DEPC	x12	194 µL
		10 µL Second Strand Buffer	x12	120 µL
		1 µL dNTP (10 mM)	x12	12 µL
		0,5 µL E.coli DNA Ligase	x12	6 µL
		0,3 µL RNase H	x12	3,6 µL

2 µL DNA Polimerase I (c/t). Total (Mix) 336 µL
(Vf=50 µL)

Termociclador: (AMP3)

Incubar a 16°C por 2 horas
4°C ∞

2º Reação:

-Adicionar 1 µL de T4 DNA Polimerase I

(Vf=51 µL)

Termo : Incubar a 16°C por 5 min

3º Reação: (Inativar a ação da enzima) T°C ambiente

-Adicionar 39 µL H₂O DEPC

-Adicionar 10 µL EDTA (0,5M) pH 8,0

(Vf=100 µL)

1.3- Purificação com PCI (25:24:1) pH 8,0 (Fenol:Clorofórmio:Álc. Isoamílico)

(Tubos de 1,5 mL)- **TEMP. AMBIENTE!!!**

-Colocar 100 µL de PCI ao tubo 1,5 mL

-Adicionar o conteúdo da reação anterior ao tubo com PCI (Misturar bastante com a pipeta)

-Inverter o tubo por 2 min

-Deixar na bancada por 2 min

-Centrifugar a 1400 rpm por 10 min

-Retirar o sobrenadante e colocá-lo em um novo tubo 1,5 mL

-Adicionar 100 µL de Clorofórmio

-Inverter o tubo por 2 min

-Centrifugar a 14000 rpm por 10 min

-Retirar o sobrenadante e colocá-lo em um novo tubo de 1,5 mL

1.4- Precipitação

TEMP. AMBIENTE

-Adicionar 10% volume recuperado de NaAC (3M) pH 5,2 ou NH₄Ac (7,5 mM) (~10 µL)

-Adicionar 1 µL de acrilamida (5 mg/ mL)

-Adicionar 3x volume recuperado de EtOH 100% gelado (~300 µL)

Inverter o tubo por 2 min

Incubar a -80°C por 3 horas ou -20°C overnight

Centrifugar a 4°C a 14000rpm por 20 min

NO GELO.

-Retirar o sobrenadante (pode guardá-lo a -20°C – utilizá-lo caso dê errado)

-Lavar até 4x o pellet com 1 mL EtOH 70% gelado (1x ou 2x dependendo da amostra)

Centrifugar a 4°C a 14000 rpm por 5 min

Secar o pellet a 37°C (Speed Vac)

Eluir o dsccDNA em 10µL H₂O DEPC pré aquecida 55°C (misturar com a pipeta)

Colocar em banho-maria a 55°C por 5min

Pode parar: Incubar a -80°C

1.5- Transcrição in vitro (Colocar controle)

(V=10 µL) - **NO GELO.**

Reação

7,5 µL de rNTP (25 mM)-(7,5 x número amostra/4)=

Quantidade de cada (A,C,G e UTP)

5 µL 5xReaction Buffer x 4=20 µL

2,5 µL Enzyme Mix

(Vf=25 µL)

Termociclador: (AMP4)

Incubar a 37°C por 5 horas

4°C ∞

Pode parar: Incubar a -80°C

1.6- Purificação do RNA com Trizol **NO GELO**

-Adicionar 1 mL de Trizol ao tubo de 1,5 mL (misturar bastante com a pipeta)

Inverter o tubo por 2 min

Incubar a temp. ambiente por 3 min

-Adicionar 200 µL de Clorofórmio

Inverter o tubo por 2 min

Incubar a temp. ambiente por 3 min

Centrifugar a 4°C a 12000 g por 15 min

-Retirar o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL

1.7- Precipitação

- Adicionar 10% volume recuperado de NaAC (3M) (~60 µL)

-Adicionar 0,5 µL de Glicogênio (20 mg/mL)

-Adicionar volume na proporção 1:1 de Isopropanol (~600 µL)

Inverter o tubo por 2 min

-Incubar em temp. ambiente por 30 min
-Centrifugar a 4°C a 14000 rpm por 30 min

NO GELO

-Retirar o sobrenadante (pode guardá-lo a -20°C – utilizar caso errado)

-Lavar até 4x o pellet com 1 mL EtOH 70% gelado (1x ou 2x dependendo da amostra)

Centrifugar a 4°C a 14000 rpm por 5 min

Secar o pellet a 37°C (Speed Vac)

Eluir o dsDNA em 6 µL H₂O DEPC pré aquecida 55°C (misturar com a pipeta)

Colocar em banho-maria a 55°C por 5 min. (Vf=6 µL)

Pode parar: Incubar a -80°C

2. 1

2. 2º Round

2.1- Síntese da primeira fita de cDNA

(Vf= 6 µL)-NO GELO!!!

1º Reação:

-Adicionar 3µL de Random Hexamer 3 µg/µL
(Vf=9 µL)

Termo: (AMP1)

Incubar 70°C por 10 minutos
4°C ∞

Deixar na bancada por 10 min (TA)

2º Reação: (Mix para reação da 1º fita de cDNA)

9 µL c/t	}	4µL 5x First Strand Buffer	x12	48 µL
		2µL DTT (0,1 M)	x12	24 µL
		2µL dNTP (10mM)	x12	24 µL
		2µL RNase In	x12	12 µL
2µL Superscript II (Em cada tubo).		Total Mix		108µL
		(Vf=20 µL)		

Termo: (AM ou AMP2)

Incubar a 42 °C por 2 horas
4°C ∞

2.2- Síntese da segunda fita de cDNA

(Adicionar aos tubos da reação anterior)-NO GELO!!!

