

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

EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DA COX-2 E c-KIT EM
NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CADELAS

Rosana da Cruz Lino Salvador
Médica Veterinária

2014

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

**EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DA COX-2 E c-KIT EM
NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CADELAS**

Rosana da Cruz Lino Salvador

Orientadora: Profa. Dra. Renée Laufer Amorim

Co-orientadora: Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa

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

2014

S182e Salvador, Rosana da Cruz Lino
Expressão gênica e proteica da COX-2 e c-KIT em neoplasias
mamárias de cadelas / Rosana da Cruz Lino Salvador. --
Jaboticabal, 2014
xvi, 88 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientadora: Renée Laufer Amorim
Banca examinadora: Felipe Augusto Ruiz Sueiro, Juliany Gomes
Quitzan
Bibliografia

1. Câncer 2. Mama. 3. COX-2. 4. Fator preditivo I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-006:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

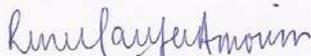
TÍTULO: EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DA COX-2 E c-KIT EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CADELAS

AUTORA: ROSANA DA CRUZ LINO SALVADOR

ORIENTADORA: Profa. Dra. RENÉE LAUFER AMORIM

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA

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



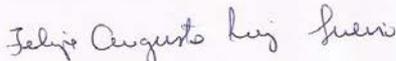
Profa. Dra. RENÉE LAUFER AMORIM

Departamento de Clínica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu



Profa. Dra. JULIANY GOMES QUITZAN

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu



Prof. Dr. FELIPE AUGUSTO RUIZ SUEIRO

VetPat / Campinas/SP

Data da realização: 27 de fevereiro de 2014.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ROSANA DA CRUZ LINO SALVADOR – nascida em dez de setembro de 1984, na cidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, filha de Manuel Bernardino Lino Salvador e Cândida Carneiro da Cruz Salvador. Iniciou sua graduação no curso de Medicina Veterinária em março de 2003 na Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, tendo finalizado a mesma em agosto de 2008. Desenvolveu um projeto de iniciação científica, com bolsa PIBIC, sob a orientação do Prof. Dr. Eduardo Alberto Tudury. Durante a graduação, participou de cursos e realizou estágios relacionados com a área de Clínica Médica de Pequenos Animais. Ingressou no programa de aprimoramento profissional na área de Clínica e Cirurgia de pequenos animais no Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP, sob a orientação da Profa. Msc. Carla Daniela Dan de Nardo, durante o período de fevereiro de 2009 a janeiro de 2011. Ainda no ano de 2009, iniciou o curso de especialização em Oncologia Veterinária no Instituto Bioethicus em Botucatu-SP. Neste período, publicou artigos em periódicos e resumos científicos em anais de congressos. No ano de 2012, ingressou no programa de pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV-UNESP), campus de Jaboticabal-SP, sob a orientação da Profa. Dra. Renée Laufer Amorim. Palestras e aulas foram ministradas neste período. Durante o Programa de Pós-Graduação realizou também treinamento no setor de Oncologia do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, sob a co-orientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Manuel (*in memoriam*) e minha mãe Cândida os grandes responsáveis
por todas as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por toda força e peço que continue me acompanhando sempre.

Ao meu pai, Manuel Bernardino Lino Salvador (*in memoriam*), por todo amor, carinho e dedicação. Você sempre será o meu exemplo de pai, amigo e docente. Você precisou evoluir para outro plano espiritual, mas por todos os dias e todo o tempo esteve e estará no meu coração. Essa conquista também é sua e eu não teria conseguido ir em frente se diariamente não recordasse os seus ensinamentos e a sua força de vontade.

À minha mãe Cândida Salvador por me ensinar os valores da vida e mostrar com a sua bondade infinita o amor de uma MÃE. Obrigada por todo apoio durante toda a minha caminhada. Sem o seu apoio eu não conseguiria chegar até aqui. Amo muito você.

Aos meus amados irmãos Lilian e Renato, que apesar da distância geográfica que nos separa sempre estivemos muito unidos.

À minha querida orientadora Prof^ª Dr^ª. Renée Laufer Amorim, por ter aceitado me orientar e por ser mais que uma orientadora, uma amiga. Obrigada por todo auxílio técnico, pela competência, pelos conselhos e por me mostrar que temos que buscar a nossa felicidade. A senhora é um exemplo como profissional e como pessoa. Obrigada também por me acalmar nos momentos em que eu achei que as coisas não dariam certo.

À minha co-orientadora Prof^ª. Dr^ª. Mirela Tinucci Costa, que contribuiu para a realização deste trabalho, me acolhendo nesta instituição e sempre apoiando no que fosse preciso.

À Profa. Silvia Rogatto por ter disponibilizado seu laboratório e sua equipe para me ajudar.

À Equipe do Laboratório Neogene – Unesp – Botucatu, por toda a ajuda durante o experimento, em especial gostaria de agradecer a Márcio de Carvalho, pela paciência nos ensinamentos, pela ajuda no experimento e pela amizade que com certeza vai permanecer. Agradeço também por toda ajuda e cuidado do funcionário Lucas para a realização dos cortes dos materiais congelados.

Ao meu namorado Caio, meu Bi, por todo amor, carinho, respeito e amizade nesses quatro anos juntos. Tenho que agradecer também pela paciência e por você entender o meu “relacionamento” sério com o computador nos últimos meses. Você sempre será meu melhor amor. Amo você.

À D. Marilene e Sr. Pedro por me acolherem como uma filha nessa família que tanto amo e que ganhei de presente. Agradeço a Daniel, Thiago e Nati pela amizade e carinho.

Aos meus padrinhos, primo Rafael e vovó por todo apoio durante a minha caminhada e por me receberem com muito carinho a cada volta à Aracaju.

À minha querida amiga Erika Xorona, pela amizade, “marmitas divididas”, pela companhia durante todas as viagens e estadia em Botucatu e pela parceria durante todo o experimento! Essa conquista também é sua.

Às amigas Talita e Giovanna, pela parceria para o desenvolvimento do “projeto mama”, pela amizade tão especial e pela dedicação ao nosso trabalho.

À minha querida amiga Marília. Obrigada por estar sempre ao meu lado, por sempre me ajudar em tudo que está ao seu alcance e pela amizade tão especial.

Agradeço a toda equipe “oncológica” do SOV, em especial ao Prof. Andrigo Barboza de Nardi e aos meus amigos do serviço Erika Maria Terra; Letícia Abrahao Anai; Livia Maria Semolin, Paulo César Jark; Giovanna Rossi Varallo, Talita Mariana Morata Raposo; Rafael Ricardo Huppes; Marília Ferreira; Reinaldo Garrido; Thiago Munhoz; Josiane Pazzini pela amizade e por toda ajuda sempre que necessário.

Ao HV da FCAV – Unesp Jaboticabal e à todos seus funcionários e residentes por me permitirem o acesso aos animais.

Agradeço às minhas “amigas de Aju”, Fernanda, Izadora, Mara, Talita e Lekinha por tantos anos de amizade e companheirismo.

À Frida, minha filha salsicha de quatro patas pelo amor incondicional e por ser minha companheira até nas idas à Botucatu.

Agradeço aos proprietários e aos animais que participaram dessa pesquisa. Em especial, Cindy, Gaya, Thyti, Lassie e Pandora. Agradeço aos animais pelos exemplos de amor, por nos proporcionar a oportunidade de fazer do nosso trabalho algo tão especial e por serem nossos estímulos para o aprendizado diário.

Agradeço a FAPESP pela bolsa de pesquisa e pelo financiamento do projeto.

SUMÁRIO

	Página
COMITE DE ÉTICA CEUA.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Neoplasias mamárias caninas.....	19
2.2 Marcadores tumorais.....	20
2.3 COX-2.....	21
2.4 c-KIT.....	24
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Coleta das amostras	26
4.1.1 Amostras tumorais.....	27
4.1.2 Amostras controle.....	27
4.2 Divisão dos grupos.....	27

4.3	Avaliação clínica dos pacientes.....	28
4.3.1	Estadiamento clínico.....	29
4.3.2	Exames de imagem.....	29
4.3.3	Exames laboratoriais e cirurgia.....	29
4.3.4	Seguimento clínico.....	30
4.4	Macrodissecção e extração do RNA.....	30
4.5	Transcrição reversa.....	31
4.6	Análise da expressão gênica.....	31
4.7	RT-PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR).....	33
4.8	Análise imuno-histoquímica.....	34
4.8.1	Contagem das células marcadas.....	35
4.9	Análise estatística.....	36
5.	RESULTADOS.....	37
5.1	Dados epidemiológicos.....	37
5.2	Associação dos dados epidemiológicos com os grupos G2, G3 e G4.....	38
5.3	Associação dos dados clínicos e histopatológicos com os grupos G2, G3 e G4.....	39
5.4.	Expressão gênica de <i>COX-2</i> e <i>c-KIT</i>	43
5.5	Correlação entre os resultados da expressão gênica de <i>COX-2</i> e <i>c-KIT</i>	45
5.6	Associação entre expressão gênica do gene <i>COX-2</i> e <i>c-KIT</i> com as variáveis clínicas e histopatológicas.....	45
5.7	Imunomarcção da <i>COX-2</i> e do <i>C-KIT</i>	47

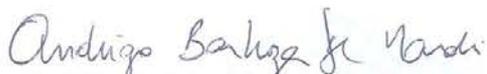
5.8 Correlação da imunomarcção entre COX-2 e c-KIT.....	56
6. DISCUSSÃO.....	58
7. CONCLUSÃO.....	65
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	66
9. REFERÊNCIAS.....	67
APÊNDICE.....	75
APÊNDICE A – Questionário dirigido aos proprietários de cadelas incluídas no experimento.....	76
APÊNDICE B- Dados clínicos (raça, idade, castração, pseudociese e uso de contraceptivos) das pacientes pertencentes aos grupos 2, 3 e 4.....	79
APÊNDICE C- Parâmetros clínicos (recidiva, ulceração, tamanho tumoral, <i>status</i> nodal e tratamento) das pacientes dos grupos 3 e 4.....	83
APÊNDICE D- Tipo histológico, grau de malignidade e estadiamento clínico dos tumores das pacientes dos grupos 3 e 4.....	86

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 013351/12 do trabalho de pesquisa intitulado "**Expressão gênica e proteica da COX-2 e c-KIT em neoplasias mamárias de cadelas**", sob a responsabilidade da Profª Drª Renée Laufer Amorim 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 03 de julho de 2012.

Jaboticabal, 03 de julho de 2012.


Prof. Dr. **Andriago Barboza De Nardi**
Coordenador - CEUA

EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DA COX-2 E c-KIT EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CADELAS

RESUMO – A neoplasia mamária é o tumor mais frequente nas cadelas e seu comportamento biológico assemelha-se com o que ocorre nas mulheres, com isso as cadelas podem ser um excelente modelo natural para estudos em oncologia comparada. A descoberta de proteínas com valor preditivo é importante como alvos terapêuticos específicos para cada tipo de câncer. Os objetivos deste estudo foram avaliar a expressão gênica e proteica de COX-2 e c-KIT em mamas normais, lesões benignas, carcinomas mamários não metastáticos e carcinomas metastáticos de cadelas e correlacioná-las com as variáveis clínicas e epidemiológicas. Para tanto foram utilizadas 124 cadelas portadoras de lesões mamárias e 13 cadelas sem lesões mamárias. Foram formados quatro grupos: G1= mamas normais; G2 = lesões mamárias benignas; G3 = carcinomas mamários não metastáticos e G4= carcinomas mamários metastáticos. A análise de expressão gênica foi realizada pelo método de RT-qPCR e de imunomarcação pelo método de imuno-histoquímica. Foi verificada diferença no nível de transcritos do gene COX-2 nas mamas normais e nos carcinomas metastáticos ($p < 0,05$) quando comparado com as amostras dos quatro grupos. Na análise do *c-KIT* não foi verificada diferença estatística do nível de transcritos entre os quatro grupos. Na imunomarcação, quando avaliado o escore final dos grupos na expressão de COX-2 e c-KIT foi observada diferença significativa entre os grupos com $p=0,0002$ e $p=0,0003$, respectivamente. A alta expressão de c-KIT ocorreu principalmente nas mamas normais, havendo uma diminuição da expressão do c-KIT com o aumento da malignidade do tecido. O contrário foi observado para a imunomarcação da COX-2 visto que a expressão aumentou com a malignidade do tecido. O marcador COX-2 pode ser um bom indicador prognóstico e preditivo nas neoplasias mamárias de cadelas, porém o c-KIT não pode ser utilizado como marcador independente.

Palavras-chave: câncer, mama, COX-2, c-KIT e fator preditivo.

GENE AND PROTEIN EXPRESSION COX-2 AND C-KIT IN CANINE MAMMARY TUMORS

ABSTRACT – Mammary tumors is the most frequent neoplasm in bitches and its biological behavior is similar to those that occur in women, making bitches an excellent model to comparative studies. Discovery of proteins with predictive value is important to determine specific therapeutic targets for each tumor type. The aims of this study were to evaluate gene and protein expression of COX-2 and c-KIT in normal mammary glands, benign lesions and mammary carcinomas with and without metastasis to correlate them with clinical and epidemiological variables. To this, were used 124 bitches with mammary lesions and also 13 bitches with no history of mammary tumors. Four groups were formed: G1 = normal mammary glands; G2= benign lesions; G3= non-metastatic mammary carcinomas and G4= metastatic mammary carcinomas. Gene expression analysis was conducted by RT-qPCR method and protein expression was assessed by immunohistochemistry. Difference on transcripts COX-2 level was observed in normal mammary glands and metastatic carcinomas ($p < 0.05$) when compared to other groups. In *c-KIT* evaluation no difference on transcripts level was observed among groups. The immunostaining for COX-2 and c-KIT among the four groups was significantly different ($p = 0.0002$ and $p = 0.0003$, respectively). High expression of c-KIT was observed mainly in normal mammary glands with a decrease in its expression to malignant tissues. The opposite was observed in COX-2 immunostaining and its expression increased in malignant samples. COX-2 can be a good prognosis and predictive marker in canine mammary tumors, however c-KIT cannot be used as an independent marker.

Keywords : cancer , breast cancer , COX - 2 , c - KIT and predictive factor.

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Número de amostras dos grupos 1, 2, 3 e 4 para imunohistoquímica (IHQ) e expressão gênica de COX-2 e c-KIT.....	28
Tabela 2	Estadiamento modificado das neoplasias mamárias de cadelas segundo os critérios descritos por Lana et al.(2007).....	29
Tabela 3	Sequências <i>forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) dos primers confeccionados para amplificação dos genes.....	33
Tabela 4	Anticorpo primário utilizado com especificação de clone, diluição e fabricante.....	35
Tabela 5	Tecido utilizado como controle positivo, localização, escore e intensidade da imunomarcagem para os anticorpos testados.....	36
Tabela 6	Associação entre os dados epidemiológicos e os grupos G2, G3 e G4. Os Valores de P menores que 0,05 indicam associações significativas entre os grupos e os parâmetros avaliados pelo teste G de Williams. Jaboticabal, 2014.....	38
Tabela 7	Associação entre os dados clínicos e histopatológicos com os grupos G2, G3 e G4. Valores de P menores que 0,05 indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste G de Williams. Jaboticabal, 2014.....	42
Tabela 8	Mediana (percentil 25 – percentil 75) para os valores da RT-qPCR (COX-2), segundo os grupos G1, G2, G3 e G4. Medianas seguidas de letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis. Jaboticabal, 2014.....	43
Tabela 9	Mediana (percentil 25 – percentil 75) para os valores da RT-qPCR (COX-2), segundo o grupo G1 (mamas normais) e G3 + G4 (carcinomas não metastáticos e carcinomas metastáticos). Medianas seguidas de letras minúsculas diferentes indicaram diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney. Jaboticabal, 2014.....	44
Tabela 10	Mediana (percentil 25 – percentil 75) para os valores da RT qPCR (c-KIT), segundo os grupos G1, G2, G3 e G4. Medianas seguidas de letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de	44

Kruskall-Wallis. Jaboticabal, 2014.....

Tabela 11	Mediana (percentil 25 – percentil 75) para os valores da RT-qPCR (c-KIT), segundo o grupo G1 (mamas normais) e G3 + G4 (carcinomas não metastáticos e carcinomas metastáticos). Medianas seguidas de letras minúsculas diferentes indicaram diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney. Jaboticabal, 2014.....	45
Tabela 12	Análise de correlação de expressão relativa dos genes alvos. Número de pares de amostras, coeficientes de correlação de Spearmann (R) e valores de P para RT-qPCR (COX-2) x RT-qPCR (c-KIT), para todas as amostras (independente dos grupos) e para cada um dos grupos. Jaboticabal, 2014.....	45
Tabela 13	Mediana (percentil 25 – percentil 75) para os valores da RT-qPCR (QR) para o gene COX-2, segundo os grupos e variáveis clínicas. Para um mesmo grupo, valores de mediana seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre as faixas de mensuração da variável clínica, pelos testes de Man-Whitney ou Kruskall-Wallis. Jaboticabal, 2014.....	46
Tabela 14	Mediana (percentil 25 – percentil 75) para os valores da RT-qPCR (QR) para o gene c-KIT, segundo os grupos e variáveis clínicas. Para um mesmo grupo, valores de mediana seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre as faixas de mensuração da variável clínica, pelos testes de Man-Whitney ou Kruskall-Wallis. Jaboticabal, 2014	47
Tabela 15	Mediana (percentil 25 – percentil 75) para os valores de escores de COX-2, segundo os grupos G1, G2, G3 e G4. Medianas seguidas de letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Kruskall-Wallis. Jaboticabal, 2014.....	48
Tabela 16	Frequência absoluta (Fi), frequência relativa (fi) e intervalo de confiança 95% (IC95%) para os valores de escores (percentual de células imunomarcadas) para COX-2, segundo o grupo. As frequências relativas de escores foram diferentes entre os grupos pelo teste G de Williams (p=0,0012). Jaboticabal, 2014.....	49
Tabela 17	Mediana (percentil 25 – percentil 75) para os valores de intensidade de marcação para COX-2, segundo o grupo. Medianas seguidas de letras minúsculas diferentes indicam	50

	diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Kruskall-Wallis. Jaboticabal, 2014.....	
Tabela 18	Frequência absoluta (Fi), frequência relativa (fi) e intervalo de confiança 95% (IC95%) para os valores de intensidade de marcação para COX-2, segundo o grupo. As frequências relativas de escores foram diferentes entre os grupos pelo teste G de Williams (p=0,0012). Jaboticabal, 2014.....	51
Tabela 19	Frequência absoluta (Fi) e relativa (fi) da expressão de COX-2, segundo o grupo. Jaboticabal, 2014.....	52
Tabela 20	Mediana (percentil 25 – percentil 75) para os valores de escores de c-KIT segundo o grupo. Jaboticabal, 2013. Medianas seguidas de letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Kruskall-Wallis.....	53
Tabela 21	Frequência absoluta (Fi), frequência relativa (fi) e intervalo de confiança 95% (IC95%) para os valores de escores de c-KIT, segundo o grupo. Jaboticabal, 2014.....	54
Tabela 22	Frequência absoluta (Fi), frequência relativa (fi) e intervalo de confiança 95% (IC95%) para os valores de intensidade de marcação para c-KIT, segundo o grupo. Jaboticabal, 2013. as frequências relativas de escores foram diferentes entre os grupos pelo teste G de Williams (p=0,0006).....	55
Tabela 23	Frequência absoluta (Fi) e relativa (fi) da expressão do c-KIT, segundo o grupo. valores de P menores que 0,05 indicam associação significativa entre grupo e expressão pelo teste de χ^2 de Pearson. Jaboticabal, 2014.....	56
Tabela 24	Número de pares de amostras, coeficientes de correlação de Spearman e valores de P para os escores de COX-2 e escores de c-KIT, para todas as amostras (independente dos grupos) e para cada um dos grupos. Valores de P menores que 0,05 indicam correlações significativas entre os pares de variáveis pelo teste de correlação de Spearman. Jaboticabal, 2014.....	57
Tabela 25	Número de pares de amostras, coeficientes de correlação de Spearman e valores de P para os valores de intensidade de marcação de COX-2 x valores de	57

intensidade de marcação de c-KIT, para todas as amostras (independente dos grupos) e para cada um dos grupos. Valores de P menores que 0,05 indicam correlações significativas entre os pares de variáveis pelo teste de correlação de Spearmann. Jaboticabal, 2014.....

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Média do coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos genes de referência.....	32
Figura 2 Determinação do número adequado de genes de referência para normalização da expressão dos genes alvos, demonstrando que com o uso dos três transcritos já se obtém uma normalização confiável.....	33
Figura 3 Frequência relativa, intervalo de confiança 95% e associação entre os dados clínicos com os grupos G2, G3, G4. A. Grau de malignidade (1, 2 e 3) (p=0,0071); B. Tamanho do tumor (T) (T1=< 3 cm, T2= 3-5 cm e T3= > 5 cm) (p=0,0019); C. Linfonodo regional (N) (0= sem metástase em linfonodo e 1= com metástase em linfonodo) (p=0,0001); D. Metástase à distância (M) (0= sem metástase à distância e 1= com metástase à distância) (p=0,0001); E. Estadiamento (TNM) (Estádio 1, 2, 3, 4 e 5) (p=0,0001); F. Ulceração tumoral (Não= sem ulceração e Sim= com ulceração) (p=0,0047); G. Diagnóstico histopatológico (p=0,0001). Jaboticabal, 2014.	41
Figura 4 Valor mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e valor máximo da RT-qPCR (QR) do gene COX-2, segundo os grupos G1, G2, G3 e G4. Jaboticabal, 2014.....	43
Figura 5 Valor mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e valor máximo da RT-qPCR (QR) para o gene COX-2, segundo o grupo G1 e G3+G4. Jaboticabal, 2014.....	44
Figura 6 Fotomicrografia de imunomarcção citoplasmática da proteína COX-2. A. Mama normal: escore 1 e intensidade 0. B. Adenoma mamário: escore 1 e intensidade 3. C. Carcinoma tubular: escore 4 e intensidade 3. D. Carcinoma tubular metastático: escore 4 e intensidade 3 (aumento 200x). Jaboticabal, 2014.....	48
Figura 7 Frequência relativa e intervalos de confiança 95% dos escores de COX-2, segundo o grupo. Jaboticabal, 2014.....	50
Figura 8 Frequência relativa e intervalos de confiança 95% para os valores de intensidade de marcação para COX-2, segundo o grupo. Jaboticabal, 2014.....	51
Figura 9 Frequência relativa e intervalo de confiança para o nível de expressão da COX-2, segundo o grupo. Jaboticabal,	

2014.....	52
Figura 10 Fotomicrografia de imunomarcaco citoplasmática da proteína c-KIT. A. Mama normal: escore 4 e intensidade 2. B. Adenoma mamário: escore 4 e intensidade 3. C. Carcinoma papilar não metastático: escore 2 e intensidade 1. D. Carcinoma tubular metastático: escore 4 e intensidade 2 (aumento 200x). Jaboticabal, 2014.....	53
Figura 11 Frequência relativa e intervalos de confiança 95% dos escores de c-KIT, segundo o grupo. Jaboticabal, 2014.....	54
Figura 12 Frequência relativa e intervalos de confiança 95% para os valores de intensidade de marcao para c-KIT, segundo o grupo. Jaboticabal, 2014.....	55
Figura 13 Frequência relativa e intervalo de confiança para o nível de expressão de c-KIT, segundo o grupo. Jaboticabal, 2014.....	56

1. INTRODUÇÃO

Os tumores de mama são os mais prevalentes tanto nas cadelas (PHILIBERT et al., 2003; KLOPFLEISCH; GRUBER, 2009; CASSALI et al., 2011; HENRY, 2013) quanto nas mulheres (INCA, 2013), apresentando uma incidência três vezes maior na cadela (RAHAL et al., 1995; SORENMO, 2003; LORENZOVÁ et al., 2010) do que na mulher. Estima-se que no Brasil a incidência de tumores de mama malignos caninos seja superior a 70% (OLIVEIRA et al., 2003; OLIVEIRA-FILHO et al., 2010; RAPOSO et al., 2012), sendo maior que nos Estados Unidos da América, cuja incidência descrita é de 50% (MISDORP, 1999; SORENMO, 2003).

Os tumores mamários em cães servem como modelos apropriados e válidos para o estudo da biologia do câncer, assim como para testes de agentes terapêuticos, já que animais de estimação têm tumores com apresentação histopatológica e comportamento biológico similares àqueles que acometem os seres humanos (ANDRADE et al., 2010; CASSALI, et al., 2011; KLOPFLEISCH et al., 2011).

Além disso, é válido salientar que na instituição na qual este trabalho foi desenvolvido, ocorrem em média quatro mastectomias por semana, totalizando aproximadamente 200 mastectomias/ano. O impacto econômico gerado por esta neoplasia está em torno de 120 mil reais/ano. Os animais de estimação representam um valioso mercado para vários segmentos de negócios: Pet Food (alimento), Pet Vet (medicamentos veterinários), Pet Serv (serviços e cuidados com os animais), e Pet Care (equipamentos, acessórios e produtos para higiene e beleza). Calcula a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (Abinpet) que o Brasil faturou R\$ 15,4 bilhões em 2013. Um aumento de 8,3% em relação a 2012, permanecendo em segundo lugar em nível mundial, atrás dos Estados Unidos. Em termos de mercado doméstico, quanto à população de animais de estimação, o Brasil se classifica em quarto lugar no ranking mundial.

Os mecanismos moleculares envolvidos no processo carcinogênico e mecanismo de metástase não são completamente elucidados (KLOPFLEISCH; GRUBER, 2009). Pesquisas recentes sobre determinantes genéticos de metástases identificaram conjuntos de genes ou “assinaturas”, para as quais as expressões de tumores primários estejam associadas com alto risco de metástases e baixa sobrevida (GUPTA et al., 2007; KLOPFLEISCH et al., 2011).

Dentre os marcadores tumorais em evidência nos protocolos de pesquisa se encontra a ciclooxygenase-2 (COX-2), que vem mostrando associação com os marcadores pré-estabelecidos, tanto como fator preditivo quanto prognóstico na carcinogênese mamária (PEREIRA et al., 2009; SOUZA et al., 2009; DE NARDI, 2013). Já o proto-oncogene *c-KIT* pode estar correlacionado com o controle do crescimento e da diferenciação do epitélio mamário normal na mulher. A sua supressão ocorre numa fase precoce da transformação maligna do epitélio mamário humano e pode indicar uma mudança no sinal de transdução em relação à transformação maligna no câncer de mama (MUNDIM; LOGULLO, 2009).

Em vista do potencial terapêutico de bloqueio destas proteínas em outras neoplasias do cão (mastocitomas/GIST) e no tumor de mama (COX-2), o presente trabalho objetivou avaliar a expressão gênica e proteica de COX-2 e *c-KIT* em tumores mamários de cadelas, a fim de verificar a participação destas proteínas nesta doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neoplasias mamárias caninas

No Brasil, os tumores mamários são as neoplasias mais comuns das cadelas, constituindo cerca de 50% do total de neoplasias desta espécie afetando um macho para cada 99 fêmeas (ANDRADE et al., 2010). A ocorrência dos tumores de mama em cadelas aumenta a partir dos seis anos de idade, sendo raro em animais com menos de dois anos. A faixa etária de ocorrência dos tumores mamários é de nove a 11 anos (DE NARDI et al., 2009).

As raças que se observa maior incidência dos tumores de mama são Poodle, Pastor Alemão, Cocker Spaniel, além dos cães sem raça definida (SRD). A incidência de tumores malignos é diferente em cães de raças de pequeno porte quando comparada às raças de grande porte, sendo maior nestes últimos (DE NARDI et al., 2009).

Em geral, os tumores mamários podem ser de tamanhos variados, de milímetros de diâmetros a grandes massas. Ainda é possível encontrar tumores múltiplos e em ambas as cadeias mamárias (DE NARDI et al., 2009).

O estadiamento clínico das neoplasias mamárias é importante como indicador de prognóstico e na definição sequencial do tratamento (LANA, et al. 2007). Atualmente, a maioria dos oncologistas utiliza uma versão modificada do sistema originalmente proposto por Owen (1980), e que permite classificar a progressão da doença em 5 fases, avaliando o tamanho do tumor primário (T), o comprometimento dos linfonodos regionais (N) e a presença ou ausência de metástase à distância (M). O estágio I representa os tumores menores que 3 cm e ausência de metástases em linfonodos e à distância, o estágio II classifica os tumores de 3 a 5 cm e ausência de metástases regionais e à distância, o estágio III refere-se aos tumores com tamanhos superiores a 5 cm e com ausência de metástases em linfonodos regionais e à distância, o estágio IV são tumores de qualquer tamanho, com metástase em linfonodos regionais e sem metástase à distância e o estágio V refere-se a qualquer tamanho tumoral, com presença ou ausência de metástase em linfonodos e presença de metástase à distância. Este sistema só se aplica a tumores epiteliais (excluindo o carcinoma inflamatório) (SORENMO et al., 2013).

Os principais órgãos acometidos pela disseminação deste tipo tumoral são linfonodos regionais (inguinais superficiais e axilares), pulmão, e com menor frequência, rim, fígado, baço, pele, glândulas adrenais, encéfalo, olhos e esqueleto (PEREZ ALENZA et al., 2000, DE NARDI et al., 2009). A disseminação dos carcinomas primários da mama ocorre preferencialmente por via linfática em cadelas, mas podem ocorrer também por via hematogena (GUPTA et al., 2007; DE NARDI et al., 2009; KLOPFLEISCH; GRUBER, 2009).

Os tumores mamários em cães servem como modelos apropriados, e válidos, ao estudo da biologia do câncer, assim como para testes de agentes terapêuticos, já que animais de estimação apresentam tumores com apresentação histopatológica e comportamento biológico similares àqueles que acometem os seres humanos (ANDRADE et al., 2010).

2.2 Marcadores tumorais

Há uma busca contínua para a elucidação dos mecanismos envolvidos no processo de desenvolvimento de tumores mamários caninos e, também, para a identificação de fatores prognósticos que possam prever a evolução desta

enfermidade em cada paciente (GAMA; ALVES; SCHMITT, 2008; ZAIDAN-DAGLI, 2008).

Além dos tratamentos convencionais, a evolução na genética molecular permitiu o desenvolvimento de novos protocolos de tratamento para muitos tumores. Dentre estas terapias, a utilização de fármacos alvo moleculares, como os inibidores de tirosina quinase e os inibidores de COX-2 tem sido amplamente estudados como marcadores, tanto como fator preditivo quanto prognóstico na carcinogênese mamária (SOTANI et al. 2008; LONDON, 2009; PEREIRA et al., 2009; YAMADA et al. 2011).

2.3 COX-2

As cicloxigenases são enzimas responsáveis pela ciclooxygenação e peroxidação do ácido aracdônico proveniente da membrana celular, levando a formação de prostaglandinas (HAYES, 2007).

A cicloxigenase-1 (COX -1) é expressa apenas constitutivamente e está relacionada à homeostase do indivíduo, tais como, a proteção da mucosa gástrica, melhora da perfusão renal e agregação plaquetária (MOHAMMED, 2004; CLIFFORD, 2005).

A cicloxigenase-2 (COX-2) é uma enzima induzida e sintetizada em processos inflamatórios e neoplásicos (GROOT, 2007; MOHAMMED, 2004). Alguns estudos demonstraram que a COX-2 pode ser induzida pelos oncogenes *RAS* e *SCR*, hipóxia tecidual, raios ultravioletas, interleucinas, andrógenos, fator de crescimento epidermal (EGF), fator de necrose tumoral (TNF- α) e benzopirenos (HAYES, 2007). Alguns estudos foram realizados correlacionando o desenvolvimento e progressão de alguns tipos de neoplasias com a presença da COX-2 nas células tumorais humanas e animais (KANAOKA, 2007; LLORET, 2008).

A descoberta da correlação entre a COX-2 e o câncer ocorreu a partir de observações de que pacientes que usaram anti-inflamatórios não esteroidais para alívio da dor em casos de tumores gastrointestinais apresentaram regressão do tumor (HAYES, 2007). Em outros estudos foi observada uma diminuição de 40-50% do risco de desenvolvimento de câncer de cólon e reto em pessoas que usavam regularmente anti-inflamatórios não esteroidais (HAYES, 2007; GROSCH, 2006).

A COX-2 e seus produtos estão relacionadas com a inibição da apoptose, diminuição da adesão celular, destruição da membrana basal, estímulo da proliferação celular e angiogênese, e manutenção da resposta inflamatória, que, por sua vez, contribui para a carcinogênese (COSTA et al., 2002; CASSALI et al., 2011). Vários mecanismos foram propostos para explicar a relação entre a expressão de COX-2, o aumento da produção de prostaglandinas nas células tumorais e o processo de carcinogênese.

A diminuição da apoptose devido ao aumento da expressão de COX-2 nas células neoplásicas, faz com que aumente o tempo de vida das células e favoreça o acúmulo de mutações genéticas sucessivas, contribuindo para a progressão do tumor (KANAOKA, 2007).

Em um estudo realizado por Souza et al. (2009), observou-se melhoria da condição e estabilidade clínica de cadelas com carcinoma inflamatório mamário tratadas com piroxicam, com média e mediana de sobrevida livre de progressão da doença de 171 e 183 dias, respectivamente. O tempo médio de sobrevida de três cães tratados com protocolos baseados com doxorrubicina foi de sete dias, o qual foi significativamente menor do que a dos cães tratados com o piroxicam (185 dias).

A superexpressão de COX-2 também está relacionada com o aumento na expressão de fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF), e conseqüentemente com o processo de angiogênese, que é considerado um mecanismo fundamental para o desenvolvimento tumoral, uma vez que contribui para a nutrição das células neoplásicas, e é uma importante via para disseminação metastática (GROOT, 2007; KANAOKA, 2007). Uma correlação positiva foi demonstrada entre a expressão de COX-2 e de VEGF em tumores de mama em humanos (GROOT, 2007).

Em um estudo de Kanaoka et al. (2007) foi demonstrado que o aumento na expressão de COX-2 está relacionado ao aumento na atividade de determinadas proteínas, como as metaloproteinases, enzimas responsáveis pela digestão do colágeno na matriz intercelular, permitindo o rompimento das barreiras e invasão tecidual. No estudo de câncer de cólon em humanos, foi observado que células que expressavam maior quantidade de COX-2 apresentavam maior potencial de invasão

celular e metástase quando comparadas com células que expressavam uma menor quantidade desta enzima (GROOT, 2007).

O sistema imune tem papel fundamental no controle do desenvolvimento de células neoplásicas. Em situações normais, o organismo é capaz de destruir clones de células transformadas ou combater células tumorais já formadas. A expressão de COX-2, e a conseqüente produção de prostaglandinas, leva a supressão na produção de linfócitos B e T, diminuição na produção de linfocinas, diminuição na formação de células *Natural Killers*, inibição da liberação de interleucinas resultando na síntese de células T não responsivas. Toda essa falha no sistema imunológico favorece o desenvolvimento tumoral (KANAOKA, 2007).

Guimarães et al. (2013) realizaram um estudo com 43 tumores de mama em cadelas, observando que a imunomarcaçãõ de COX-2 e EGFR foi correlacionada com o tamanho do tumor, índice mitótico, grau nuclear, grau histológico de malignidade e metástase linfonodal. Estes autores sugeriram ainda que a utilização combinada de inibidores seletivos da COX - 2 e EGFR pode ser uma abordagem útil para o tratamento dos tumores mamários malignos em cadelas.

Vários estudos descrevem uma relação entre o aumento da imunomarcaçãõ da COX-2 em carcinomas mamários não metastáticos e metastáticos (DE NARDI et al., 2013) e quando comparados com lesões benignas e mamas normais em cadelas (DE NARDI et al, 2013; PEREIRA et al., 2009). Em seres humanos, vários estudos reportam elevados níveis de COX-2 em cerca de 40 a 50% dos carcinomas de mama invasivos. Esta super expressãõ aparece particularmente em carcinomas ductais *in situ*, lesões consideradas precursoras dos tumores de mama invasivos. A expressãõ de COX-2, nos tumores de mama humano, parece estar correlacionada com um menor tempo de sobrevida livre de doençã e pior prognóstico (HWANG et al., 1998; ARUN et al., 2004).

Em estudo realizado por LAVALLE et al. (2009), cadelas com neoplasia mamária e com alta expressãõ de COX-2 tiveram tempo de sobrevida menor, o que também foi verificado por QUEIROGA et al. (2007), que observaram que o aumento da expressãõ de COX-2 estava relacionada com tempo livre de doençã e sobrevida global reduzidos em cães com tumores mamários malignos.

2.4 c-KIT

A proteína c-KIT (CD 117) é uma tirosina quinase transmembrana que atua como receptor para o fator de crescimento de mastócitos (também chamado “stem cell factor” ou “Kit ligant”). Quinases são membros de uma grande família de proteínas que desempenham papéis importantes no processo de sinalização e controle do crescimento celular. Diversos tipos de neoplasias contêm mutações específicas em genes que codificam proteínas quinases e são provavelmente responsáveis por eventos oncogênicos primários. Essas mutações resultam na produção de uma proteína quinase ativada que não é mais sensível aos sinais inibitórios habituais e a sinalização constante de tais proteínas estimula a proliferação celular, ativa cascatas anti-apoptóticas e a oncogênese. (WILLMORE-PAYNE, 2005; JUNG, 2010).

Além de estarem envolvidos no ciclo celular normal, os receptores de tirosina quinase têm participação fundamental no processo neoplásico. A mutação nos proto-oncogenes que codificam estes receptores, ou a superexpressão desses tem como consequência um descontrole no envio de sinais para proliferação celular que é fundamental para o desenvolvimento neoplásico (LONDON, 2009; JARK et al., 2012). Além disto, estes receptores estão envolvidos na angiogênese (através do VEGFR, PDGFR), a qual se mostra importante para a nutrição das células neoplásicas e uma via para a disseminação de metástases (THURSON et al., 2004).

O receptor c-KIT é expresso por um número limitado de células no cão e no gato, com uma distribuição comparável a dos mastócitos nos tecidos humanos. Ele está localizado nas células intersticiais de Cajal, nas células de Purkinje, no endométrio e nas células epiteliais (ductos e ácinos) da glândula mamária dos cães e humanos. De um modo geral, no tecido mamário normal a presença da proteína do c-KIT correlaciona-se com o controle do crescimento celular e a diferenciação do epitélio mamário normal (MUNDIM; LOGULLO, 2009; NAVEGA, 2011). A sua supressão ocorre numa fase precoce da transformação maligna do epitélio mamário humano e pode indicar uma mudança no sinal de transdução em relação à transformação maligna no câncer de mama (MUNDIM; LOGULLO, 2009).

Alguns estudos observaram que os tumores gliais em humanos que apresentavam positividade na imunomarcagem para o c-KIT estava relacionado com aumento do grau de malignidade e com a diminuição do tempo de sobrevivência.

Estudos pré-clínicos e clínicos indicaram que os inibidores do receptor da tirosina quinase, tais como o imatinib, podem ser utilizados como terapia alvo molecular em gliomas humanos (MORRIS; ABREY, 2010).

Embora a função da expressão do *c-KIT* no desenvolvimento do câncer de mama ainda seja desconhecido, alguns estudos sugerem que existe uma importante função deste proto-oncogene durante a proliferação celular. Os tecidos mamários normais (não-neoplásicos) e os tumores benignos apresentam alta imunomarcação do c-KIT. Em contrapartida, a imunomarcação do c-KIT se torna reduzida com o aumento da malignidade do tumor e com a presença de metástases em linfonodos e à distância. A expressão do c-KIT em tecido mamário normal sugere que a proliferação ou diferenciação das células mamárias deve ser regulada pela via de sinalização do c-KIT (KO et al., 2003; POLAT, 2007). É possível que uma significativa redução da expressão do c-KIT permita que as células potencialmente malignas possam escapar desse mecanismo regulatório (KO et al., 2003; TSUTSUI, 2006; POLAT, 2007).

Em estudos realizados em mulheres foi observado que o c-KIT é fortemente expresso no epitélio mamário normal, variavelmente expresso em lesões benignas de mama, e fracamente expresso em lesões malignas. Estes dados sugerem que o c-KIT pode desempenhar um papel na progressão do câncer de mama e, conseqüentemente, têm importância no diagnóstico, prognóstico e implicações terapêuticas (MIETTINEN; LASOTA, 2005; YARED et al., 2004).

Assim, pode-se inferir que o proto-oncogene *c-KIT* parece estar envolvido em uma fase inicial do desenvolvimento do câncer de mama em humanos (POLAT, 2007). O receptor de tirosina quinase KIT representa um dos maiores exemplos da participação destes receptores no desenvolvimento de neoplasias em cães. Após a descoberta da participação dos receptores de tirosina quinase no processo de carcinogênese, um grande esforço está sendo direcionado no desenvolvimento de estratégias para inibir estes receptores, tanto nas células cancerígenas como no endotélio vascular, com o intuito de inibir a angiogênese (ARGYLE, 2007; RANIERI, et al., 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar a expressão gênica e proteica da COX-2 e c-KIT em carcinomas de mama não metastáticos e metastáticos, tumores benignos e tecido mamário normal de cadelas correlacionando-os com a evolução tumoral.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar a expressão gênica de *COX-2* e *c-KIT* nos diferentes grupos tumorais, a fim de correlacioná-las com a imunomarcação das proteínas;
- Avaliar a expressão gênica e a imunomarcação da *COX-2* e *c-KIT* e correlacioná-las com as variáveis clínicas e epidemiológicas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das amostras

O presente estudo teve parecer favorável do Comitê de Ética no Uso de Animais (n. 013351/12– CEUA) e foi composto por 124 cadelas portadoras de tumores mamários, sem predileção por raça e idade, provenientes da casuística do HV da FCAV/Unesp, Jaboticabal, SP. Como controle foram utilizados fragmentos de mamas sem alterações histopatológicas de 13 cadelas sem histórico de neoplasia mamária que foram eutanasiadas no Centro de Zoonoses da cidade de Araçatuba, SP, devido ao diagnóstico de leishmaniose.

A inclusão dos animais foi condicionada ao consentimento livre e esclarecido de seus proprietários. Alguns proprietários não souberam responder alguns quesitos do questionário e, por isso, determinadas perguntas não foram respondidas em todos os casos. Após esclarecimento sobre o protocolo experimental e a concordância dos proprietários, as cadelas passaram pelo atendimento inicial no Serviço de Oncologia Veterinária (SOV) da FCAV.

Para o monitoramento da evolução clínica das cadelas foram aplicados questionários aos proprietários (Apêndice A), contendo perguntas sobre dados epidemiológicos e reprodutivos, além do endereço e telefones de contato. O objetivo deste questionário foi de 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 do diagnóstico até a última consulta do animal ou até a morte 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 ou no parênquima mamário remanescente. Não foi considerado como recidiva o aparecimento de novos nódulos na cadeia contralateral.

4.1.1 Amostras tumorais

Amostras de tumores mamários foram coletadas imediatamente após a mastectomia. Nos animais em que a realização da cirurgia não era possível devido à extensão da doença (metástase) foi realizado biópsia incisional. Nenhum dos animais recebeu tratamento quimioterápico previamente a cirurgia.

De cada tumor foi colhido um ou mais fragmentos de 1 cm³ os quais foram acondicionados em criotubo estéril, livre de RNase e DNase, previamente autoclavado e mantido em nitrogênio líquido a -196°C e posteriormente, armazenado em freezer a -80°C até o momento do processamento. Outro fragmento de cada tumor foi armazenado em formalina 10% durante 24 horas e, em seguida, passado para o álcool 70% para análise histopatológica e imuno-histoquímica.

4.1.2 Amostras controle

Foram coletadas amostras de mamas normais no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Araçatuba-SP e foi realizado o mesmo procedimento das amostras tumorais.

4.2 Divisão dos grupos

As pacientes com tumores mamários foram distribuídas em quatro grupos, de acordo com o diagnóstico histopatológico e presença ou ausência de metástases, sendo o grupo 1 (G1) composto por 13 mamas normais, o grupo 2 (G2) por 30 lesões mamárias benignas, o grupo 3 (G3) por 71 carcinomas mamários não metastáticos e o grupo quatro (G4) por 23 carcinomas mamários metastáticos. O grupo das lesões benignas (G2), foi composto por 11 cadelas que continham apenas

lesões benignas e 19 cadelas que continham lesões benignas e carcinomas. No entanto, durante a avaliação estatística dos dados clínicos e epidemiológicos para o grupo G2, foram consideradas as 11 cadelas que apresentavam apenas lesões mamárias benignas. Para avaliação da expressão gênica e proteica da COX-2 e c-KIT foram avaliadas as lesões mamárias com um todo.

A avaliação por imuno-histoquímica das proteínas COX-2 e c-KIT foi feita nos quatro grupos, no entanto o número de amostras de cada grupo variou entre as proteínas após o processamento das amostras. Para expressão gênica de COX-2 e c-KIT foram utilizadas amostras congeladas cujo número também variou entre os genes, pois as amostras que não apresentaram estabilidade e resultados confiáveis foram retiradas das análises. O número de amostras para cada grupo está descrito na tabela 1.