1º Reação: (Mix para reação da 2º fita de cDNA)

78 µL c/t	}	63,6 µL H ₂ O DEPC	x12	763.2µL
		10 µL Advantage Buffer	x12	120µL
		2 µL dNTP (10 mM)	x12	24µL
		1,7 µL Oligo dT (15)-17 Primer	x12	20.4
		0,7 µL RNase H	x12	8.4µL
2 µL Advantage Polimerase (c/t).		Total Mix		936µL
		(Vf=100 µL)		

Termo: (AMP5)

37°C por 10 min (Digestão RNA)
94°C por 3 min (Denaturação)
65°C por 5 min (Ligação primers)
75°C por 30 min (Extensão)
4°C ∞

2º Reação: (Inativar a ação da enzima) TEMP. AMBIENTE!!!

-Adicionar 5 µL NaOH (1m)/EDTA (0,5M) (Solução)
(1000 µL EDTA 0,5M+2 µL NaOH 1M)

(Vf=105 µL)

Termo: Incubar a 65°C por 10 min

2.3- Purificação com PCI (25:24:1) pH 8 (Fenol:Clorofórmio:Ác. Isoamílico)

(Tubos de tubos 1,5 mL)- TEMP. AMBIENTE!!!

-Colocar 100 µL de PCI ao tubo 1,5 mL

-Adicionar o conteúdo da reação anterior ao tubo com PCI (Misturar bastante com a pipeta)

Inverter o tubo por 2 min

Deixar na bancada por 2 min

Centrifugar a 1400 rpm por 10 min

Retirar o sobrenadante e colocá-lo em um novo tubo 1,5 mL

-Adicionar 100 µL de Clorofórmio

Inverter o tubo por 2 min

Centrifugar a 14000 rpm por 10 min

-Retirar o sobrenadante e colocá-lo em um novo tubo de 1,5 mL

2.4- Precipitação

TEMP. AMBIENTE

-Adicionar 10% volume recuperado de NaAC (3M) pH 5,2 ou NH₄Ac (7,5 mM) (~10 µL)

-Adicionar 1 µL de acrilamida (5 mg/ mL)

-Adicionar 3x volume recuperado de EtOH 100% gelado (~300 µL)

Inverter o tubo por 2 min

Incubar a -80°C por 3 horas ou -20°C overnight

Centrifugar a 4°C a 14000rpm por 20 min

NO GELO!!!

-Retirar o sobrenadante (pode guardá-lo a -20°C – utilizá-lo caso dê errado)

-Lavar até 4x o pellet com 1 mL EtOH 70% gelado (1x ou 2x dependendo da amostra)

Centrifugar a 4°C a 14000 rpm por 5 min

Secar o pellet a 37°C (Speed Vac)

Eluir o dsDNA em 10µL H₂O DEPC pré aquecida 55°C (misturar com a pipeta)

Colocar em banho-maria a 55°C por 5min

Pode parar: Incubar a -80°C

2.5- Transcrição in vitro (Colocar controle)

(V=10 µL) - NO GELO!!!

Reação

7,5 µL de rNTP (25 mM)-(7,5 x número amostra/4)=

Quantidade de cada (A,C,G e UTP)

5 µL 5xReaction Buffer x 4=20 µL

2,5 µL Enzyme Mix

(Vf=25 µL)

Termo: (AMP4)

Incubar a 37°C por 5 horas
4°C ∞

Pode parar: Incubar a -80°C

2.6- Purificação do RNA com Trizol NO GELO!!!

-Adicionar 1 mL de Trizol ao tubo de 1,5 mL (misturar bastante com a pipeta)

Inverter o tubo por 2 min

Incubar a temp. ambiente por 3 min

-Adicionar 200 µL de Clorofórmio

Inverter o tubo por 2 min

Incubar a temp. ambiente por 3 min

Centrifugar a 4°C a 12000 g por 15 min

-Retirar o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL

2.7- Precipitação

- Adicionar 10% volume recuperado de NaAC (3M) (~60 µL)

-Adicionar 0,5 µL de Glicogênio (20 mg/mL)

-Adicionar volume na proporção 1:1 de Isopropanol (~600 µL)

Inverter o tubo por 2 min

Incubar a temp. ambiente por 30 min
Centrifugar a 4°C a 14000 rpm por 30 min
NO GELO!!!
-Retirar o sobrenadante (pode guardá-lo a - 20°C – utilizar em banho-maria a 55°C por 5 min. caso errado)
-Lavar até 4x o pellet com 1 mL EtOH 70% gelado (1x ou 2x) ~~6 µL~~
Centrifugar a 4°C a 14000 rpm por 5 min

Secar o pellet a 37°C (Speed Vac)
Eluir o dsDNA em 6 µL H₂O DEPC pré aquecida 55°C (misturar com a pipeta)
Utilizar 1 µL do RNA para quantificação no Nanodrop