Tabela 1: Número de amostras dos grupos 1, 2, 3 e 4 para imuno-histoquímica (IHQ) e expressão gênica de COX-2 e c-KIT.

GRUPO	IHQ – COX-2	IHQ- c-KIT	EXPRESSÃO GÊNICA COX-2	EXPRESSÃO GÊNICA c-KIT
1	8	9	5	9
2	28	23	5	7
3	60	64	7	14
4	23	22	8	10

IHQ: Imuno-histoquímica; grupo 1: mamas normais, grupo 2: lesões benignas, grupo 3: carcinomas não metastáticos e grupo 4: carcinomas metastáticos.

4.3 Avaliação clínica das pacientes

Os animais foram caracterizados quanto aos parâmetros clínicos, tais como, idade, raça, tamanho tumoral, *status* nodal (presença ou ausência de metástase em linfonodo), *status* reprodutivo (castradas ou não castradas), presença ou ausência de ulceração, recidiva, uso de contraceptivos, presença ou ausência de pseudociese. Os parâmetros histopatológicos avaliados foram o tipo histológico e o grau de malignidade do tumor, de acordo com Cassali et al., (2011) e Nottingham modificado por Elston e Ellis (1998), respectivamente.

A avaliação clínica das pacientes atendidas no SOV foi realizada por meio de exame físico das mamas, sendo avaliado o tamanho da massa tumoral com um paquímetro, aspecto macroscópico como consistência, presença ou ausência de aderência à musculatura, ulceração, secreção da glândula mamária e inflamação.

4.3.1 Estadiamento Clínico

O estadiamento modificado baseou-se nos critérios descritos previamente pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e modificado por Lana et al. (2007) no sistema TNM que tem por objetivo avaliar o tamanho do tumor primário (T), o comprometimento dos linfonodos regionais (N) e a presença ou ausência de metástase à distância (M) (LANA et al., 2007) (Tabela 2).

Tabela 2. Estadiamento modificado das neoplasias mamárias de cadelas segundo os critérios descritos por Lana et al. (2007).

Estádio	Tumor (T)	Linfonodo regional (N)	Metástase (M)
I	T1 <3 cm	N0	M0
II	T2 3-5 cm	N0	M0
III	T3 > 5cm	N0	M0
IV	Qualquer T	N1	M0
V	Qualquer T	Qualquer N	M1

T: tamanho do tumor. N0: ausência de metástase em linfonodo regional, N1: presença de metástase em linfonodo regional, M0: ausência de metástase à distância, M1: presença de metástase à distância.

4.3.2 Exames de imagem

Foi realizado em todas as pacientes, radiografia de tórax em três projeções, ventro-dorsal (VD), latero-lateral direito (LLD) e latero-lateral esquerdo (LLE) e ultrassonografia abdominal para constatação de possíveis metástases, principalmente em pulmão, fígado e baço.

4.3.3 Exames laboratoriais e cirurgia

Foi avaliado também o estado geral destas pacientes, por meio da avaliação do hemograma, perfil bioquímico para análise sérica da função renal através da dosagem de creatinina e uréia, e para avaliação da função hepática, fosfatase alcalina (FA), alanina aminotransferase (ALT), cálcio, fósforo, albumina e proteínas totais.

As pacientes foram submetidas à mastectomia unilateral e nos casos de nódulos em ambas as cadeias mamárias, a cirurgia foi realizada em duas etapas, com intervalo de 40 dias entre elas. Na presença de metástase à distância no momento do diagnóstico, foi realizada apenas nodulectomia para fins de diagnóstico

do tumor e para promover qualidade de vida as pacientes, nos casos de tumores ulcerados.

Também foi realizada a exérese de linfonodos regionais, ou seja, o inguinal e, nos casos de aumento de volume, o axilar também foi removido para avaliação histopatológica de metástase. Assim, foi determinado o TNM e estadiamento clínico da neoplasia de cada paciente. Na presença de mais de um nódulo na cadeia mamária comprometida, foi considerado para a realização deste estudo o tumor de pior prognóstico, o qual foi baseado no estadiamento do tumor, tipo e grau histológico.

Os dados clínicos das pacientes dos grupos 2, 3 e 4 como raça, idade, *status* reprodutivo, pseudociese e uso de contraceptivos estão mostrados no Quadro 1 (Apêndice B). Os parâmetros clínicos referentes à recidiva, ulceração e tamanho tumoral, *status* nodal e tratamento dos animais dos grupos 3 e 4 estão no Quadro 1 (Apêndice C). Os dados de tipo histológico, grau de malignidade e estadiamento clínico das pacientes dos grupos 3 e 4 estão apresentados na Quadro 1 (Apêndice D).

4.3.4 Seguimento clínico

As pacientes submetidas a tratamento quimioterápico foram reavaliadas durante os retornos para a administração do fármaco e, ao término do tratamento a cada três meses. As pacientes que não tinham indicação à quimioterapia adjuvante ou cujo proprietário não concordou em sua realização, foram reavaliadas a cada três meses. Nas reavaliações foram realizados exame e ultrassonográfico de abdome e avaliação laboratorial, tais como descrito anteriormente. As pacientes do presente estudo tiveram um seguimento clínico mínimo de seis meses.

4.4 Macrodissecção e extração do RNA

As amostras de tecido congelado dos quatro grupos foram seccionadas com o auxílio de um criostato (Leica) através de cortes de congelamento sequenciais de 5 µm. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina e posteriormente analisadas em microscópio de luz (Leica). Para a composição dos grupos 3 e 4 foram selecionadas as amostras que continham mais de 80% de células neoplásicas.

As amostras foram submetidas à clivagem utilizando-se tubos com *bids* magnéticos no equipamento Precellys R (BioAmerica Inc, Florida, EUA). Em seguida procedeu-se extração do RNA através do protocolo de Trizol® (Invitrogen), conforme protocolo do laboratório Neogene, Departamento de Urologia, FMB, Unesp Botucatu/SP.

A concentração e a pureza do RNA foram avaliadas pelo espectrofotômetro (Nanodrop™ ND-8000, Thermo Scientific), enquanto a integridade do RNA foi avaliada pelo equipamento Bionalyzer kit para RNA 6000 Nano Series (Agilent).

4.5 Transcrição reversa

Para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico, o RNA total extraído foi tratado com DNase. A transcrição reversa do RNA para cDNA foi realizada com 1 µg de RNA total e com a enzima Super-script III™ Reverse Transcriptase (Life Technologies). Para este protocolo utilizou-se 1 µL de oligodT (500 µg/mL), 1 µL de *random primers* (100 µg/mL) e 1 µL de dNTP. A mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos e a seguir, foram adicionados 4 µL de tampão de transcrição 5x, 1 µL de DTT 0,1M e, por último, foi acrescentado 1 µL da enzima Super-script III (200U/ µL) e realizada a incubação a 25°C durante 5 minutos, 50°C por 1 hora e meia, e finalmente 70°C por 15 minutos. Ao final da transcrição, o cDNA foi mantido a -20°C.

4.6 Análise da expressão gênica

Foram testados cinco genes de referência candidatos a normalizadores (*RPS5*, *RPS19*, *RPL8*, *HPRT* e *ACTB*), os quais já haviam sido estudados anteriormente (BRINKHOF et al., 2006). Para a realização do pré-teste foram utilizadas amostras de carcinomas mamários (10 de 34) e amostras de mamas normais caninas (3 de 10), as quais apresentavam maior quantidade e melhor qualidade de RNA. Os seis genes avaliados demonstraram boa estabilidade (M) de expressão para os transcritos testados, segundo o coeficiente de estabilidade de expressão abaixo do limiar de 1,5 sugerido pelo programa geNorm.

O coeficiente de estabilidade de expressão (M) é determinado a partir de dois genes de referência considerados ideais por possuírem razões de expressão idênticas em todas as amostras analisadas. O programa geNorm avalia a razão de

expressão de cada gene de referência em relação aos demais sempre aos pares, permitindo a exclusão dos transcritos menos estáveis (VANDESOMPELE et al., 2002).

Nesta análise, o gene *RPS5* apresentou expressão mais estável ($M= 0,430$), enquanto o gene *RPL8*, mostrou ser o menos estável ($M= 0,537$). Assim, o programa geNorm indicou o uso do *RPS5*, *RPS19* e do *ACTB* como os melhores genes de referência para a normalização da expressão dos genes alvos nos carcinomas mamários (Figura 1).

Os genes referência foram também estimados pelo cálculo do desvio padrão (valor ideal $<0,150$) da relação dos fatores de normalização com a adição de um novo transcrito ao grupo prévio (Figura 2).

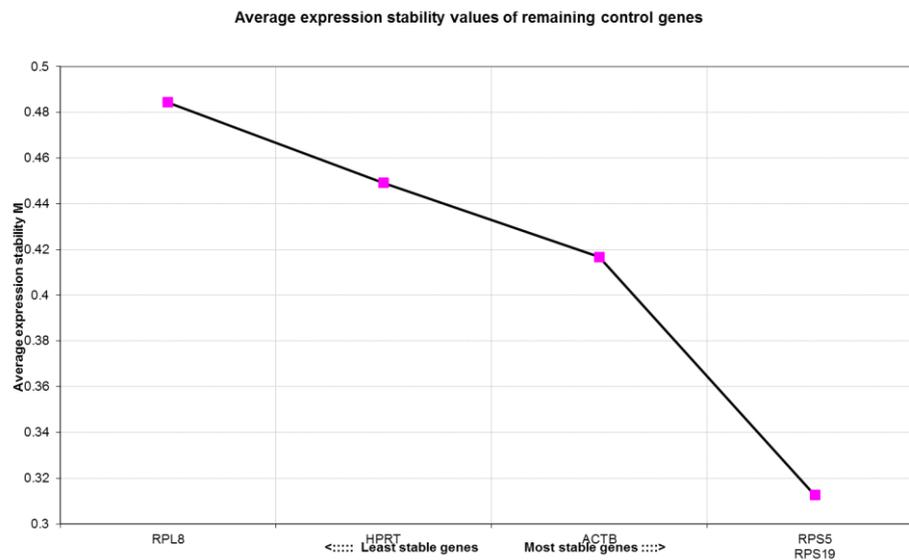


Figura 1. Média do coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos genes de referência.

Após a seleção dos três genes referência mais estáveis *RPS5*, *RPS19* e *ACTB*, mínimo proposto por Vandesompele et al. (2002), todas as amostras foram analisadas para os genes alvos. A eficiência dos genes alvo (*COX-2* e *c-KIT*) e dos genes endógenos selecionados foram de 100%.

A seguir, foi estabelecido o QR das amostras para cada gene alvo, obtido pela análise do RT-qPCR. As amostras que não apresentaram resultados confiáveis para cada gene alvo testado foram excluídas da análise final e devido a isso o número de amostras nos grupos de expressão gênica é diferente.

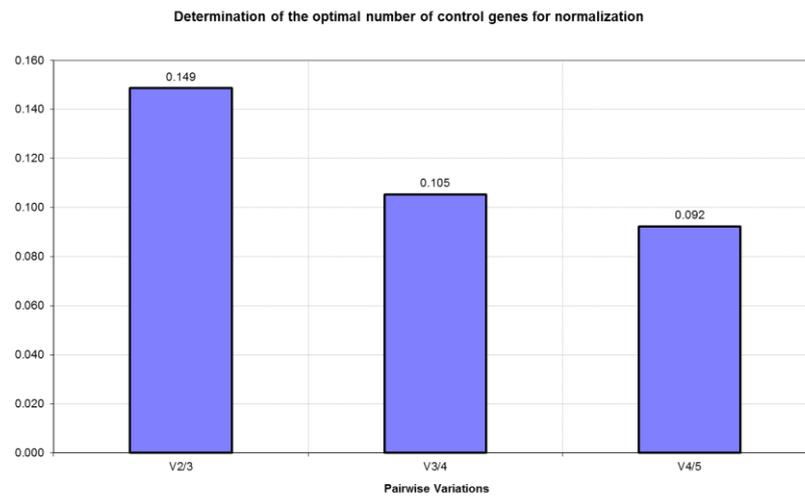


Figura 2. Determinação do número adequado de genes de referência para normalização da expressão dos genes alvos, demonstrando que com o uso dos três transcritos já se obtém uma normalização confiável.

4.7 RT-PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados no flanqueamento da amplificação dos fragmentos dos genes que foram utilizados neste experimento (*COX-2* e *c-KIT*) foram desenhados e para todos utilizou-se o software Primer Express 2.0 (Applied Biosystems). Foram realizadas reações com genes endógenos ou normalizadores e com os genes alvo para validação do oligonucleotídeo iniciador. Os genes de referência escolhidos foram (*RPS19*, *RPS5* e *ACTB*) de acordo com Brinkhof et al. (2006) (Tabela 3).

Tabela 3: Sequências *forward* (F) e *reverse* (R) dos primers confeccionados para amplificação dos genes.

GENE	FORWARD	REVERSE	AMPLICON
<i>c-KIT</i>	5' CCAAGTGTGTGGTTGCAGGAT 3'	5' CTCAGCTCCTGGACAGAAATACC 3'	150 pb
<i>COX-2</i>	5'GCTTCGATTGACCAGAGCAG3'	5'CACCATAAAGGGCCTCCAAC3'	150 pb
<i>RPS19</i>	5'-CCTTCCTCAAAAAGTCTGGG-3'	5'-GTTCTCATCGTAGGGAGCAAG-3'	150 pb
<i>RPS5</i>	5'-TCACTGGTGAGAACCCCCT-3'	5'-CCTGATTCACACGGCGTAG-3'	150 pb
<i>ACTB</i>	5'-GGCATCCTGACCCTCAAGTA-3'	5'-CTTCTCCATGTCGTCCCAAGT-3'	150 pb

As reações de RT-qPCR foram padronizadas para cada iniciador e também, foram determinadas as eficiências das reações para cada par de iniciadores utilizando curvas-padrão a partir do cDNA de amostra controle.

As reações de amplificação foram realizadas em placas de 96 poços, contendo duplicatas de cada amostra, controle negativo e uma amostra tumoral sabidamente positiva como controle positivo. Em cada poço foi adicionado 11,5 µL de solução composta por 6,25 µL do reagente Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,3 µL de cada iniciador (*forward* e *reverse*) a 10 Mm e 1 µL de cDNA (diluição de 1:10).

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.

A determinação da expressão dos genes alvos estudados foi realizada a partir da quantificação relativa (QR), a qual foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, método de Livak; Schmittgen (2001). Assim, genes que apresentaram QR ≥ 2 foram considerados genes regulados positivamente, enquanto genes que apresentaram QR $\leq 0,5$, foram considerados genes regulados negativamente.

4.8 Análise imuno-histoquímica

Para a análise da imunomarcagem da COX-2 e do c-KIT foi utilizada a técnica de imuno-histoquímica em cortes de glândula mamária incluídos em parafina, referentes aos quatro grupos testados para os respectivos anticorpos.

A técnica de imuno-histoquímica empregada seguiu o protocolo do Laboratório de Imuno-histoquímica do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Unesp de Botucatu e foi realizada neste mesmo estabelecimento.

As amostras foram seccionadas em cortes de 5 µm de espessura e montadas em lâminas de vidro carregadas eletricamente. Estes cortes foram submetidos à desparafinização e reidratação. A recuperação antigênica para ambos os anticorpos primários foi realizada com tampão Citrato pH 6,0 em panela de pressão (Pascal, DAKO), de acordo com o programa do fabricante. O bloqueio da peroxidase

endógena foi feito com solução de água oxigenada 8% em metanol por 20 minutos e, em seguida foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas com solução de leite em pó desnatado (Molico[®]) 3% por 1 hora a 27°C. As lâminas foram incubadas em câmara úmida com o anticorpo primário por duas horas a 27°C para o c-KIT e 18 horas a 4° C para COX-2 (tabela 4).

Tabela 4: Anticorpo primário utilizado com especificação de clone, diluição e fabricante.

Anticorpo anti	Clone	Diluição	Fabricante
COX-2 (M)	CX-294	1:50	Dako
C-KIT (P)	CD117	1:100	Dako

M: anticorpo monoclonal e P: anticorpo policlonal

O complexo secundário utilizado foi o sistema de polímero Advance HRP (*Dako K4068*) e todas as lâminas foram lavadas com solução tampão TRIS pH 7,4 entre as etapas. Para revelação das reações foi empregada solução pronta para uso de cromógeno DAB (*Dako K3468*) por cinco minutos. Todas as lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris por dois minutos, lavadas em água corrente por 10 minutos, desidratadas e montadas.

4.8.1 Contagem das células marcadas

A avaliação das amostras foi feita em microscópio óptico (*Leica DMLD*), com objetiva de 40X, com auxílio do programa de análise de imagens *QWin v. 3.0 Leica* e uma câmera digital *Leica DFC*. Para a análise, foram localizados os focos de cada lesão e atribuídas escalas de marcação para cada um dos anticorpos utilizados. As marcações para COX-2 e c-KIT foram avaliadas considerando-se a intensidade de marcação, intensa (3), moderada (2), fraca (1) e ausente (0) e extensão da imunomarcação, por meio de escore: 0 – nenhuma célula marcada, 1 - até 25% das células positivas; 2 – 26 a 50% das células positivas; 3 – 51 a 75% das células positivas e 4 - >75% das células positivas. O valor final do escore variou de 0 a 12 e foi obtido pela multiplicação do valor da distribuição pelo da intensidade. Em seguida as amostras foram divididas em grupos de baixo (0-5) e alto (6-12) escore final (LAVALLE et al., 2012).

Durante a avaliação das lâminas, foram consideradas as áreas de maior malignidade e indiferenciação. No caso dos carcinomas em tumor misto e complexo considerou-se somente a marcação no componente epitelial. As mamas normais foram consideradas como padrão de normalidade de imunomarcação. Os tecidos utilizados como controle positivo estão descritos na tabela 5.

Tabela 5. Tecido utilizado como controle positivo, localização, escore e intensidade da imunomarcação para os anticorpos testados.

Anticorpo	Controle positivo	Localização da marcação	Avaliação da marcação	Escore	Intensidade
c-KIT	Mastocitoma cutâneo	Membranosa e citoplasmática	Escore/Intensidade	4	2
COX-2	Carcinoma mamário sabidamente marcado	Citoplasmática	Escore/Intensidade	4	3

4.9 Análise estatística

Para as associações entre os valores de expressão gênica (*COX-2* e *c-KIT*) nos grupos amostrais e nas variáveis clínicas e epidemiológicas foram usados os testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

Na associação da imunomarcação (*COX-2* e *c-KIT*) com os grupos amostrais e as variáveis clínicas e epidemiológicas foram usados os testes de Man-Whitney ou Kruskal-Wallis. A associação da imunomarcação com o escore e intensidade e as variáveis clínicas foi utilizado o teste G de Williams. A avaliação do escore final e os grupos foi avaliado pelo teste de χ^2 de Pearson.

O teste de Spearman foi aplicado para análises de correlação. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos com $p < 0,05$. Para a realização das análises estatísticas foram utilizados os programas EpilInfo 7 (DEAN et al., 2011) e BioEstat 5 (AYRES et al., 2007).

5. RESULTADOS

5.1 Dados epidemiológicos

As pacientes do presente estudo apresentaram faixa etária média de 10,4 anos ($10,4 \pm 2,7$ anos). Com relação à raça, 30,6% eram cães sem raça definida, seguidos pelos cães da raça poodle com 19,4%, Cocker Spaniel com 8,9% e Daschund 5,6%.

Nos animais deste estudo, 64,6% (64/99 casos) não eram castradas, das quais, 12,5% (8/64 casos) eram cadelas com lesões benignas e 87,5% (56/64 casos) com carcinomas. Dos carcinomas, 75% (42/56 casos) eram carcinomas não metastáticos e 25% (14/56 casos) carcinomas metastáticos. Além disso, 49% (46/94 casos) apresentavam histórico de pseudocirose. Em relação à administração de progestágenos exógenos, 11,76% (10/85 casos) das pacientes com neoplasias malignas e 9,1% (1/9 casos) com tumores benignos fizeram uso de progestágenos exógenos.

Quanto ao grau de malignidade, 72,9% das cadelas com carcinomas não metastáticos apresentaram tumores grau I e 52,2% das cadelas com carcinoma metastático apresentaram tumores grau II. Além disso, 87,5% (7/8 casos) dos tumores que recidivaram eram grau II e III.

Com relação ao diagnóstico histopatológico, 24,20% (30/124 casos) eram tumores benignos, incluindo 53,33% de adenomas (16/30 casos), 20% de tumores mistos benignos e hiperplasias mamárias (6/30 casos); e 3,33% de papiloma ductal e fibroadenoma (1/30 casos). Dos carcinomas mamários, 75,53% (71/94 casos) eram carcinomas não metastáticos e 24,47% (23/94 casos) eram carcinomas metastáticos. Dentre os tipos histológicos dos carcinomas não metastáticos, 47,89% (34/71 casos) eram carcinomas em tumor misto, 29,6% (21/71 casos) carcinomas tubulares, 9,86% (7/71 casos) carcinomas papilares e sólidos, 1,40% (1/71 casos) carcinomas complexos e carcinomas *in situ*.

Já nos carcinomas metastáticos o tipo histológico mais frequente foi 26,1 % (6/23 casos) carcinomas sólidos, 21,73% (5/23 casos) carcinomas tubulares, 17,4%

(4/23 casos) carcinomas em tumor misto, 13,04% (3/23 casos) carcinomas papilares, 8,7% (2/23 casos) carcinomas complexos e anaplásicos e 4,35% (1/23 casos) carcinoma micropapilar.

Com relação ao tratamento quimioterápico, 4,22% (3/71 casos) das cadelas com carcinoma não metastático foram submetidas à quimioterapia com doxorrubicina e carboplatina (2 casos) e doxorrubicina (1 caso). Já as pacientes com carcinoma metastático, 34,78% (8/23 casos) foram submetidas à quimioterapia com os protocolos carboplatina e doxorrubicina (1 caso), carboplatina e piroxicam (dois casos), carboplatina e gencitabina (2 casos), doxorrubicina (dois casos) e carboplatina (um caso).

5.2 Associação dos dados epidemiológicos com os grupos G2, G3 e G4

Na análise da associação das variáveis epidemiológicas com os grupos (G2, G3 e G4) não foi observada associação significativa entre a faixa etária, *status* reprodutivo (castração), uso de contraceptivos, pseudociese, raça e os grupos do presente estudo, como demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6. Associação entre os dados epidemiológicos e os grupos G2, G3 e G4. Os Valores de P menores que 0,05 indicam associações significativas entre os grupos e os parâmetros avaliados pelo teste G de Williams. Jaboticabal, 2014.

Variável	G2		G3		G4		Estatísticas	
	Fi	fi	Fi	fi	Fi	fi	G	P
Faixa etária								
Faixa 1 (até 6 anos)	0	0,0	2	2,8	1	4,3		
Faixa 2 (até 11 anos)	9	100,0	44	62,0	12	52,2	6,51	0,1636
Faixa 3 (mais de 11 anos)	0	0,0	25	35,2	10	43,5		
Status Reprodutivo (Castrada)								
Não	8	88,9	42	61,8	14	63,6	2,57	0,2765
Sim	1	11,1	26	38,2	8	36,4		
Uso de contraceptivo								
Não	8	88,9	55	85,9	20	95,2	1,32	0,52
Sim	1	11,1	9	14,1	1	4,8		
Pseudociese								
Não	4	44,4	35	54,7	9	42,9	1,06	0,59
Sim	5	55,6	29	45,3	12	57,1		
Raça								
CRD	7	63,6	49	69,0	16	69,6	0,14	0,93
SRD	4	36,4	22	31,0	7	30,4		

CRD- Cães com raça definida e SRD – Cães sem raça definida.

5.3 Associação dos dados clínicos com os grupos G2, G3 e G4

As variáveis clínicas analisadas foram grau de malignidade, tamanho do tumor (T), *status* nodal (N), metástase à distância (M), estadiamento clínico (TNM), tempo de evolução do tumor, ulceração, velocidade de crescimento e diagnóstico histopatológico.

Foi observada associação significativa dos grupos com o grau de malignidade ($P=0,0071$), sendo possível observar que 72,9% dos carcinomas não metastáticos tinham tumores grau I e 52,2% dos carcinomas metastáticos apresentaram grau II de malignidade (Figura 4 A).

Com relação ao tamanho do tumor (T) também foi observada associação significativa, uma vez que 90% das lesões benignas e 64,3% dos carcinomas não metastáticos apresentaram tumores menores que 3 cm (T1) e 56,5% dos carcinomas metastáticos apresentaram tumores maiores que 5 cm (T3) ($P=0,0019$) (Figura 4 B).

Na avaliação do *status* nodal, 60,9% dos carcinomas metastáticos apresentaram metástases em linfonodos regionais ($P=0,0001$) (Figura 2C). Já a metástase à distância foi observada em 47,8% dos carcinomas metastáticos ($P=0,0001$) (Figura 4 D).

Com relação ao estadiamento clínico (TNM), 90% das cadelas com lesões benignas apresentaram-se no estágio I, 64,3% das cadelas com carcinomas não metastáticos no estágio I e 56,5% das cadelas com carcinoma metastático no estágio V ($P=0,0001$) (Figura 4 E).

Considerando que o tempo de evolução do tumor foi de até 6 meses em 100% das lesões benignas, 47,4% dos carcinomas não metastáticos e 54,5% dos carcinomas metastáticos, esta variável não mostrou associação significativa com os grupos analisados. A recidiva tumoral foi observada em 5,9% dos carcinomas não metastáticos e 18,2% dos carcinomas metastáticos não sendo observada diferença significativa (Figura 4 F).

Foi observada associação significativa com presença de ulceração e os grupos, visto que 100% das lesões benignas não apresentavam tumores ulcerados e 7,4% dos carcinomas não metastáticos e em 31,8% dos carcinomas metastáticos ($P=0,0047$) apresentavam tumores ulcerados (Figura 4 G). Não foi observada

associação significativa com a velocidade de crescimento do tumor na análise entre os grupos.

Os tumores dos grupos 3 e 4 foram divididos de acordo com o diagnóstico em carcinoma simples, carcinoma complexo e carcinoma em tumor misto. 50,7% dos carcinomas não metastáticos (grupo 3) eram carcinomas simples e 73,9% dos carcinomas metastáticos (grupo 4) eram carcinomas simples ($P= 0,0001$) (Figura 4 H). A descrição das frequências absoluta e relativa dos dados clínicos e histopatológicos pode ser observada na tabela 7.

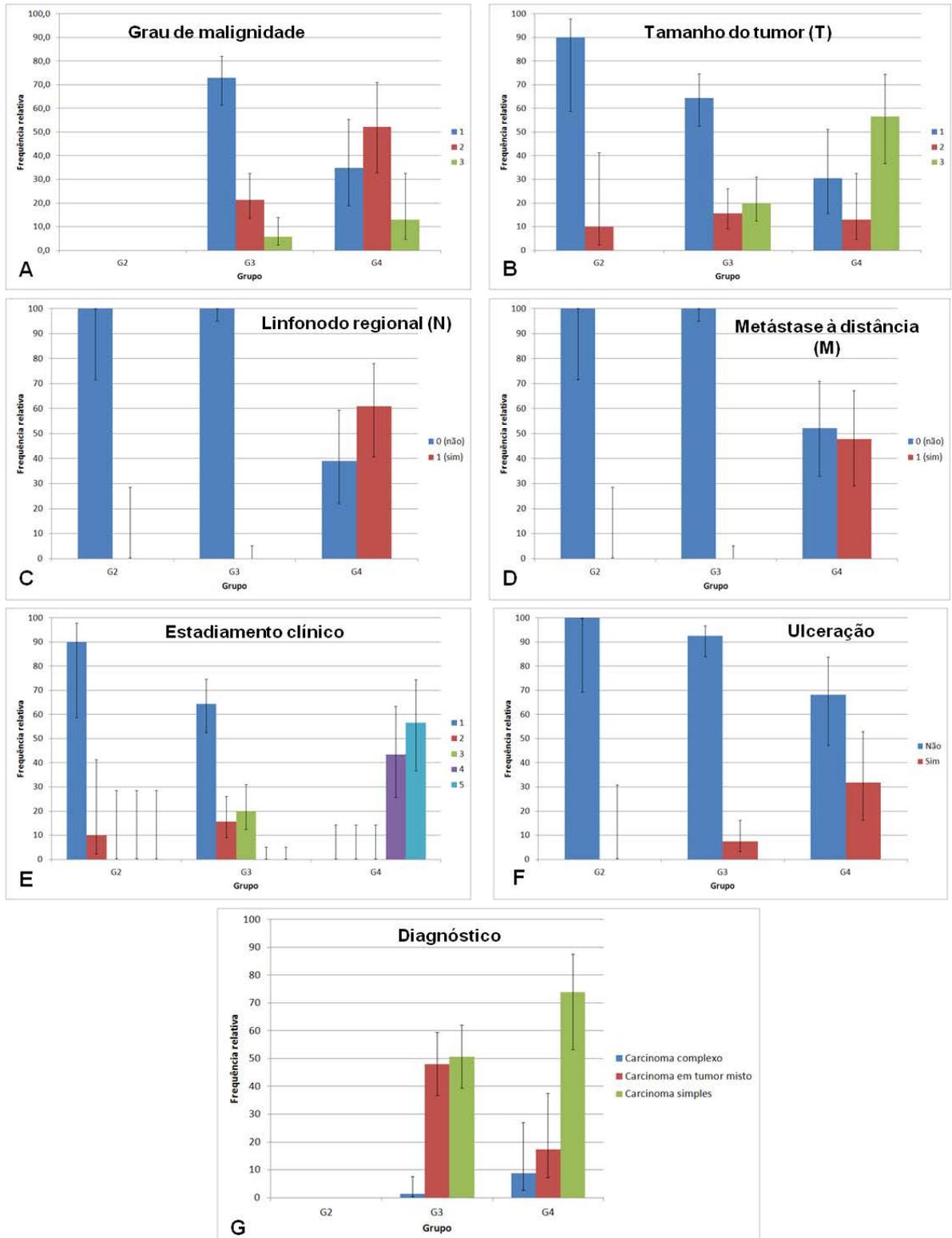


Figura 3. Frequência relativa, intervalo de confiança 95% e associação entre os dados clínicos com os grupos G2, G3, G4. **A.** Grau de malignidade (1, 2 e 3) ($p=0,0071$); **B.** Tamanho do tumor (T) ($T1=< 3$ cm, $T2= 3-5$ cm e $T3= > 5$ cm) ($p=0,0019$); **C.** Linfonodo regional (N) (0= sem metástase em linfonodo e 1= com metástase em linfonodo) ($p=0,0001$); **D.** Metástase à distância (M) (0= sem metástase à distância e 1= com

metástase à distância) ($p=0,0001$); **E.** Estadiamento (TNM) (Estádio 1, 2, 3, 4 e 5) ($p=0,0001$); **F.** Ulceração tumoral (Não= sem ulceração e Sim= com ulceração) ($p=0,0047$); **G.** Diagnóstico histopatológico ($p=0,0001$). Jaboticabal, 2014.

Tabela 7. Associação entre os dados clínicos e histopatológicos com os grupos G2, G3 e G4. Valores de P menores que 0,05 indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste G de Williams. Jaboticabal, 2014.

Variáveis	G2		G3		G4		Estatísticas	
	Fi	fi	Fi	fi	Fi	fi	G	P
Grau de malignidade								
1	0	100,0	51	72,9	8	34,8	9,88	0,0071
2	0	100,0	15	21,4	12	52,2		
3	0	100,0	4	5,7	3	13,0		
Tamanho do tumor (cm)							17,07	0,0019
1	9	90,0	45	64,3	7	30,4		
2	1	10,0	11	15,7	3	13,0		
3	0	0,0	14	20,0	13	56,5		
Linfonodo Regional-N							56,4	0,0001
0 (não)	10	100,0	70	100,0	9	39,1		
1 (sim)	0	0,0	0	0,0	14	60,9		
Mestastase Distancia - M							42,8	0,0001
0 (não)	10	100,0	70	100,0	12	52,2		
1 (sim)	0	0,0	0	0,0	11	47,8		
TNM (Estadiamento)							106,9	0,0001
1	9	90,0	45	64,3	0	0,0		
2	1	10,0	11	15,7	0	0,0		
3	0	0,0	14	20,0	0	0,0		
4	0	0,0	0	0,0	10	43,5		
5	0	0,0	0	0,0	13	56,5		
Evolução							12,8	0,1179
Faixa 1 (até 6 meses)	9	100,0	27	47,4	12	54,5		
Faixa 2 (até 12 meses)	0	0,0	16	28,1	6	27,3		
Faixa 3 (até 18 meses)	0	0,0	3	5,3	0	0,0		
Faixa 4 (até 24 meses)	0	0,0	3	5,3	3	13,6		
Faixa 5 (mais que 24 meses)	0	0,0	8	14,0	1	4,5		
Recidiva tumoral							4,25	0,1191
Não	9	100,0	64	94,1	18	81,8		
Sim	0	0,0	4	5,9	4	18,2		
Ulceração							10,70	0,0047
Não	9	100,0	63	92,6	15	68,2		
Sim	0	0,0	5	7,4	7	31,8		
Crescimento							1,38	0,5016
Lento	5	55,6	39	63,9	11	50,0		
Rápido	4	44,4	22	36,1	11	50,0		
Diagnóstico							33,74	0,0001
Carcinoma complexo	0	0,00	1	1,4	2	8,7		
Carcinoma em tumor misto	0	0,00	34	47,9	4	17,4		
Carcinoma simples	0	0,00	36	50,7	17	73,9		

5.4 Expressão gênica de COX-2 e c-KIT

Foi avaliada a expressão dos genes alvo entre as amostras dos grupos 1, 2, 3 e 4 e, posteriormente, comparando o grupo 1 com os grupos 3 e 4 unidos como um grupo único de carcinomas.

Foi verificada diferença da expressão de transcritos de COX-2 nas mamas normais e nos carcinomas metastáticos quando comparados com as amostras de tumores benignos e carcinomas não metastáticos, com aumento da expressão de COX-2 nos carcinomas metastáticos e não metastáticos em relação às mamas normais. Mesmo não sendo observada diferença estatística do grupo de carcinomas (G3 e G4) com o de lesões mamárias benignas (G2) notou-se um aumento nos níveis de transcrito com a malignidade da lesão (Tabela 8 e Figura 5).

Tabela 8. Mediana (percentil 25 – percentil 75) para os valores da RT-qPCR (COX-2), segundo os grupos G1, G2, G3 e G4. Medianas seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis. Jaboticabal, 2014.

Grupo	Mediana (P25-P75)
G1	0,93 ^a (0,63-0,95)
G2	1,43 ^{ba} (1,01-6,73)
G3	2,91 ^{ba} (1,70-4,79)
G4	5,51 ^d (2,63-11,12)

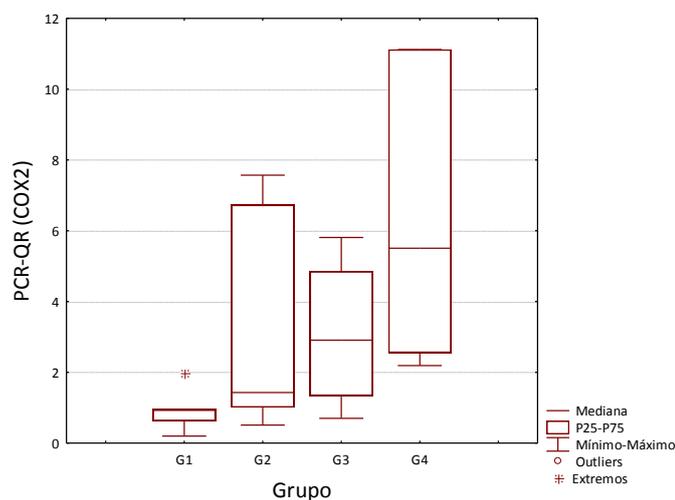


Figura 4. Valor mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e valor máximo da RT-qPCR (QR) dos transcritos de COX-2, segundo os grupos G1, G2, G3 e G4. Jaboticabal, 2014.

Quando unificado o grupo de tumores (carcinomas metastáticos e não metastáticos) em relação às mamas normais também foi observada diferença significativa para a expressão do gene COX-2 (Tabela 9 e Figura 6).

Tabela 9: Mediana (percentil 25 – percentil 75) para os valores da RT-qPCR (COX-2), segundo o grupo G1 (mamas normais) e G3 + G4 (carcinomas não metastáticos e carcinomas metastáticos). Medianas seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicaram diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney. Jaboticabal, 2014.

Grupo	Mediana (P25-P75)
G1	0,93 ^a (0,63-0,95)
G3+G4	3,58 ^b (2,30-6,62)

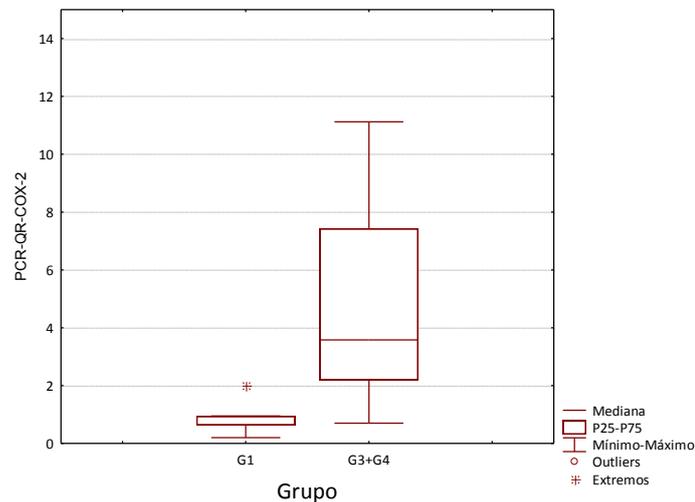


Figura 5: Valor mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e valor máximo da RT-qPCR (QR) para o gene COX-2, segundo o grupo G1 e G3+G4. Jaboticabal, 2014.

Na análise dos níveis de transcritos para *c-KIT* não foi verificada diferença da expressão entre os quatro grupos (Tabela 10).

Tabela 10: Mediana (percentil 25 – percentil 75) para os valores da RT-qPCR (*c-KIT*), segundo os grupos G1, G2, G3 e G4. Medianas seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis. Jaboticabal, 2014.

Grupo	Mediana (P25-P75)
G1	1,82 ^a (1,07-2,42)
G2	0,36 ^a (0,17-1,99)
G3	1,33 ^a (0,67-2,36)
G4	0,60 ^a (0,40-1,09)

Quando unificados os grupos de tumores (carcinomas metastáticos e não metastáticos) em relação às mamas normais também não foi observada diferença significativa para expressão do gene *c-KIT* (Tabela 11).

Tabela 11. Mediana (percentil 25 – percentil 75) para os valores da RT-qPCR (*c-KIT*), segundo o grupo G1 (mamas normais) e G3 + G4 (carcinomas não metastáticos e carcinomas metastáticos). Medianas seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicaram diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney. Jaboticabal, 2014.

Grupo	Mediana (P25-P75)
G1	1,82 ^a (1,07-2,42)
G3+G4	1,01 ^a (0,48-1,66)

5.5 Correlação entre os resultados da expressão gênica de *COX-2* e *c-KIT*

Após a análise de cada gene, foi feita uma análise de correlação de expressão entre os genes alvos *COX-2* e *c-KIT* utilizando o teste de Spearman, não sendo observada diferença significativa (Tabela 12).

Tabela 12. Análise de correlação da expressão relativa dos genes alvos (*COX-2* e *c-KIT*). Número de pares de amostras, coeficientes de correlação de Spearman (R) e valores de P para RT-qPCR (*COX-2*) x RT-qPCR (*c-KIT*), para todas as amostras (independente dos grupos) e para cada um dos grupos. Jaboticabal, 2014.

Grupos avaliados	Número de amostras	R	Valor de P
Todos	22	-0,23	0,3058
G1	4	0,20	0,7948
G2	5	0,30	0,6238
G3	5	-0,10	0,8729
G4	8	-0,46	0,2571

5.6 Associação entre a expressão gênica dos genes *COX-2* e *c-KIT* com as variáveis clínicas e histopatológicas

Para avaliar se os transcritos dos genes estudados poderiam estar associados com características de pior prognóstico ou outra característica clínica, os níveis de expressão destes genes foram comparados com dados clínicos e histopatológicos das pacientes, tais como, grau de malignidade do tumor, tamanho do tumor (T), status nodal (N), metástase à distância (M), estadiamento (TNM), tempo de evolução do tumor, recidiva, ulceração tumoral, velocidade de crescimento e diagnóstico histopatológico, considerando apenas os grupos tumorais (2, 3 e 4).

A expressão gênica do gene COX-2 não foi associada com nenhum dos parâmetros clínicos e histopatológicos das pacientes como demonstrado na Tabela 13.

Tabela 13. Mediana (percentil 25 – percentil 75) para os valores da RT-qPCR (QR) para o gene COX-2, segundo os grupos e variáveis clínicas. Para um mesmo grupo, valores de mediana seguidos de letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as faixas de mensuração da variável clínica, pelos testes de Man-Whitney ou Kruskal-Wallis. Jaboticabal, 2014.

Variável	Grupos		
Grau de malignidade	G2	G3	G4
1	-	2,5 ^a (1,3 - 4,9)	3,1 ^a (2,4 - 7,4)
2	-	4,7 ^a (4,7 - 4,7)	21,7 ^a (11,1 - 32,2)
3	-	-	-
Tumor (cm)			
1	1,4 ^a (1,0 - 6,7)	4,9 ^a (2,1 - 5,8)	32,2 ^a (32,2 - 32,2)
2	nd	2,1 ^a (1,3 - 2,9)	nd
3	nd	2,7 ^a (0,7 - 4,7)	3,6 ^a (2,4 - 11,1)
Linfonodo regional			
0	1,4 ^a (1,0 - 6,7)	2,9 ^a (1,3 - 4,9)	17,9 ^a (3,6 - 32,2)
1	nd	nd	5,1 ^a (2,4 - 11,1)
Metastase à distância			
0	1,4 ^a (1,0 - 6,7)	2,9 ^a (1,3 - 4,9)	2,7 ^a (2,2 - 11,1)
1	nd	nd	7,4 ^a (3,6 - 11,1)
TNM (Estadiamento)			
1	1,4 ^a (1,0 - 6,7)	4,9 ^a (2,1 - 5,8)	nd
2	nd	2,1 ^a (1,3 - 2,9)	nd
3	nd	2,7 ^a (0,7 - 4,7)	nd
4	nd	nd	2,7 ^a (2,2 - 11,1)
5	nd	nd	7,4 ^a (3,6 - 11,1)
Faixas de evolução			
Faixa 1 (até 6 meses)	1,0 ^a (0,5 - 6,7)	2,9 ^a (1,3 - 4,9)	3,1 ^a (2,4 - 7,4)
Faixa 2 (até 12 meses)	nd	4,7 ^a (4,7 - 4,7)	nd
Faixa 3 (até 18 meses)	nd	nd	nd
Faixa 4 (até 24 meses)	nd	nd	11,1 ^a (11,1 - 11,1)
Faixa 5 (mais que 24 meses)	nd	2,1 ^a (2,1 - 2,1)	32,2 ^a (32,2 - 32,2)
Recidiva tumoral			
Não	1,2 ^a (0,8 - 4,1)	2,9 ^a (1,3 - 4,9)	5,5 ^a (2,7 - 11,1)
Sim	nd	nd	2,4 ^a (2,4 - 2,4)
Ulceração			
Não	1,4 ^a (1,0 - 6,7)	2,9 ^a (1,3 - 4,9)	3,6 ^a (2,7 - 11,1)
Sim	0,5 ^a (0,5 - 0,5)	nd	4,8 ^a (2,2 - 7,4)
Crescimento			
Lento	nd	3,5 ^a (1,4 - 5,3)	32,2 ^a (32,2 - 32,2)
Progressivo	1,0 ^a (1,0-1,0)	nd	nd
Rápido	3,6 ^a (0,5-6,7)	2,9 ^a (1,3-4,7)	3,1 ^a (2,4-7,4)
Diagnóstico			
Carcinoma complexo	-	nd	11,1 ^a (11,1 - 11,1)
Carcinoma em tumor misto	-	3,5 ^a (1,7 - 5,3)	2,4 ^a (2,2-2,7)
Carcinoma simples	-	2,9 ^a (0,7-4,7)	7,4 ^a (3,6-11,1)

A expressão gênica do gene *c-KIT* também não foi associada com nenhum dos parâmetros clínicos e histopatológicos das pacientes (Tabela 14).

Tabela 14: Mediana (percentil 25 – percentil 75) para os valores da RT-qPCR (QR) para o gene *c-KIT*, segundo os grupos e variáveis clínicas. Para um mesmo grupo, valores de mediana seguidos de letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as faixas de mensuração da variável clínica, pelos testes de Man-Whitney ou Kruskal-Wallis. Jaboticabal, 2014.

Variável	Grupos		
	G2	G3	G4
Grau de malignidade			
1	-	1,1 ^a (0,6-2,3)	0,9 ^a (0,4 - 1,3)
2	-	4,4 ^a (1,6 - 4,7)	0,6 ^a (0,3 - 0,8)
3	-	0,3 ^a (0,3 - 0,3)	0,8 ^a (0,4 - 1,1)
Tumor (cm)			
1	0,4 ^a (0,1 - 3,5)	1,1 ^a (0,6 - 2,0)	0,7 ^a (0,4 - 1,0)
2	nd	1,5 ^a (0,8 - 2,3)	nd
3	nd	4,7 ^a (0,3 - 10,0)	0,6 (0,4 - 1,2)
Linfonodo regional			
0	0,4 ^a (0,1 - 3,5)	1,3 ^a (0,6 - 2,4)	0,7 ^a (0,4 - 1,5)
1	nd	nd	0,5 ^a (0,3 - 1,1)
Metastase à distância			
0	0,4 ^a (0,1 - 3,5)	1,3 ^a (0,6 - 2,4)	0,7 ^a (0,4 - 1,1)
1	nd	nd	0,6 ^a (0,4 - 1,1)
TNM (Estadiamento)			
1	0,4 ^a (0,1 - 3,5)	1,1 ^a (0,6 - 2,0)	nd
2	nd	1,5 ^a (0,8 - 2,3)	nd
3	nd	4,7 ^a (0,3 - 10,0)	nd
4	nd	nd	0,7 ^a (0,4 - 1,1)
5	nd	nd	0,6 ^a (0,4 - 1,1)
Faixas de evolução			
Faixa 1 (até 6 meses)	1,9 ^a (0,3 - 4,1)	2,0 ^a (0,8 - 2,4)	1,0 ^a (0,3 - 1,2)
Faixa 2 (até 12 meses)	nd	2,6 ^a (0,6 - 4,7)	0,7 ^a (0,7 - 0,7)
Faixa 3 (até 18 meses)	nd	nd	nd
Faixa 4 (até 24 meses)	nd	nd	0,5 ^a (0,5 - 0,5)
Faixa 5 (mais que 24 meses)	nd	1,1 ^a (0,6 - 1,6)	0,4 ^a (0,4 - 0,4)
Recidiva tumoral			
Não	0,4 ^a (0,2 - 3,5)	0,8 ^a (0,6 - 2,4)	0,6 ^a (0,4 - 1,1)
Sim	nd	1,6 ^a (1,1 - 4,4)	1,1 ^a (1,1 - 1,1)
Ulceração			
Não	1,9 ^a (0,2 - 4,1)	1,6 ^a (0,8 - 2,4)	0,7 ^a (0,4 - 1,1)
Sim	0,2 ^a (0,2 - 0,2)	nd	0,7 ^a (0,4 - 1,2)
Crescimento			
Lento	nd	2,0 ^a (0,6 - 4,4)	0,7 ^a (0,4 - 1,0)
Progressivo	3,5 ^a (3,5 - 3,5)	nd	nd
Rápido	0,4 ^a (0,2 - 4,8)	2,0 ^a (0,8 - 2,3)	0,8 ^a (0,4 - 1,2)
Diagnóstico			
Carcinoma complexo	-	nd	0,7 ^a (0,5 - 1,0)
Carcinoma em tumor misto	-	1,3 ^a (0,6 - 2,0)	0,8 ^a (0,3 - 1,2)
Carcinoma simples	-	1,7 ^a (0,5 - 4,5)	0,6 ^a (0,4 - 1,1)

5.7 Imunomarcção de COX-2 e c-KIT

O padrão de imunomarcção da proteína COX-2 foi citoplasmática em todas as amostras de tumores mamários e mamas normais (Figura 7).

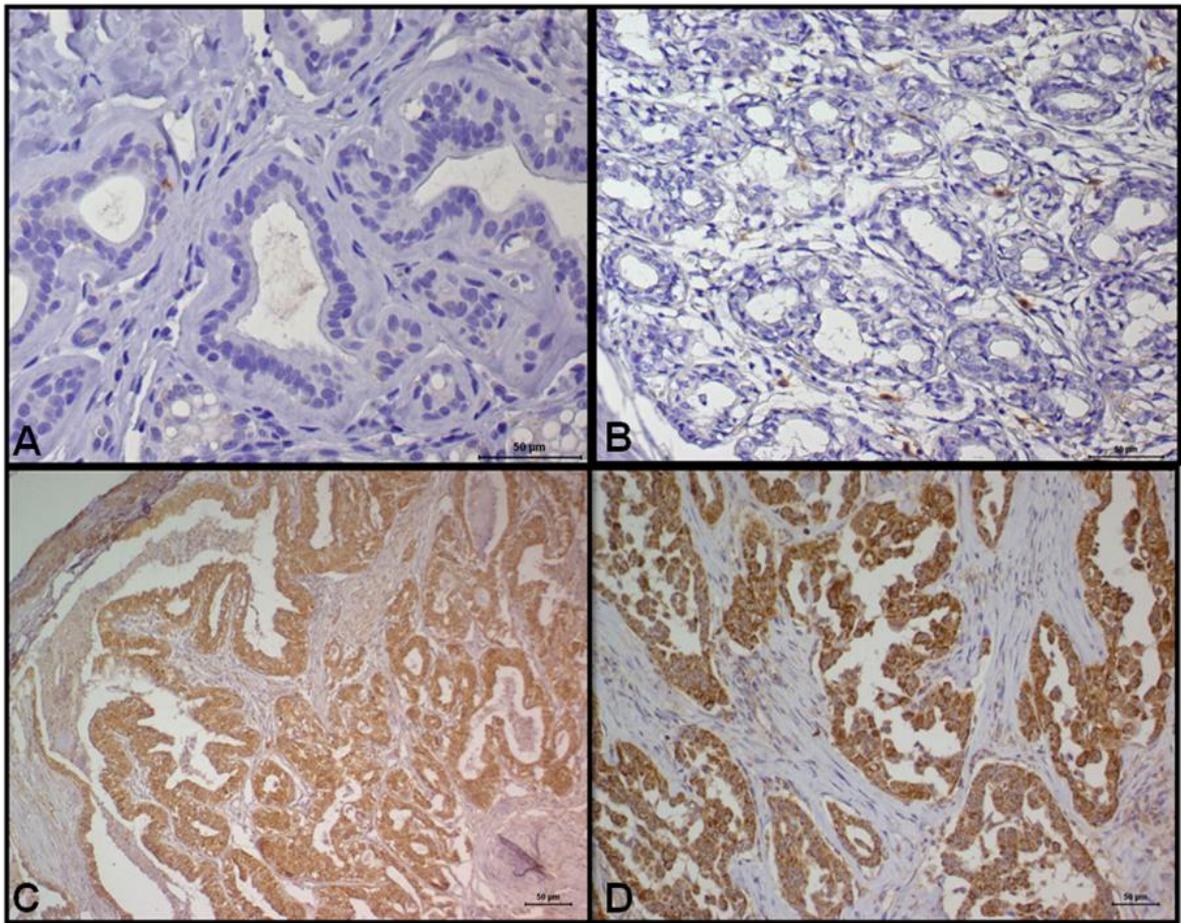


Figura 6. Fotomicrografia de imunomarcção citoplasmática da proteína COX-2. A. Mama normal: escore 1 e intensidade 0. B. Adenoma mamário: escore 1 e intensidade 3. C. Carcinoma tubular: escore 4 e intensidade 3. D. Carcinoma tubular metastático: escore 4 e intensidade 3 (aumento 200x). Jaboticabal, 2013.

Foi observada diferença significativa no percentual de células imunomarcadas (escore) entre os grupos, quando comparadas as mamas normais (G1) e os carcinomas não metastáticos (G3) e metastáticos (G4) e entre as lesões benignas (G2) e os carcinomas não metastáticos (G3) (Tabela 15), notando-se um aumento de expressão de COX-2 nos carcinomas não metastáticos e metastáticos.

Tabela 15. Mediana (percentil 25 – percentil 75) para os valores de escores de COX-2, segundo os grupos G1, G2, G3 e G4. Medianas seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis. Jaboticabal, 2014.

Grupo	Mediana (P25-P75)
G1	0,50 ^a (0,00-1,00)
G2	1,00 ^{ac} (1,00-3,00)
G3	3,00 ^b (3,00-4,00)
G4	3,00 ^{bc} (1,00-4,00)

As frequências relativas de escore foram diferentes entre os grupos ($p=0,0012$) para a COX-2. Além disso, foi possível observar que nas mamas normais 50% dos casos tiveram escore 0, ou seja, nenhuma célula foi marcada e 50% tiveram menos que 25% das células marcadas (escore 1). Nos carcinomas não metastáticos, 28,3% dos casos tiveram escore 3 e 48,3%, escore 4. Já nos carcinomas metastáticos, 30,4% dos casos tiveram escore 3 e 34,8% escore 4 (Tabela 16 e Figura 8).

Tabela 16. Frequência absoluta (Fi), frequência relativa (fi) e intervalo de confiança 95% (IC95%) para os valores de escores (percentual de células imunomarcadas) para COX-2, segundo o grupo. As frequências relativas de escores foram diferentes entre os grupos pelo teste G de Williams ($p=0,0012$). Jaboticabal, 2014.

Escore	G1			G2			G3			G4		
	Fi (N)	Fi (%)	IC95%									
0	4	50	(21,2-78,8)	4	14,3	(5,8-31,7)	4	6,7	(2,7-15,9)	3	13,0	(4,7-32,4)
1	4	50	(21,2-78,8)	11	39,3	(23,5-57,7)	6	10,0	(4,7-20,2)	3	13,0	(4,7-32,4)
2	0	0,0	(0,28-33,6)	3	10,7	(3,9-27,4)	4	6,7	(2,7-15,9)	2	8,7	(2,6-27,0)
3	0	0,0	(0,28-33,6)	4	14,3	(5,8-31,7)	17	28,3	(18,5-40,8)	7	30,4	(15,6-51,1)
4	0	0,0	(0,28-33,6)	6	21,4	(10,3-39,7)	29	48,3	(36,1-60,7)	8	34,8	(18,8-55,3)

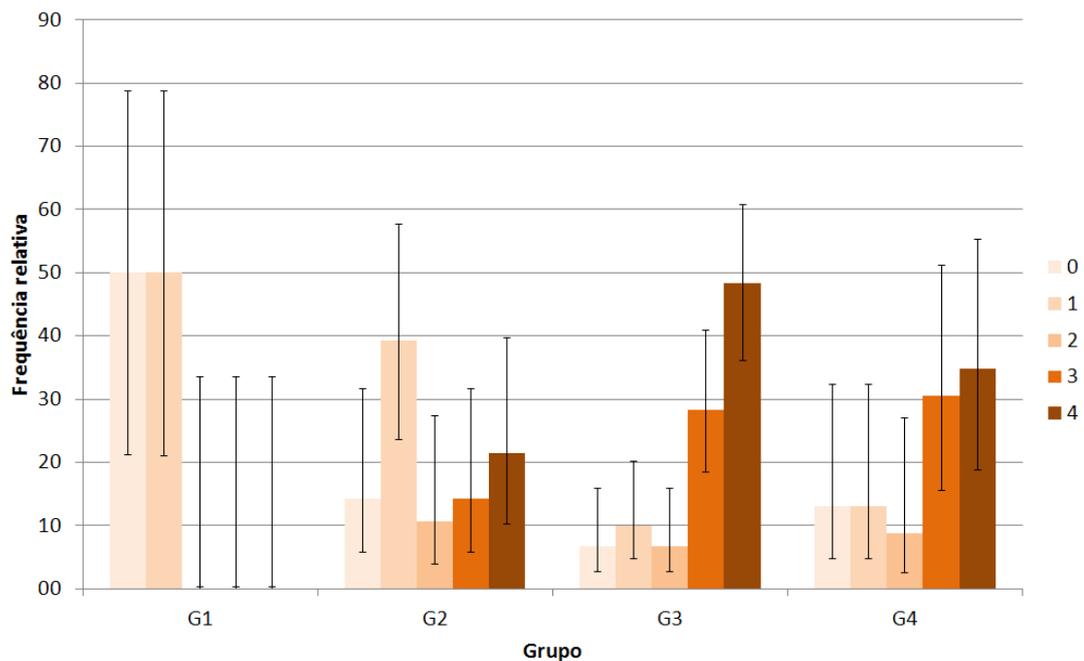


Figura 7. Frequência relativa e intervalos de confiança 95% dos escores de COX-2, segundo o grupo. Jaboticabal, 2014.

Em relação à intensidade de marcação da COX-2, não foi observada diferença estatística entre os quatro grupos analisados (Tabela 17).

Tabela 17: Mediana (percentil 25 – percentil 75) para os valores de intensidade de marcação para COX-2, segundo o grupo. Medianas seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis. Jaboticabal, 2014.

Grupo	Mediana (P25-P75)
G1	1,00 ^a (0,00-3,00)
G2	1,00 ^a (0,00-3,00)
G3	2,00 ^a (2,00-3,00)
G4	2,00 ^a (1,00-3,00)

As frequências relativas de intensidade mostraram diferença estatística entre os grupos ($p=0,0012$) para COX-2. Além disso, foi possível observar que nas mamas normais 50% dos casos não mostraram reatividade e 37,5% intensidade forte (3). Nos carcinomas não metastáticos, 43,3% dos casos mostraram intensidade 2 e 35% intensidade 3. Já nos carcinomas metastáticos, 39,1% dos casos mostraram intensidade 3 (Tabela 18 e Figura 9).

Tabela 18. Frequência absoluta (Fi), frequência relativa (fi) e intervalo de confiança 95% (IC95%) para os valores de intensidade de marcação para COX-2, segundo o grupo. As frequências relativas de escores foram diferentes entre os grupos pelo teste G de Williams ($p=0,0012$). Jaboticabal, 2014.

Intensidade	G1			G2			G3			G4		
	Fi (N)	Fi (%)	IC95%									
0	4	50,0	(21,2-78,8)	9	32,1	(17,9-50,8)	4	6,7	(2,7-15,9)	3	13,0	(4,7-32,4)
1	0	0,0	(0,3-33,6)	6	21,4	(10,3-39,7)	9	15,0	(8,2-26,2)	6	26,1	(12,6-46,7)
2	1	12,5	(2,8-48,2)	5	17,9	(8,0-35,8)	26	43,3	(31,5-55,9)	5	21,7	(9,8-42,2)
3	3	37,5	(13,7-70,1)	8	28,6	(15,3-47,2)	21	35,0	(24,2-47,7)	9	39,1	(22,1-59,4)

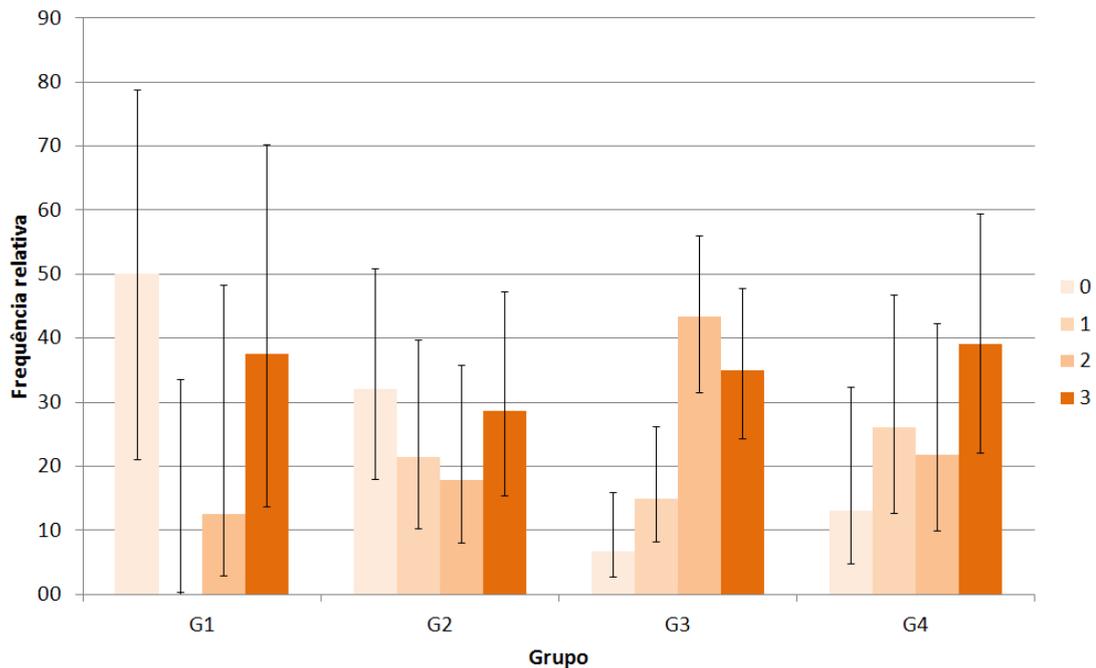


Figura 8. Frequência relativa e intervalos de confiança 95% para os valores de intensidade de marcação para COX-2, segundo o grupo. Jaboticabal, 2014.

Quando avaliado o escore final dos grupos na expressão da COX-2, foi observada diferença significativa entre os grupos 1, 2, 3 e 4 ($p= 0,0002$). Com relação à

frequência relativa, a baixa expressão de COX-2 ocorreu em 100% das mamas normais, 64,3% das lesões benignas, em 30% dos carcinomas não metastáticos e em 47,8% dos carcinomas metastáticos (Tabela 19 e Figura 10).

Tabela 19. Frequência absoluta (Fi) e relativa (fi) da expressão de COX-2, segundo o grupo. Jaboticabal, 2014.

Expressão de COX-2	G1		G2		G3		G4		χ^2	Valor de P
	Fi (N)	fi (%)								
Alta expressão	0	0,0	10	35,7	42	70,0	12	52,2	19,36	0,0002
Baixa expressão	8	100,0	18	64,3	18	30,0	11	47,8		

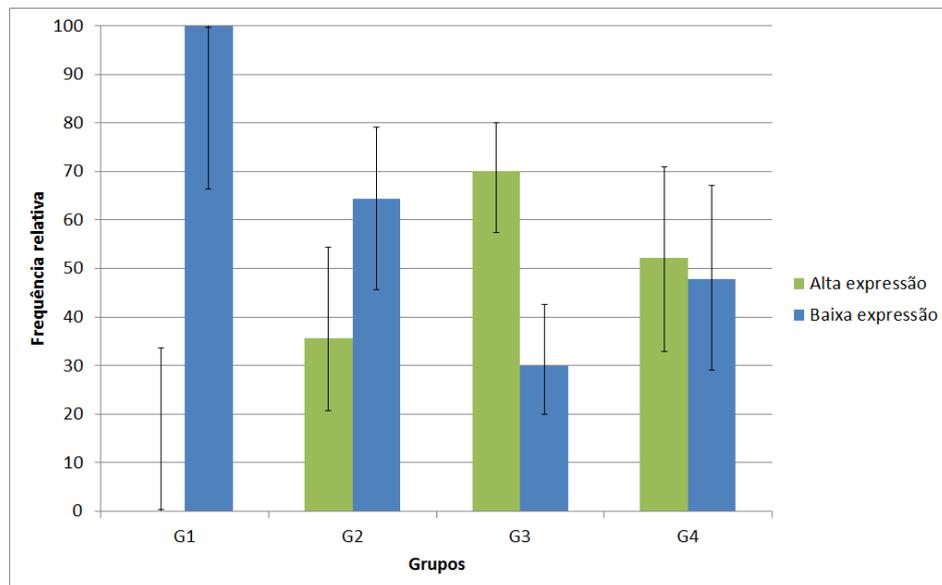


Figura 9. Frequência relativa e intervalo de confiança para o nível de expressão de COX-2, segundo o grupo. Jaboticabal, 2013.

O padrão de imunomarcção da proteína c-KIT também foi citoplasmática em todas as amostras (Figura 11).

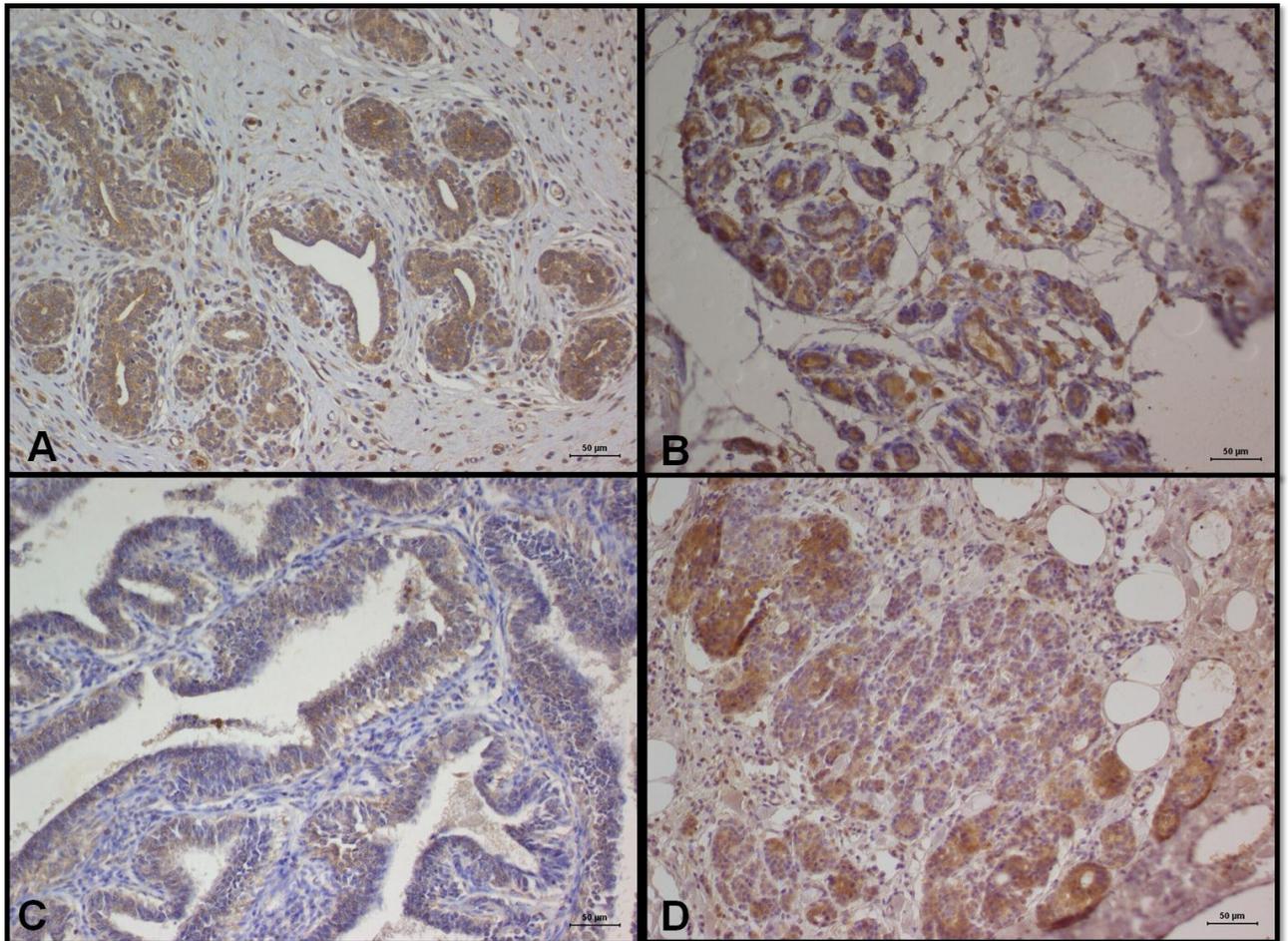


Figura 10. Fotomicrografia de imunomarcção citoplasmática da proteína c-KIT. **A.** Mama normal: escore 4 e intensidade 2. **B.** Adenoma mamário: escore 4 e intensidade 3. **C.** Carcinoma papilar não metastático: escore 2 e intensidade 1. **D.** Carcinoma tubular metastático: escore 4 e intensidade 2 (aumento 200x). Jaboticabal, 2014.

Foi observada diferença estatística na mediana do percentual de células imunomarcadas (escore) para c-KIT quando comparada entre o grupo G1 (mamas normais) e o grupo G4 (carcinomas metastáticos) (Tabela 20).

Tabela 20. Mediana (percentil 25 – percentil 75) para os valores de escores de c-KIT segundo o grupo. Jaboticabal, 2013. Medianas seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis.

Grupo	Mediana (P25-P75)
G1	4,00 ^d (4,00-4,00)
G2	4,00 ^{ba} (3,00-4,00)
G3	3,00 ^{ba} (2,00-4,00)
G4	2,50 ^a (1,00-4,00)

Com relação à frequência relativa do percentual de células imunomarcadas, também foi observada diferença significativa entre os grupos analisados ($P=0,0385$). Pôde-se observar uma diminuição do percentual de células marcadas com o aumento da malignidade do tumor, já que o escore 4 foi observado em 100% das mamas normais, 69,6% das lesões benignas, 45,3% dos carcinomas não metastáticos e 40,9% dos carcinomas metastáticos (Tabela 21 e Figura 12).

Tabela 21. Frequência absoluta (F_i), frequência relativa (f_i) e intervalo de confiança 95% (IC95%) para os valores de escores de c-KIT, segundo o grupo. Jaboticabal, 2014.

Escore	G1			G2			G3			G4		
	F_i	f_i	IC95%									
1	0	0,0	(0,2-30,8)	2	8,7	(2,6-27,0)	11	17,2	(9,9-28,3)	6	27,3	(13,2-48,4)
2	0	0,0	(0,2-30,8)	2	8,7	(2,6-27,0)	13	20,3	(12,3-31,8)	5	22,7	(10,2-43,7)
3	0	0,0	(0,2-30,8)	3	13,0	(4,7-32,4)	11	17,2	(9,9-28,2)	2	9,1	(2,8-28,0)
4	9	100,0	(69,1-99,7)	16	69,6	(48,9-84,4)	29	45,3	(33,7-57,5)	9	40,9	(23,2-61,4)

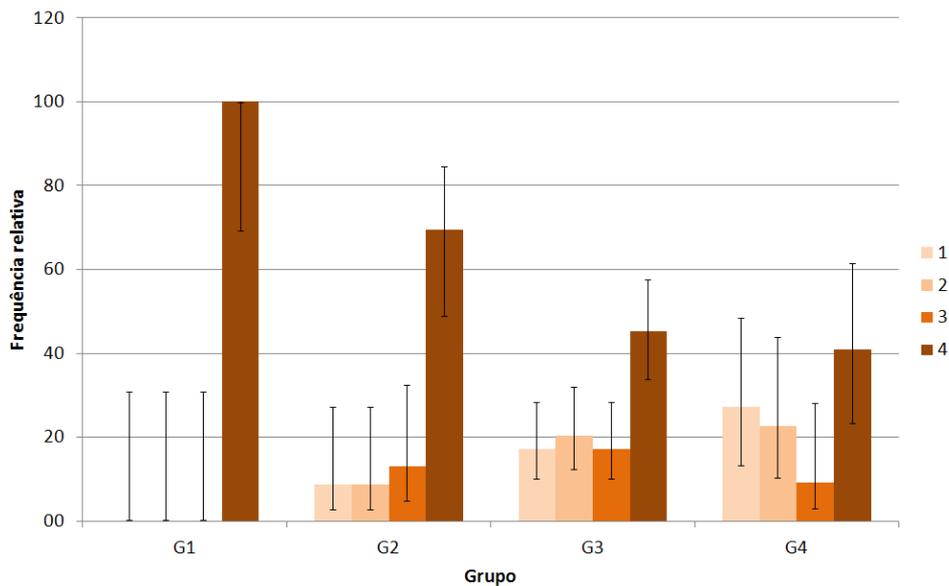


Figura 11. Frequência relativa e intervalos de confiança 95% dos escores de c-KIT, segundo o grupo, $p = 0,0385$. Jaboticabal, 2014.

Na intensidade de marcação também foi observada diferença estatística na frequência relativa entre os grupos G1, G2, G3 e G4 ($P= 0,0006$). Observou-se que 77,8% das mamas normais apresentaram intensidade de marcação moderada (2), 39,1% das lesões benignas apresentaram intensidade 2 e 3, 54,7% dos carcinomas metastáticos intensidade 2 e 40,9% dos carcinomas metastáticos intensidade 1 (Tabela 22 e Figura 13).

Tabela 22. Frequência absoluta (Fi), frequência relativa (fi) e intervalo de confiança 95% (IC95%) para os valores de intensidade de marcação do c-KIT, segundo o grupo. Jaboticabal, 2013. as frequências relativas de escores foram diferentes entre os grupos pelo teste G de Williams ($p=0,0006$).

Intensidade	G1			G2			G3			G4		
	Fi	fi	IC95%	Fi	fi	IC95%	Fi	fi	IC95%	Fi	fi	IC95%
0	0	0,0	(0,2-30,8)	1,0	4,3	(1,0-21,1)	4	6,3	(2,5-15,0)	4	18,2	(7,46-38,8)
1	0	0,0	(0,2-30,8)	4,0	17,4	(7,1-37,4)	23	35,9	(25,3-48,2)	9	40,9	(23,2-61,4)
2	7	77,8	(44,4-93,3)	9,0	39,1	(22,1-59,4)	35	54,7	(42,5-66,3)	8	36,4	(19,7-57,3)
3	2	22,2	(6,7-55,6)	9,0	39,1	(22,1-59,4)	2	3,1	(1,0-11,8)	1	4,5	(1,1-21,9)

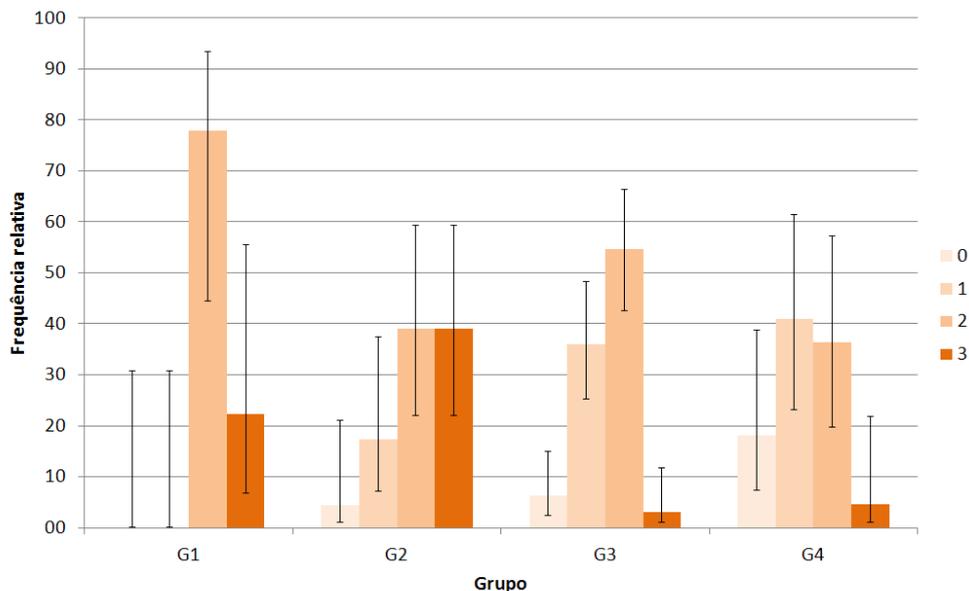


Figura 12. Frequência relativa e intervalos de confiança 95% para os valores de intensidade de marcação para c-KIT, segundo o grupo, $p = 0,0006$. Jaboticabal, 2014.

Quando avaliado o escore final dos grupos na expressão do c-KIT, foi observada diferença significativa entre os grupos 1, 2, 3 e 4 ($p=0,0003$). Com relação à frequência relativa, a alta expressão de c-KIT ocorreu em 100% das mamas normais, 78,3% das lesões benignas, em 57,1% dos carcinomas não metastáticos e em 27,3% dos carcinomas metastáticos, ou seja, houve diminuição da expressão do c-KIT com o aumento da malignidade do tecido (Tabela 23 e Figura 14).

Tabela 23: Frequência absoluta (Fi) e relativa (fi) da expressão de c-KIT, segundo o grupo. valores de P menores que 0,05 indicam associação significativa entre grupo e expressão pelo teste de χ^2 de Pearson. Jaboticabal, 2014.

Expressão de c-KIT	G1		G2		G3		G4		χ^2	Valor de P
	Fi (N)	fi (%)								
Alta expressão	9	100,0	18	78,3	36	57,1	6	27,3	19,05	0,0003
Baixa expressão	0	0,0	5	21,7	27	42,9	16	72,7		

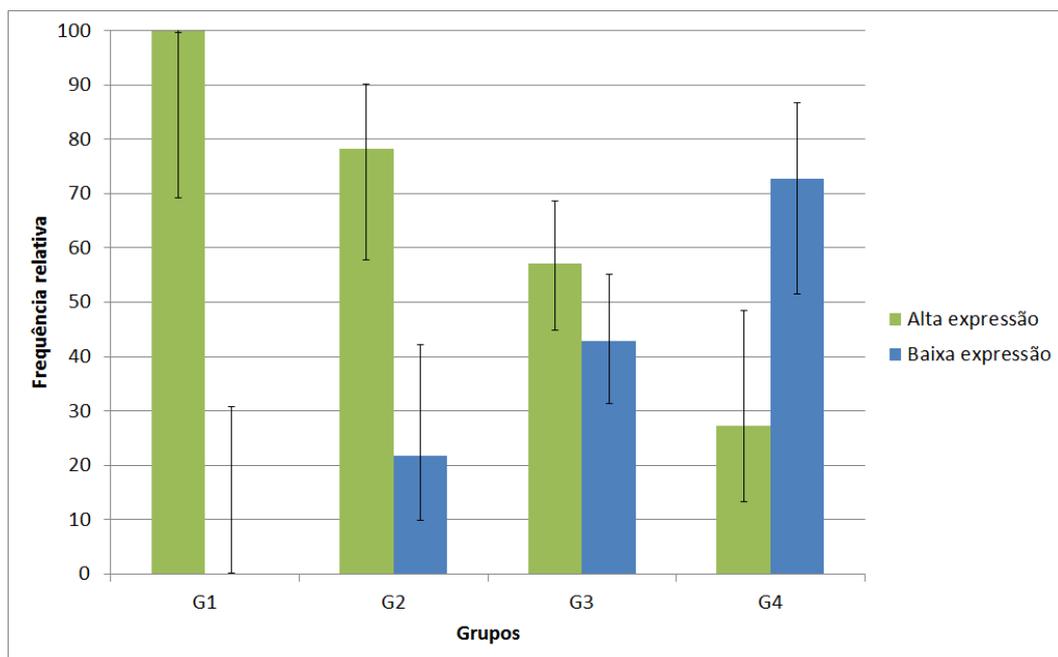


Figura 13. Frequência relativa e intervalo de confiança para o nível de expressão de c-KIT, segundo o grupo, $p=0,0003$. Jaboticabal, 2014.

5.8 Correlação da imunomarcagem entre COX-2 e c-KIT

Foi realizada análise de correlação de imunexpressão entre as duas proteínas estudadas pelo teste de Spearman. Não foi verificada correlação

estatística entre todos os grupos quanto ao escore. No entanto, o percentual de células imunomarcadas para as duas proteínas nas lesões benignas (G2) e nos carcinomas não metastáticos (G3) apresentaram correlação estatística (Tabela 24).

Tabela 24. Número de pares de amostras, coeficientes de correlação de Spearmann e valores de P para os escores de COX-2 e escores de c-KIT, para todas as amostras (independente dos grupos) e para cada um dos grupos. Valores de P menores que 0,05 indicam correlações significativas entre os pares de variáveis pelo teste de correlação de Spearmann. Jaboticabal, 2014.

Grupos avaliados	Número de amostras	r	Valor de P
Todos	105	0,13	0,1880
G1	8	nd	nd
G2	22	0,49	0,0203
G3	53	0,29	0,0328
G4	22	0,38	0,0827

Na análise de correlação da imunomarcção entre as duas proteínas quanto à intensidade, foi verificada correlação estatística entre todos os grupos ($p= 0,0151$). A intensidade de marcação para as duas proteínas nas lesões benignas (G2) e nos carcinomas metastáticos (G4) apresentaram correlação estatística (Tabela 25).

Tabela 25: Número de pares de amostras, coeficientes de correlação de Spearmann e valores de P para os valores de intensidade de marcação de COX-2 x valores de intensidade de marcação de c-KIT, para todas as amostras (independente dos grupos) e para cada um dos grupos. Valores de P menores que 0,05 indicam correlações significativas entre os pares de variáveis pelo teste de correlação de Spearmann. Jaboticabal, 2014.

Grupos avaliados	Número de amostras	r	Valor de P
Todos	105	0,24	0,0151
G1	8	0,09	0,8315
G2	22	0,61	0,0027
G3	53	0,22	0,1056
G4	22	0,46	0,0306

6. DISCUSSÃO

As pacientes do presente estudo apresentaram faixa etária média de 10,4 anos ($10,4 \pm 2,7$ anos) corroborando com a faixa etária de maior incidência de neoplasias mamárias em cadelas (DE NARDI et al., 2009; CASSALI et al., 2011; SORENMO et al., 2011; HENRY, 2013; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013).

Em relação às raças das pacientes, 30,6% eram sem raça definida, 19,4% Poodle, 8,9% Cocker e 5,6% Daschund. Assim, as raças de maior prevalência deste estudo estão de acordo com outros trabalhos (DE NARDI et al., 2009; BORGE; BØRRESEN-DALE; LINGAAS, 2011). No entanto, segundo Sorenmo (2003), a predisposição a determinadas raças pode variar de acordo com a região geográfica. Além disso, os cães sem raça definida representam a maior população de cães atendida no Hospital Veterinário em que este estudo foi desenvolvido.

O *status* reprodutivo é considerado um fator de risco para as cadelas com neoplasias mamárias e alguns autores sugerem que estes tumores sejam hormônio dependente e assim fêmeas intactas ou castradas tardiamente seriam mais predispostas ao acometimento desta enfermidade (SORENMO et al., 2011; HENRY, 2013).

Nos animais deste estudo, 64,6% (64/99 casos) não eram castradas e, além disso, 49% (46/ 94 casos) apresentavam histórico de pseudociese, sugerindo uma possível influência dos fatores hormonais no desenvolvimento da neoplasia mamária. Outros estudos identificaram uma alta porcentagem de pseudociese relacionada às neoplasias malignas (OLIVEIRA et al., 2003; OLIVEIRA-FILHO et al., 2010). Um dado interessante foi o percentual de cadelas não castradas que apresentaram carcinomas mamários (87,5% (56/64 casos). Em relação à administração de progestágenos exógenos, 11,76% (10/85 casos) das pacientes com neoplasias malignas e 9,1% (1/9 casos) com tumores benignos, fizeram uso de progestágenos, diferindo do observado por Oliveira et al. (2003), os quais observaram que a administração deste fármaco foi maior em relação aos tumores benignos do que malignos.

Quanto ao grau de malignidade, 72,9% das cadelas com carcinomas não metastáticos apresentaram tumores grau I e 52,2% das cadelas com carcinoma

metastático apresentaram tumores grau II. Além disso, 87,5% (7/8) dos tumores que recidivaram eram grau II e III. De acordo com Sorenmo et al. (2003), cães com tumores de alto grau (III) tem uma chance maior de desenvolvimento metastático.

O tamanho do tumor é importante para o estabelecimento do prognóstico do câncer de mama em cadelas. Neste estudo foi observado que 90% das cadelas com lesões benignas e 64,3% com carcinomas não metastáticos tinham tumores menores que 3 cm. Já as cadelas com carcinomas metastáticos, 56,5% tinham tumores maiores que 5 cm. Assim, alguns autores sugerem que o tamanho tumoral seja um fator prognóstico independente, uma vez que tumores maiores que 3 cm têm sido associados com piores prognósticos (SORENMO, 2003; SORENMO et al. 2011).

Nas cadelas com carcinoma metastático, 60,9% (14/23) apresentaram metástase em linfonodo regional e 47,8% (11/23) apresentaram metástase à distância. Estes resultados diferem do descrito por Pereira et al. (2003) que afirmaram que as metástases em linfonodos regionais vêm em segundo lugar depois dos pulmões para a incidência de metástases de tumores mamários nas cadelas.

Apesar de todas as cadelas terem sido submetidas à mastectomia unilateral, a recidiva tumoral foi observada em 5,9% (4/68) das pacientes com carcinomas não metastáticos e 18,20% (4/22) com carcinomas metastáticos. É válido salientar que todas as cadelas do grupo metastático que apresentaram recidivas, também tinham carcinomas de pior prognóstico, tais como, carcinoma sólido e carcinoma micropapilar. Além disso, estas pacientes também apresentaram tumores com tamanho entre 3-5 cm ou maiores que 5 cm.

Outro dado interessante observado neste estudo foi que as pacientes com ulceração tumoral representaram 7,4% dos carcinomas não metastáticos e 31,8% dos carcinomas metastáticos. As pacientes com lesões benignas não apresentaram ulcerações. Estes dados corroboram com Oliveira et al. (2003) que verificaram que 72,7% dos tumores de mama ulcerados analisados em seu trabalho estavam relacionados carcinomas.

Em relação ao tipo histológico dos tumores, constatou-se que o carcinoma em tumor misto e o carcinoma tubular foram os tipos predominantes no grupo dos

carcinomas não metastáticos, sendo que o primeiro correspondeu a 47,89% dos casos e o segundo a 29,6%, corroborando com os outros trabalhos que citam a alta frequência destes tipos histológicos nas cadelas (CASSALI et al., 2011), porém divergindo do estudo de Sorenmo (2003) em que cita o carcinoma tubular como tipo histológico mais prevalente em cadelas. Em contrapartida, nos carcinomas metastáticos, o carcinoma sólido e o tubular foram os mais prevalentes com 26,1% e 21,73% respectivamente. Os tipos histológicos micropapilar, anaplásico e complexo foram os tumores de menor incidência, assim como descrito em estudos prévios (SORENMO, 2003; CASSALI et al.; 2011; GAMBA et al., 2012).

Apesar de o carcinoma micropapilar ser considerado um tumor bastante agressivo, associado a um prognóstico ruim (CASSALI et al.; 2011; GAMBA et al., 2012), o único caso deste estudo com este tipo histológico, apresentou sobrevida de 365 dias, mesmo tendo desenvolvido metástases em linfonodo regional e cutânea, sendo submetida aos tratamentos cirúrgico e quimioterápico com doxorrubicina e carboplatina (dois ciclos) e, posteriormente, gencitabina com carboplatina (4 ciclos). Metástases relacionadas à este tipo histológico são bastante frequentes (CASSALI et al.; 2011; GAMBA et al., 2012).

O carcinoma anaplásico é outro tipo histológico também relacionado a um prognóstico ruim devido ao desenvolvimento de recidivas precoces e metástases (CASSALI et al.; 2011) e, neste estudo, duas pacientes foram diagnosticadas com este tipo de tumor, e ambas vieram a óbito, apresentando sobrevida global inferior a 30 dias. Além disso, uma paciente apresentava metástase em linonodo e adrenal, e a outra em linfonodo e pulmão.

Somando aos achados clínicos e histopatológicos avaliados neste estudo, marcadores tumorais previamente estudados em mulheres e cadelas (COX-2 e c-KIT) foram avaliados, visando compreender melhor os mecanismos envolvidos no processo de carcinogênese do câncer de mama de cadelas.

Na análise da expressão gênica da COX-2 foi observada uma alta regulação deste gene nas neoplasias (carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos) em relação à mama normal e lesões benignas. Estes achados corroboram com o único estudo realizado avaliando a expressão gênica de COX-2 em cadelas com carcinomas inflamatórios, carcinomas não inflamatórios e mamas normais o qual

também observou aumento dos níveis de transcritos nos tumores mamários de pior prognóstico, ou seja, nos carcinomas inflamatórios e não inflamatórios (CLEMENTE et al., 2013).

A superexpressão de COX-2 por ser explicada por diferentes mecanismos como a baixa regulação da sua transcrição e a estabilização do RNA mensageiro (SUBBARAMAIAH et al., 1996; JANG et al., 2000). Múltiplos sinais via sítios de união para fatores de transcrição distintos podem induzir a transcrição da COX-2 (APPLEBY et al., 1994). O RNA mensageiro de COX-2 não é estável devido à presença da sequência de 116 nucleotídeos ricos em AU (*116-nucleotide AU-rich sequence element – ARE*), localizados na região 3' não traduzida. Interação das proteínas de união ARE com estas regiões facilitam a degradação do RNA mensageiro e inibem sua tradução (DIXON et al., 2000; COK et al., 2001).

Conforme observado na expressão proteica de COX-2 nos carcinomas mamários, outra explicação poderia ser o maior número de células (incluindo as células neoplásicas) que sintetizam COX-2 e por isso maiores níveis de transcritos e de proteína no grupo de carcinomas.

Tem sido relatado que a via de transdução de sinal induzida pelo estresse envolvendo RAS /MKK1/ JNK é importante para a estabilização do RNA mensageiro da COX-2 (JANG et al., 2000). É provável que um número de estímulos influencie a expressão de COX-2 nos níveis de transcrição e a estabilidade do RNA mensageiro, durante o processo de desenvolvimento de neoplasias. Como controles normais de crescimento são comprometidos durante a carcinogênese devido à alterações genéticas no ambiente celular, a probabilidade de ocorrer a super expressão da COX-2 aumenta (BALRAJ SINGH, 2002).

Para o gene *c-KIT* não foi observada diferença significativa na expressão gênica entre os quatro grupos ou quando unidos os grupos tumorais em relação às mamas normais. Os resultados obtidos neste estudo diferem do único trabalho avaliando a expressão gênica de *c-KIT* em tumores mamários de cadelas, o qual foi realizado por Kubo et al (1998), que verificaram que a expressão dos transcritos de *c-KIT* foi detectada em 11 tumores mamários de diagnósticos histopatológicos diferentes incluindo, adenocarcinomas, tumores benignos e malignos mistos . O nível de transcritos em adenocarcinomas foi significativamente maior do que aqueles

em tumores mistos malignos. Estes autores sugeriram com os resultados que a elevada expressão de *c-KIT* poderia ser útil para o diagnóstico de tumores mamários caninos.

A expressão e a atividade de receptores de tirosina quinase aberrantes parecem ser fortemente determinadas pela ocorrência de muitas alterações do DNA, tais como, mutações pontuais, duplicação de genes e translocação cromossômica (MADHUSUDAN; GANESAN, 2004). A perda de mediadores inibidores de quinase ou mutações de ativação conduz à proliferação celular e subsequente é comum no câncer (KONDAPALLI et al., 2005). Em particular, VEGF e VEGFR, o PDGFR e receptor *c-KIT* são os principais fatores pró-angiogênicos envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama (SHCHEMELININ et al., 2006; BUCHDUNGER et al., 2000; NAKOPOULOU et al., 2002).

Um mesmo receptor tirosina quinase pode, em diferentes células, desencadear respostas biológicas contrárias, o que explica que as tirosina quinase SRC controlem a proliferação ou a diferenciação, dependendo do tipo de célula em que se expressam (OLIVEIRA E SILVA, 2003).

Outra hipótese poderia ser que outros receptores relacionados à proliferação celular estejam super expressos, como é o caso do *HER2* em mulheres, e a proliferação celular ser independente do receptor *c-KIT*, que pode até mesmo sofrer um *feedback* negativo em sua expressão.

Em relação à análise da expressão da proteína COX-2, foi observada localização de imunomarcagem citoplasmática concordando com vários trabalhos desenvolvidos em cadelas os quais também observaram marcação citoplasmática nas células epiteliais dos tumores mamários (MILANTA et al, 2006; LAVALLE et al., 2009; RIBEIRO et al., 2009; QUEIROGA et al., 2010; CLEMENTE et al., 2013; DE NARDI, et al, 2013).

Quanto ao percentual de células imunomarcadas (escore) para COX-2 houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,0012$), sendo possível observar que nas mamas normais 50% (4/8 casos) tiveram escore 0 ou 1 e os tumores benignos 39,3% com escore 1. Já os carcinomas mamários não metastáticos e metastáticos tiveram, respectivamente, 48,3% e 34,8% dos casos com mais de 75% das células marcadas (escore 4) e também superexpressão de transcrito para COX-2. Nos

diversos estudos onde a detecção da COX-2 foi efetuada em tumores mamários caninos, verificou-se que a porcentagem de tumores positivos é bastante variável, havendo autores que referem porcentagens de positividade de 7,1% a 24% para tumores benignos e de 56% a 76,2% para tumores malignos (DORÉ et al., 2003; MOHAMMED et al., 2004; HELLER et al., 2005; QUEIROGA et al., 2011); outros obtiveram marcações positivas muito próximas dos 100% ou mesmo na totalidade dos casos estudados (MILLANTA et al., 2006; QUEIROGA et al., 2007; DIAS PEREIRA et al., 2009).

Em relação à intensidade da marcação, não houve diferença estatística entre as medianas dos quatro grupos, porém houve diferença entre a frequência relativa dos quatro grupos avaliados ($p=0,0012$). 50% das amostras das mamas normais e 32,1% das lesões benignas não apresentaram imunorreatividade e as amostras dos outros dois grupos (3 e 4) manifestaram, intensidade moderada e forte. Esses achados corroboram com os descritos por Doré et al. (2003) e Dias Pereira et al. (2009) e podem ser explicados pelos menores níveis de transcritos de COX-2 em mamas normais e lesões benignas.

Quando avaliado o escore final dos grupos na imunomarcação da COX-2 foi observada diferença significativa entre os quatro grupos ($p=0,0002$). A baixa expressão foi observada em 100% das mamas normais e 64,3% das lesões benignas. Já nos grupos tumorais, 70% dos carcinomas não metastáticos e 52,2% dos carcinomas metastáticos apresentaram alta expressão. Outros estudos obtiveram resultados inferiores (42%) e similares (56%) quanto à porcentagem de tumores malignos com imunomarcação positiva para COX-2 (MOHAMMED et al., 2004; HELLER et al., 2005; MILLANTA et al., 2006; QUEIROGA et al., 2007; Dias PEREIRA et al., 2009; LAVALLE et al., 2009). Além disso, outros trabalhos revelaram que a glândula mamária normal não expressa COX-2, ou expressa em níveis muito reduzidos (DORÉ et al., 2003; MOHAMMED et al., 2004; QUEIROGA et al., 2007). Resultados discrepantes podem ser justificados por diferentes anticorpos primários utilizados para o mesmo antígeno, técnicas diferentes nas etapas de recuperação antigênica e sistemas de detecção do anticorpo primário.

Na avaliação da imunomarcação do c-KIT neste estudo foi observada marcação citoplasmática em todos os casos. Alguns estudos realizados em

mulheres descrevem que a imunomarcação desta proteína no tecido mamário pode ser citoplasmática ou citoplasmática membranosa (DIALLO et al., 2006; POLAT, 2007; MEDINGER et al., 2010). Não existem trabalhos descritos na literatura veterinária que avaliam a imunomarcação de c-KIT em tumores mamários e por isso não é possível realizar uma avaliação comparativa com outros trabalhos em cadelas.

Foi encontrada diferença significativa na mediana do percentual de células imunomarcadas (escore) quando comparado o grupo das mamas normais com os carcinomas metastáticos. Foi possível observar uma diminuição do escore com o aumento da malignidade do tumor, já que o escore 4 foi observado em 100% das mamas normais e em 40,9% dos carcinomas metastáticos. Este fato foi observado em mulheres em estudos realizados por KO et al.(2003), TSUTSUI (2006) e POLAT (2007) os quais descreveram que em tecidos de tumores de mama primário, a expressão do c-KIT foi muitas vezes ausente e o escore foi significativamente reduzido em comparação com as dos tecidos mamários normais e lesões benignas. Os resultados da expressão proteica não refletem os níveis de transcrito. Níveis mais elevados de proteína podem ser justificados por ação de miRNA.

Ainda, é possível considerar que nos casos de carcinoma mamário deste estudo, a diminuição da imunomarcação do c-KIT pode ter sido devida à presença de proteína resultante do c-KIT mutado não ser detectada pelo anticorpo utilizado. A diminuição da imunexpressão do c-KIT nos carcinomas mamários pode indicar que durante a transformação maligna do epitélio mamário outros fatores de crescimento podem colaborar para a diminuição de expressão do c-KIT. Este marcador não pode ser considerado um bom marcador preditivo e prognóstico quando avaliado isoladamente.

7. CONCLUSÃO

A avaliação da expressão gênica e proteica de COX-2 teve relação com a malignidade do tumor de mama em cadelas, e conseqüentemente com o pior prognóstico, apesar de não diferenciar o potencial metastático dos carcinomas mamários em cadelas.

Houve diminuição da expressão proteica de c-KIT nos carcinomas mamários de cadela, em relação à mama normal e lesões benignas, sem que houvesse uma correlação com os níveis de transcrito deste gene.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho abre portas para novas linhas de pesquisa em oncologia veterinária, já que o uso da terapia alvo molecular para neoplasias mamárias vem sendo bastante estudado nos últimos anos. Associado à isso devemos levar em consideração à alta casuísta destes tumores na rotina clínica no Brasil.

A partir daqui pretendemos continuar investigando outros marcadores envolvidos no processo da carcinogênese, além da aplicação de novas técnicas diagnósticas como expressão gênica em larga escala, Western Blot, dentre outros. Assim, poderemos ter maiores informações a respeito dos principais genes envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama e das metástases permitindo a identificação de novos marcadores moleculares e, assim, contribuir para um melhor manejo clínico das pacientes com esta neoplasia, auxiliando na determinação do diagnóstico precoce, estadiamento tumoral, detecção de recidivas, estabelecimento do prognóstico e na escolha da conduta terapêutica.

9. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, F. H.; FIGUEIROA, F. C.; BERSANO, P. R.; BISSACOT, D. Z.; ROCHA, N. S. Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. **Diagnostic Pathology**, London, v. 5, p. 45, 2010.
- APPLEBY, S. B.; RISTIMAKI, A.; NEILSON, K.; KARKO, K.; HLA, T. Structure of the human cyclooxygenase-2 gene. **Biochemical Journal**, n. 302, p. 723-727, 1994.
- ARGYLE, D.J. Molecular/targeted therapy of cancer. In: WITHROW, S.J., MACEWEN, E.G. **Small Animal Clinical Oncology**. 4 ed. Philadelphia: WB Saunders, 2007. p. 236-74.
- ARUN B, GOSS P. The role of COX-2 inhibition in breast cancer treatment and prevention. **Seminars in Oncology**. v. 31, Sup. 7, p. 22–29, 2004.
- AYRES, M. et al. **BioEstat 5.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. 2007. 364p.
- SINGH, B.; LUCCI, A. Role of Cyclooxygenase-2 in Breast Cancer. **Journal of surgical research**, v. 108, n. 1, p. 173-179, 2002.
- BORGE, K. S.; BØRRESEN-DALE, A. L.; LINGAAS, F. Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumour. **Veterinary and Comparative Oncology**, Oxford, v. 9, n.4, p. 241-250. 2011.
- BRINKHOF, B.; SPEE, B.; ROTHUIZEN, J.; PENNING, L. C. Development and evaluation of canine reference genes for accurate quantification of gene expression. **Analytical Biochemistry**, New York, v. x; 2006.
- BUCHDUNGER, E; CIOFFI, C. L.; LAW, N.; STOVER, D.; OHNO-JONES, S.; DRUCKER, B. J. et al. Abl proteintyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 295, p. 139–45, 2000.
- CASSALI 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.
- CLEMENTE, M.; SÁNCHEZ-ARCHIDONA, A. R.; SARDÓN, D.; MARTÍN-RUIZ, L. D. A.; CACERES, S.; SASSI, F.; PÉREZ-ALENZA, M. D.; ILLERA, J. C.; DUNNER, S.; PEÑA, L. Different role of COX-2 and angiogenesis in canine inflammatory and non-inflammatory mammary cancer. **The Veterinary Journal**, v. 197, p. 427–432, 2013.
- CLIFFORD, C. A. Cancer and non-steroidal drugs. In: **Proceedings of North American Veterinary Conference**; Orlando: NAVC, p.619, 2005.

COK, S. J.; MORRISON, A. R. The 3'-untranslated region of murine cyclooxygenase-2 contains multiple regulatory elements that alter message stability and translational efficiency. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 23179-85, 2001.

COSTA, C.; SOARES, R.; REIS-FILHO, J.S.; LEITAO, D.; AMENDOEIRA, I.; SCHMITT, F.C. Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 55, p. 429-434, 2002.

DEAN, A. G.; ARNER, T. G.; SUNKI, G. G.; FRIEDMAN, R.; LANTINGA, M.; SANGAM, S.; ZUBIETA, J. C.; SULLIVAN, K. M.; BRENDEL, K. A.; GAO, Z.; FONTAINE, N.; SHU, M.; FULLER, G.; SMITH, D. C.; NITSCHKE, D. A.; FAGAN, R. F. **Epi Info™, a database and statistics program for public health professionals**. CDC, Atlanta, GA, USA, 2011.

DE NARDI, A. B. et al. Neoplasias mamárias. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. 1 ed. São Paulo: Roca, 2009. cap. 25, p. 372-383.

DE NARDI, A. B.; RAPOSO, T. M. M.; HUPPES, R. R.; DALECK, C. R.; AMORIM, R. L. COX-2 Inhibitors for Cancer Treatment in Dogs. **Pakistan Veterinary Journal**. v. 31, n. 4, p. 275-279, 2011.

DE NARDI, A. B.; DALECK, C. R.; AMORIM, R. L.; HUPPES, R. R.; USCATEGUID, R. A. R.; RODASKI, S.; CALDERON, C.; NETO, R. T. Expresión de La ciclooxigenasa-2 en los carcinomas mamarios caninos primarios metastásicos y no metastásicos. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.45, p. 311-316, 2013.

DIALLO, R.; RODY, A.; JACKISH, C.; TING, E.; SCHAEFER, K. L.; KISSLER, S. C. KIT expression in ductal carcinoma in situ of the breast: co-expression with HER-2/neu. **Human Pathology**, n. 37, p. 205-11, 2006.

DIAS PEREIRA, P.; LOPES, C. C.; MATOS, A. J.; SANTOS, M.; GARTNER, F. COX-2 expression in canine normal and neoplastic mammary gland. **Journal of Comparative Pathology**, v. 140, p. 247-253, 2009.

DIXON, D. A.; KAPLAN, C. D.; MCINTYRE, T. M.; ZIMMERMAN, G. A.; PRESCOTT, S. M. Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 3'- untranslated region. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 11750-7, 2000.

DORÉ, M.; LANTHIER, I.; SIROIS, J. Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 207-212, 2003.

DORÉ, M. Cyclooxygenase-2 Expression in Animal Cancers. **Veterinary Pathology**, v. 48, n.1, p. 254-265, 2011.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Assessment of histological grade. ELSTON CW., ELLIS IO. Ed. Systemic Pathology. **The breast**. London: Churchill Livingstone, p. 365-384, 1998.

GAMA, A.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. **Virchows Archives**, Berlin, v. 453, n.2, p. 123–132, 2008.

GAMBA, C. O.; DIAS, E. J.; RIBEIRO, L. G.; CAMPOS, L. C.; ESTRELA-LIMA, A.; FERREIRA, E.; CASSALI, G. D. Histopathological and immunohistochemical assessment of invasive micropapillary mammary carcinoma in dogs: A retrospective study. **The Veterinary Journal**, v. 196, n. 2, p. 241-46, 2012.

GROOT, D. J. A.; VRIES, E. G. E.; GROEN, H. J. M.; JONG, S. Non-steroidal anti-inflammatory drugs to potentiate chemotherapy effects: from lab to clinic. **Critical Reviews Oncology / Hematology**, n. 61, p. 52- 69, 2007.

GRÖSCH, S. et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) - independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, n. 11, p.736-747, 2006.

GUIMARÃES, M. J.; CARVALHO, M. I.; PIRES, I.; PRADA, J.; GONZALEZ GIL, A.; LOPES, C.; QUEIROGA, F. L. Concurrent Expression of Cyclo-oxygenase-2 and Epidermal Growth Factor Receptor in Canine Malignant Mammary Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, p. 1-8, 2013.

GUPTA, G. P.; NGUYEN, D. X.; CHIANG, A. C.; BOS, P. D.; KIM, J. Y.; NADAL, C.; GOMIS, R. R.; MANOVA-TODOROVA, K.; MASSAGUÉ, J. Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. **Nature**, v. 446, p. 765-770, 2007.

HAYES, A., 2007. Cancer, cyclo-oxygenase and nonsteroidal anti-inflammatory drugs – can we combine all three? *Veterinary and Comparative Oncology* 5, 1–13.

HELLER, D.A., CLIFFORD, C.A., GOLDSCHMIDT, M.H., HOLT, D.E., SHOFER, F.S., SMITH, A., SORENMO, K.U., 2005. Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. *Veterinary Pathology* 42, 776–780.

HENRY, C. J. Chemical, physical, and hormonal factors. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small animal clinical oncology**. 5. ed. Saunders: St. Louis, 2013, cap. 1, p. 15-20.

HWANG, D.; SCOLLARD, D.; BYRNE, J.; LEVINE, E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 6, p. 455-60, 1998.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). Tipos de câncer: Mama. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2011. Acesso em 10 de dezembro de 2013. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>

JANG, B. C.; SANCHEZ, T.; SCHAEFERS, H. J.; TRIFAN, O. C.; LIU, C. H.; CREMINON, C.; HUANG, C. K.; AND HLA, T. Serum with drawal-induced post-transcriptional stabilization of cyclooxygenase-2 mRNA in MDA-MB-231 mammary carcinoma cells requires the activity of the p38 stress-activated protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 39507, 2000.

JARK, P.C.; MACHADO, L.H.A.; SAKATE, M.; CALAZANS, S.G.; CAPUA, M.L.B.; TINUCCI-COSTA, M.; DE NARDI, A.B. Inibidores de receptor de tirosina quinase no tratamento de mastocitoma em cães – revisão. **Clinica Veterinária**, v.99, p.50-57, 2012.

JUNG, J. E. **Expressão dos genes BRAF e c-kit e sua correlação com fatores prognósticos em melanomas cutâneos**. 2010. 79f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2010.

KANAOKA, S.; TAKAI, T.; YOSHIDA, K. Cyclooxygenase-2 and tumor biology. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 43, p.59-78, 2007.

KLOPFLEISCH, R.; GRUBER, A. D. Increased expression of BRCA2 and RAD51 in lymph node metastases of canine mammary adenocarcinomas. **Veterinary Pathology**, v. 46, p. 416–422, 2009.

KLOPFLEISCH, R.; EULER, VON H.; SARLI, G; PINHO, S. S.; GARTNER, F.; GRUBER, A. D. Molecular Carcinogenesis of Canine Mammary Tumors: News From an Old Disease. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 98-116, 2011.

KO, C. D., KIM, J. S.; KO, B.G., SON, B.H.; KANG, H.J.; YOON, H.S. The meaning of the c-KIT proto-oncogene product in malignant transformation in human mammary epithelium. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 20, p. 593-597, 2003.

KONDAPALLI, L.; SOLTANI, K.; LACOUTURE, M. E. The promise of molecular targeted therapies: protein kinase inhibitors in the treatment of cutaneous malignancies. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 53, p. 291-302, 2005.

KUBO, K; MATSUYAMA, S.; KATAYAMA, K.; TSUTSUMI, C.; YONEZAWA, K.; SHIMADA, T.; KOTANI, T.; SAKUMA, S.; OHASHI, F.; TAKAMORI, Y. Frequent expression of the *c-KIT* Proto-oncogene in canine malignant mammary tumor. **The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 60, n. 12, p. 1335-1340, 1998.

LANA S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J. Tumors of the mammary gland. . In: WITHROW, S.J., MACEWEN, E.G. **Small Animal Clinical Oncology**. 4 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company. 2007, p. 619-636.

LAVALLE, G. E.; BERTAGNOLLI, A. C.; TAVARES, W. L. F.; CASSALI, G. D. COX-2 Expression in Canine Mammary Carcinomas: Correlation with Angiogenesis and Overall Survival. **Veterinary Pathology**, v. 46, p. 1275-1280, 2009.

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**, San Diego, v. 25, p. 402–408. 2001.

LLORET A. The use of cox-2 drugs in oncology: clinical case. **In: Proceedings of Southern European Veterinary Conference**, 2008, Barcelona. Barcelona: Avepa; 2008.

LONDON, C.A. Tyrosine kinase inhibitors in veterinary medicine. **Topic in Companion Animal Medicine**, v. 24, p.106-112, 2009.

LORENZOVÁ, J.; CRHA, M.; KECOVÁ, H.; URBANOVÁ, L.; STAVINHOVÁ, R.; NEČAS, A. Patient survival periods and death causes following surgical treatment of mammary gland tumours depending on histological type of tumour: Retrospective study of 221 cases. **Acta Veterinaria**, v. 79, p. 289-297, 2010.

MADHUSUDAN, S.; GANESAN, T. S. Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. **Clinical Biochemistry**, v. 37, p. 618-35, 2004.

MEDINGER, M.; KLEINSCHMIDT, M.; MROSS, K.; WEHMEYER, B.; UNGER, C.; SCHAEFER, H. E.; WEBER, R.; AZEMAR, M. c-KIT (CD117) Expression in Human Tumors and its Prognostic Value: An Immunohistochemical Analysis. **Pathol. Oncol. Res**, v. 16, p. 295–301, 2010.

MIETTINEN, M.; LASOTA, J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. **Applied immunohistochemistry & molecular morphology**, v. 13, n. 3, p. 205-220, 2005.

MILANTA, F.; CITI, S.; DELLA SANTA, D.; PORCIANI, M.; POLI, A. Cox-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: Correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 98, p. 115–120, 2006.

MISDORP, W. et al. **Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat**. 2. ed. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1999, v. 7, 59 p.18-27.

MOHAMMED, S. I.; BENNETT, P. F.; CRAIG, B. A.; GLICKMAN, N. W.; MUTSAER, A. J.; SNYDER, P. W. Effects of the Cyclooxygenase inhibitor, Piroxican, on tumor response, apoptosis, and angiogenesis in a canine model of human invasive urinary bladder cancer. **Cancer Research**. v. 62, p. 356-358, 2002.

MOHAMMED, S. I.; KHAN, K. N. M.; SELLERS, R. S. Expression of cyclooxygenase-1 and 2 in naturally occurring canine cancer. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 70, p. 479-483, 2004.

MORRIS, P. G.; ABREY, L. E. Novel targeted agents for platelet-derived growth factor receptor and c-KIT in malignant gliomas. **Targeted Oncology**, v. 5, p.193-200, 2010.

MUNDIM, F. G. L., LOGULLO, A. F. Role of the expression of the tyrosine kinase receptor KIT in invasive ductal carcinomas of the breast. **Applied Cancer Research**, v. 29, n. 2, p. 50-57, 2009.

NAKOPOULOU, L.; STEFANAKI, K.; PANAYOTOPOULOU, E.; GIANNOPOULOU, I.; ATHANASSIADOU, P.; GAKIOPOULOU-GIVALOU, H. Expression of the vascular endothelial growth factor receptor-2/Flk-1 in breast carcinomas: correlation with proliferation. **Human Pathology**, v. 33, p. 863-70, 2002.

NAVEGA, P.R.S. **Mastocitoma em canídeos: estudo retrospectivo**. Dissertação (Mestrado integrado em Medicina Veterinária). 2011. 102 f. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.

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

OLIVEIRA E SILVA, A. F. S. Expressão de c-KIT (cd 117) em lesões benignas e malignas de mama. Dissertação (Mestrado em Medicina). 2003. 76 f. Universidade do Porto, Porto, 2003.

OLIVEIRA, L. O.; OLIVEIRA, R. T.; LORETTI, A. P.; RODRIGUES, R.; DRIEMEIER. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 31, n. 2, p. 105–110. 2003.

OLIVEIRA-FILHO, J. C.; KOMMERS, G. D.; MASUDA, E. K.; MARQUES, B. M. F. P. P.; FIGHERA, R. A. IRIGOYEN, L. F. BARROS, C. S. L. Estudo retrospectivo de 1647 tumores mamários em cães. **Pesquisa. Veterinária. Brasileira**, Seropédica, v. 30, n. 2, p. 177-185, 2010.

OWEN, L. N. The TNM classification of tumors in domestic animals. 1 ed. Geneva: **World Health Organization**, 1980.

PEREIRA, C. T.; RAHAL, S. C.; BALIEIRO, J. C.C.; RIBEIRO, A. A. C. M. Lymphatic Drainage on Healthy and Neoplastic Mammary Glands in Female Dogs: Can it Really be Altered? **Anat. Histol. Embryol**, v. 32, p. 282–290 2003.

PEREIRA, P. D et al. COX-2 expression in canine normal and neoplastic mammary gland. **Journal of Comparative Pathology**, Vol. 140, p. 247-253, 2009.

PEREZ-ALENZA, D. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control stud. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 12, n. 3, p. 132-139, 1998.

PHILIBERT, J. C.; SNYDER, P. W.; GLICKMAN, N.; GLICKMAN, L. T.; KNAPP, D. W.; WATERS, D. J. Influence of host factors on survival in dogs with malignant

mammary gland tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 1, p. 102-106, 2003.

POLAT, A. c-KIT expression in columnar cell lesions of the breast accompanied by benign and malignant breast diseases. **Pathology - Research and Practice**, v. 203, p. 765-9, 2007

QUEIROGA, F. L.; ALVES, A.; PIRES, I. Expression of Cox-1 and Cox-2 in canine mammary tumors. **Journal of Comparative Pathology**. v. 136, p.177–185, 2007.

QUEIROGA, F.L.; PIRES, I.; LOBO, L.; LOPES, C.S. The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. **Research Veterinary Science**, v. 88, n. 3, p. 441-445, 2010.

QUEIROGA, F.L.; PIRES, I.; PARENTE, M.; GREGORIO, H.; LOPES, C.S. COX-2 overexpression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer. **Veterinary Journal**, v. 189, n. 1, p. 77-82, 2011.

RAHAL, S. C.; HOSSNE, W. S.; TEIXEIRA, E. M. S. Uso da fluoresceína na identificação dos vasos linfáticos superficiais das glândulas mamárias em cadelas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, n. 2, p. 251-254, 1995.

RANIERI, G.; PANTALEO, M.; PICCINNO, M.; RONCETTI, M.; MUTINATI, M.; MARECH, I.; PATRUNO, R.; RIZZO, A.; SIORSCI, R. L. Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in human and pet tumours with special reference to breast cancer: A comparative review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 88, p. 293-308, 2013.

RAPOSO, T. M.M.; TERRA, E. M.; VARALLO, G. R.; TINUCCI-COSTA, M.; DE NARDI, A. B.; LAUFER-AMORIM, R. Estudo da relação da influência hormonal na incidência de neoplasias mamárias em cadelas atendidas no hospital veterinário da UNESP de Jaboticabal no ano de 2011. In: ONCOVET, VII, 2012, João Pessoa. **Anais**. João Pessoa: ONCOVET, 2012.

RIBEIRO, L. G. R.; DAMASCENO, K. A.; COSTA NETO, J. M.; D'ASSIS, M. J. M. H.; COSTA, A. T.; SILVA, N. S.; AGUIAR, P. H. P.; CASSALI, G. D.; ESTRELA-LIMA, A. Expressão da cox-2 nos carcinomas mamários de cadelas. **Veterinária em Foco**, v.6, n.2, p. 134-139, 2009.

SHCHEMELININ, I.; SEFC, L.; NECAS, E. Protein kinase inhibitors. **Folia Biologica**, v. 52, p. 137-48, 2006.

SORENMO K. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 33, p. 573-596. 2003.

SORENMO, K. U; WORLEY, D. R.; GOLDSCHMIDT, M. H. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small animal clinical oncology**. 5. ed. Saunders: St. Louis, cap. 27, p. 538-547, 2013.

SOTANI, M.; ISHIDA, N.; TOMINAGA, M. Effect of tyrosine kinase inhibition by imatinib mesylate on mast cell tumors in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p. 985-988, 2008.

SOUZA, C. H. M.; TOLEDO-PIZA; AMORIM, R; BARBOZA, A; TOBIAS, K. M. Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: Clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. **Canadian Veterinary Journal**, v. 50, p.506 - 510, 2009.

SUBBARAMAIAH, K.; TELANG, N.; RAMONETTI, J. T.; ARAKI, R.; DEVITO, B.; WEKSLER, B. B.; DANNENBERG, A. J. Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. **Cancer Research**, v. 56, p. 4424, 1996.

THURSON, G.; GALE, N. W. Vascular endothelial growth factor and other signaling pathways in developmental and pathologic angiogenesis. **Internal Journal Hematology**, v. 80, p 7-20, 2004.

TSUTSUI, S.; YASUDA, K.; SUZUKI, K.; TAKEUCHI, H.; NISHIZAKI, T.; HIGASHI, H.; ERA, S. A loss of c-kit expression is associated with an advanced stage and poor prognosis in breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 94, p.1874–1878, 2006.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 7. 2002.

WILLMORE-PAYNE C, HOLDEN JA, CHADWICK BE AND LAYFIELD LJ: Detection of *c-Kit* exons 11- and 17-activating mutations in testicular seminomas by high-resolution melting amplicon analysis. **Modern Pathology**, v. 19, n. 9, p. 1164-1169, 2006.

YAMADA, O.; KOBAYASHI, M.; SUGISAKI, O.; ISHII, N.; ITO, K.; KUROKI, S.; SASAKI, Y.; ISOTANI, M.; ONO, K.; WASHIZU, T.; BONKOBARA, M.; Imatinib elicited a favorable response in a dog with a mast cell tumor carrying a c-kit c.1523A>T mutation via suppression of constitutive KIT activation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.142, p. 101-106, 2011.

YARED, M. A.; MIDDLETON, L.P.; MERIC, F.; CRISTOFANILI, M.; SAHIN, A. A. Expression of c-KIT proto-oncogene product in breast tissue. **Breast Journal**, v. 10, n. 4, p. 323-327, 2004.

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

APÊNDICE

APENDICE A – Questionário dirigido aos proprietários de cadelas incluídas no experimento

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:

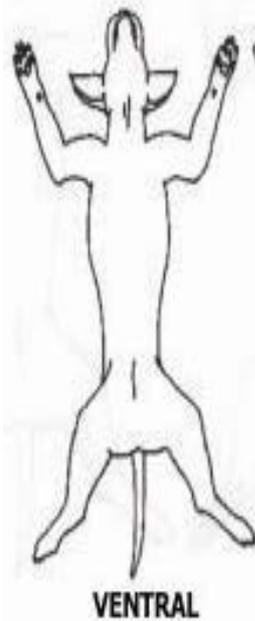
() Sim. Quem e tipo:.....

() Não

() Não sabe informar

Obs.

ESQUERDA



TAMANHO

Esquerda

Direita

M1:

M1:

M2:

M2:

M3:

M3:

M4:

M4:

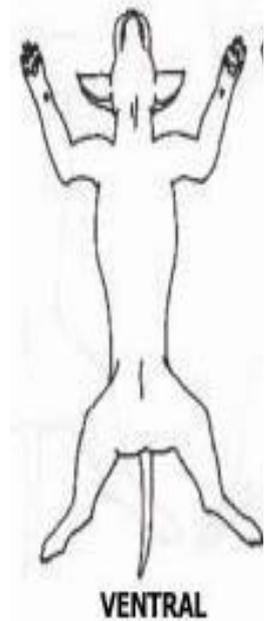
M5:

M5:

Linfonodo:

Linfonodo:

DIREITA



DATA:

PÓS-GRADUANDO RESPONSÁVEL PELA COLETA:

APÊNDICE B – Dados clínicos (raça, idade, castração, pseudociese e uso de contraceptivos) das pacientes pertencentes aos grupos 2, 3 e 4.

Quadro 1 B. Dados clínicos (raça, idade, castração, pseudociese e uso de contraceptivos) das pacientes pertencentes aos grupos 2, 3 e 4. Jaboticabal, 2014.

GRUPO	RAÇA	IDADE	STATUS REPRODUTIVO	PSEUDOCIESE	CONTRACEPTIVOS
2	SRD	11 a	Não	Não	Sim
2	Cocker	7 a	Sim	Não	Não
2	Boxer	6a6m	Sim	Sim	Sim
2	Rottweiler	7 a	Não	Não	Não
2	Poodle	7 a	Não	Não	Não
2	Poodle	9 a	Não	Não	Não
2	SRD	11 a	Não	Não	Não
2	Rottweiler	8 a	Não	Não	Não
2	Cocker Spainel	10 a	Sim	Sim	Não
2	Wire Fox Terrier	10 a	Não	Sim	Sim
2	SRD	13 a	Não	Sim	Não
2	PittBull	11 a	Sim	Sim	Não
2	SRD	7 a	Não	Sim	Não
2	SRD	7 a	Não	Sim	Não
2	Poodle	16 a	Não	Sim	Não
2	Labrador	10 a	Não	Não	Não
2	Fox Paulistinha	8 a	Não	Não	Não
2	Cocker	11 a	Não	Não	Sim
2	Fox Paulistinha	7 a	Não	Não	Não
2	Cocker	9 a	Não	Não	Não
2	SRD	7 a	Sim	Sim	Não
2	Pastor Alemão	S/H	S/H	S/H	S/H
2	Daschund	S/H	S/H	S/H	S/H
2	Maltês	8 a	Não	Sim	Não
2	SRD	S/H	S/H	S/H	S/H
2	SRD	20 a	Não	Não	Não
2	Poodle	10 a	Não	Não	Não
2	SRD	17 a	Não	Não	Não
2	Rottweiler	11 a	não	Sim	Não
2	Poodle	7 a	S/H	S/H	S/H
3	Rottweiler	8 a	Não	Não	Não
3	Daschund	10 a	Não	Sim	Não

3	Pastor Alemão	10 a	Sim	Não	Não
3	SRD	11 a	Não	Não	Não
3	Cocker Spaniel	10 a	Sim	Sim	Não
3	SRD	9 a	Sim	Não	Não
3	Rottweiler	7 a	Não	Não	Não
3	Daschund	7 a	Não	Sim	Não
3	Poodle	13 a	Não	Sim	Não
3	Wire Fox Terrier	10 a	Não	Sim	Sim
3	SRD	12 a	Não	Sim	Não
3	SRD	7 a	Sim	Não	Não
3	Labrador	9 a	Sim	Sim	Não
3	SRD	11 a	Não	Não	Não
3	SRD	11 a	Não	Não	Não
3	Poodle	12 a	Sim	Não	Não
3	Poodle	9 a	Sim	Sim	Não
3	Poodle	12 a	Não	Não	Não
3	Boxer	7 a	Sim	Sim	Não
3	Cocker Spaniel	12 a	Não	Não	Não
3	Boxer	9 a	Não	Não	Não
3	SRD	8 a	Não	Não	Sim
3	Poodle	12 a	Não	Sim	Não
3	Poodle	16 a	Não	Sim	Não
3	Poodle	11 a	Sim	Sim	Não
3	Pastor Alemão	11 a	Sim	Não	Não
3	Cocker Spaniel	8 a	Sim	Não	Não
3	Cocker Spaniel	10 a	Não	Não	Não
3	Poodle	7 a	Não	Não	Não
3	Labrador	10 a	Não	S/H	Não
3	Boxer	10 a	Não	Sim	Não
3	Beagle	7 a	Não	Sim	Não
3	Pinscher	12 a	Sim	Não	Não
3	Cocker Spaniel	11 a	Não	Não	Sim
3	SRD	12 a	Não	Não	Não
3	Pit Bull	12 a	Sim	Sim	Não
3	SRD	13 a	Sim	Não	Não
3	SRD	11 a	Não	Sim	Não
3	Lhasa apso	10 a	Sim	Não	Não
3	SRD	5 a	Sim	Sm	Sim

3	Lhasa apso	13 a	Sim	Sim	Não
3	Fox Paulistina	8 a	Não	S/H	S/H
3	Pinscher	11 a	Sim	Não	Não
3	SRD	12 a	Sim	Sim	Sim
3	Poodle	9 a	Não	Não	Não
3	Poodle	10 a	Não	Sim	Sim
3	SRD	9 a	Não	Não	Não
3	Poodle	12 a	Sim	S/H	Não
3	Boxer	8 a	Não	Sim	Não
3	Daschund	9 a	Não	Sim	Sim
3	Bulldog	8 a	S/H	S/H	S/H
3	Poodle	14 a	S/H	S/H	S/H
3	Maltês	8 a	Não	Sim	Não
3	SRD	12 a	Sim	Não	Não
3	Daschund	10 a	Não	Sim	Não
3	Poodle	10 a	Não	Não	Não
3	SRD	12 a	Não	Sim	S/H
3	Cocker Spaniel	12 a	Sim	Não	S/H
3	Poodle	12 a	Sim	Não	Não
3	SRD	12 a	Sim	Sim	Não
3	Pinscher	1a6m	Não	Não	Não
3	SRD	10 a	Não	Sim	Não
3	SRD	17 a	Não	Não	Não
3	Cocker Spaniel	7 a	Não	Não	S/H
3	Pit Bull	10 a	Sim	S/H	Não
3	SRD	15 a	S/H	S/H	S/H
3	SRD	13 a	Não	Não	Sim
3	Pinscher	13 a	Sim	Não	Não
3	Pastor Alemão	14 a	Não	Sim	Sim
3	SRD	9 a	Não	Sim	Não
3	SRD	9 a	Não	Não	Não
4	Pinscher	10 a	Não	Sim	Não
4	SRD	10 a	Não	Não	Não
4	Pastor Alemão	12 a	Não	Não	Não
4	Poodle	12 a	Sim	Não	Não
4	SRD	7 a	Sim	Não	Não
4	Akita	12 a	Não	Não	Não
4	Cocker Spaniel	11 a	Não	Não	Não

4	Cocker Spaniel	12 a	Sim	Sim	Não
4	Poodle	11 a	Não	Sim	Não
4	SRD	15 a	Sim	Não	Não
4	Pit Bull	11 a	Sim	Sim	Não
4	Poodle	11 a	Sim	Não	Não
4	Poodle	11 a	Não	Sim	Não
4	Poodle	13 a	Sim	Sim	Não
4	Daschund	12 a	Não	Sim	Não
4	SRD	14a 7m	Sim	Sim	Sim
4	SRD	6 a	Não	S/H	S/H
4	Pastor Belga	11 a	Não	Não	Não
4	Pinscher	9 a	Não	Sim	Não
4	SRD	14 a	Não	Sim	Não
4	Daschund	11 a	Não	Sim	Não
4	Cocker Spaniel	9 a	S/H	S/H	S/H
4	SRD	13 a	Não	Sim	Não

Grupo 2: lesões benignas, grupo 3: carcinomas não metastáticos e grupo 4: carcinomas metastáticos. Status reprodutivo (castração): Sim (castrada) e Não (não castrada). a: anos de idade, m: meses de idade e S/H: animais sem histórico.

APÊNDICE C – Parâmetros clínicos (recidiva, ulceração, tamanho tumoral, *status* nodal e tratamento) das pacientes dos grupos 3 e 4.

Quadro 1 C. Parâmetros clínicos (recidiva, ulceração, tamanho tumoral, *status* nodal e tratamento) das pacientes dos grupos 3 e 4. Jaboticabal, 2014.

GRUPO	ULCERAÇÃO	RECIDIVA	TAMANHO TUMORAL	STATUS NODAL	TRATAMENTO
3	Não	Não	T3	0	Cirurgia
3	Não	Não	T3	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T3	0	Cirurgia
3	Sim	Não	T2	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia + QT
3	Não	Não	T3	0	Cirurgia
3	Sim	Não	T2	0	Cirurgia
3	Não	Não	T2	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T2	0	Cirurgia
3	Não	Não	T3	0	Cirurgia + QT
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T2	0	Cirurgia
3	Não	Não	T2	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Sim	Não	T2	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Sim	T3	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Sim	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia

3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T3	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T3	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T2	0	Cirurgia
3	Sim	Não	T3	0	Cirurgia
3	Não	Não	T3	0	Cirurgia
3	S/H	Não	T1	0	Cirurgia
3	S/H	S/H	S/H	S/H	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	S/H	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Sim	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Sim	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T3	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T2	0	Cirurgia
3	Não	S/H	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T2	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	X	Não	T3	0	Cirurgia + QT
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Sim	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T3	0	Cirurgia
3	Não	Não	T1	0	Cirurgia
3	Não	Não	T2	0	Cirurgia
4	Sim	Não	T3	0	Cirurgia + QT
4	Sim	Não	T3	1	Cirurgia
4	Sim	Não	T2	0	Cirurgia + QT
4	Não	Sim	T2	1	Cirurgia + QT
4	Não	Não	T3	0	Cirurgia

4	Não	Sim	T3	1	Cirurgia + QT
4	Não	Não	T1	1	Cirurgia
4	Não	Sim	T1	0	Cirurgia
4	Não	Não	T1	1	Cirurgia + QT
4	Não	Não	T2	0	Cirurgia
4	Não	Não	T1	0	Cirurgia
4	Sim	Não	T3	1	Cirurgia
4	Não	Sim	T3	1	Cirurgia + QT
4	Não	Não	T1	0	Cirurgia
4	Não	Não	T3	1	Cirurgia + QT
4	Sim	Não	T3	1	Cirurgia
4	Sim	Não	T3	1	Cirurgia + QT
4	Não	Não	T3	0	Cirurgia
4	Não	Não	T3	1	Cirurgia
4	Sim	Não	T3	0	Cirurgia
4	Não	Não	T1	1	Cirurgia
4	S/H	S/H	T3	1	Eutanásia
4	Não	Não	T1	1	Cirurgia

Grupo 3: carcinoma não metastático e grupo 4: carcinoma metastático. Tamanho tumoral (T1: tumor < 3 cm; T2: tumor 3-5 cm e T3: tumor > 5cm. Status nodal (0: sem metástase em linfonodo regional e 1: com metástase em linfonodo regional), S/H: sem histórico e QT (quimioterapia).

APÊNDICE D – Tipo histológico, grau de malignidade e estadiamento clínico dos tumores das pacientes dos grupos 3 e 4.

Quadro 1 D. Tipo histológico, grau de malignidade e estadiamento clínico dos tumores das pacientes dos grupos 3 e 4. Jaboticabal, 2013.

GRUPO	TIPO HISTOLÓGICO *	GRAU	TNM	ESTÁDIO
3	Ca papilar	II	T3N0M0	III
3	Ca tubular	I	T3N0M0	III
3	Ca em tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca sólido	II	T3N0M0	III
3	Ca em tumor misto	II	T2N0M0	II
3	Ca tubular	I	T1N0M0	I
3	Ca papilar	I	T3N0M0	III
3	Ca papilar	I	T2N0M0	II
3	Ca em tumor misto	II	T2N0M0	II
3	Ca tubular	I	T1N0M0	I
3	Ca em tumor misto	I	T2N0M0	II
3	Ca papilar	II	T3N0M0	III
3	Ca em tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca tubular	I	T1N0M0	I
3	Ca em tumor misto	I	T2N0M0	II
3	Ca em tumor misto	I	T2N0M0	II
3	Ca tubular	I	T1N0M0	I
3	Ca tubular	II	T2N0M0	II
3	Ca papilar	II	T1N0M0	I
3	Ca em tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca em tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca em tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca tubular	I	T1N0M0	I
3	Ca in situ		T1N0M0	I
3	Ca em tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca em tumor misto	I	T3N0M0	III
3	Ca em tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca em tumor misto	II	T3N0M0	III
3	Ca tubular	II	T1N0M0	I
3	Ca tubular	I	T1N0M0	I
3	Ca tubular	I	T1N0M0	I
3	Ca sólido	I	T1N0M0	I
3	Ca em tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca tubular	II	T1N0M0	I

3	Ca tubular	I	T1N0M0	I
3	Ca em tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca em tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca em tumor misto	I	T3N0M0	III
3	Ca em tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca em tumor misto	I	T3N0M0	III
3	Ca em tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca papilar	II	T1N0M0	I
3	Ca em tumor misto	II	T1N0M0	I
3	Ca em tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca sólido	I	T1N0M0	I
3	Ca tubular	I	T1N0M0	I
3	Ca tubular	I	T1N0M0	I
3	Ca tubular	I	T2N0M0	II
3	Ca em tumor misto	III	T3N0M0	III
3	Ca tubular	I	T3N0M0	III
3	Ca sólido	III	T1N0M0	I
3	Ca sólido	III	S/H	S/H
3	Ca complexo	I	T1N0M0	I
3	Ca tubular	I	T1N0M0	I
3	Ca em tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca em tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca em tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca em tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca em tumor misto	II	T1N0M0	I
3	Ca papilar invasor	I	T3N0M0	III
3	Ca tubular	I	T1N0M0	I
3	Ca tubular	I	T2N0M0	II
3	Ca em tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca em tumor misto	I	T2N0M0	II
3	Ca tubular	I	T1N0M0	I
3	Ca sólido	III	T3N0M0	III
3	Ca em tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca tubular	II	T1N0M0	I
3	Ca sólido	II	T3N0M0	III
3	Ca em tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca em tumor misto	I	T2N0M0	II
4	Ca em tumor misto	I	T3N0M1	V
4	Ca sólido	II	T3N1M0	IV
4	Ca tubular	II	T2N0M0	V
4	Ca sólido	III	T2N1M0	IV
4	Ca sólido	II	T3N0M1	V

4	Ca papilar	II	T3N1M0	IV
4	Ca sólido	II	T1N1M1	V
4	Ca sólido	II	T1N0M0	V
4	Ca tubular	I	T1N1M0	IV
4	Ca em tumor misto	I	T2N0M1	V
4	Ca papilar	II	T1N0M1	V
4	Ca sólido	II	T3N1M0	IV
4	Ca micropapilar	III	T3N1M1	V
4	Ca tubular	II	T1N0M1	V
4	Ca em tumor misto	I	T3N1M0	IV
4	Ca anaplásico	III	T3N1M1	V
4	Ca em tumor misto	I	T3N1M0	IV
4	Ca tubular	I	T3N0M1	V
4	Ca complexo	I	T3N1M0	IV
4	Ca tubular	II	T3N0M1	V
4	Ca complexo	II	T1N1M0	IV
4	Ca anaplásico	II	T3N1M1	V
4	Ca papilar	I	T1N1M0	IV

SH: sem histórico. Ca= carcinoma. Classificação histopatológica de acordo com Cassali et al., 2011, estadiamento clínico tumoral de acordo com Lana et al., 2007 e graduação histológica Nottingham modificado por Elston e Ellis (1998), respectivamente.