



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Gabriela Bottaro Gelaleti

**Avaliação da interleucinas 8 e 12, do CA 15-3 e DNA livre circulante
como marcadores prognósticos no soro sanguíneo de cadelas com
neoplasia mamária**

**Dissertação apresentada para
obtenção do Título de Mestre
em Genética**

São José do Rio Preto – SP

2011

Gabriela Bottaro Gelaleti

**Avaliação da interleucinas 8 e 12, do CA 15-3 e DNA livre circulante
como marcadores prognósticos no soro sanguíneo de cadelas com
neoplasia mamária**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari

São José do Rio Preto – SP
2011

GABRIELA BOTTARO GELALETI

**Avaliação da interleucinas 8 e 12, do CA 15-3 e DNA livre circulante
como marcadores prognósticos no soro sanguíneo de cadelas com
neoplasia mamária**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética, área em Biologia Celular e Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Debora Ap. Pires de Campos Zuccari
Professora Adjunta
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa
Professora Adjunta
UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos
Professora Adjunta
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 12 de agosto de 2011

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Molecular no Câncer (LIMC) e na Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular (UPGEM) ambos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP. Ainda no Laboratório de Evolução Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP. Apoio financeiro na forma de bolsa de estudos fornecida pela FAPESP e recursos para o desenvolvimento do projeto na forma de Auxílio à Pesquisa da FAPESP.

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais, os maiores incentivadores da minha vida. Agradeço pelo apoio, dedicação e amor incondicionais e a constante torcida em cada vitória minha. Vocês são meus grandes ídolos, me espelho em vocês em tudo o que faço e tenho muito orgulho de tê-los em minha vida. Amo vocês!!!

"Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante".

Albert Schweitzer (Nobel da Paz - 1952)

Agradecimientos

Agradecimentos

Aos meus pais, obrigada pelo apoio e força, sem vocês comigo nada disso seria possível.

Ao meu irmão, Rafael, pela convivência da vida toda, sua amizade e carinho são fundamentais. Obrigada pelos conselhos, pelas conversas de “biólogos” e por todos os momentos de alegria.

Ao meu namorado, André, por todo amor, apoio e companheirismo nessa fase da minha vida e em todos esses anos. Mesmo distante, tenho a certeza que nossas conquistas são sempre direcionadas a um futuro juntos. Agradeço também a seus pais e irmão, pelo carinho e preocupação, sempre torcendo por minha vitória.

A minha avó Hermínia, pelo amor e exemplo de força, e também a minha avó Dornélia e meus avôs Hilário e Jorge, pelos ensinamentos que levo comigo para toda a vida.

Aos meus tios, tias, primos e primas. Obrigada por estarem sempre presentes na minha vida e desejarem o meu sucesso.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Debora Zuccari, pela amizade, confiança e companheirismo. Agradeço pelos valiosos ensinamentos transmitidos durante esses dois anos, pelo suporte e principalmente por ter confiado que eu seria capaz.

Aos grandes amigos do laboratório, Bruna, Camila, Marina, Lívia, Juliana R., Juliana O., Glaucia, Larissa e Vitor, pela amizade, companheirismo e pelos momentos de descontração. Vocês foram fundamentais durante essa fase da minha vida.

Aos amigos da Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular (UPGEM) da Famerp que compartilharam comigo tantos momentos bons e também a Prof^a Dr^a Eny M. Goloni-Bertollo e a Prof^a Dr^a Erika C. Pavarino pela parceria com nosso laboratório.

Aos amigos da faculdade pela convivência e amizade no momento de maior mudança e aprendizado da minha vida. Em especial a Ana Beatriz e Tamirys, companheiras de república, Ariane, Aduino, Danilo, Belini, Kido....

Aos amigos de Araçatuba pela amizade de anos e vários momentos divertidos.

As amigas Larissa e Ariane, atuais companheiras de república, pela amizade, conselhos e diversão durante esses dois anos.

A Adriana Granzotto e a Prof^{ta} Dr^a Claudia Carareto pela disposição em ajudar e parceria fundamental nessa fase final do projeto.

A Ana Paula Girol e a Prof^{ta} Dr^a Sonia M. Olini pela ajuda durante o desenvolvimento do projeto.

A Prof^{ta} Dr^a Claudia Bonini, por me receber no início da pós-graduação, pelo carinho durante esses anos e por aceitar fazer parte da minha banca de defesa. Agradeço a todos os amigos do Laboratório de Hemoglobinas e Genética de Doenças Hematológicas que sempre me ajudaram e compartilharam bons momentos comigo.

Aos médicos veterinários de São José do Rio Preto e Região pela parceria durante o projeto, e por permitir o contato com os proprietários, a ajuda de vocês foi fundamental e de grande aprendizado. E em especial, a todos os proprietários que prontamente permitiram o contato com seus “animaizinhos” tornando possível a pesquisa.

Ao Prof Domingos Zanchetta Netto e ao Prof Dr Geovanni Dantas Cassali pelo auxílio com a histotecnologia e patologia clínica.

A banca examinadora do meu exame geral de qualificação, Prof^{ta} Dr^a Cristiane Damas Gil e Prof Dr Eduardo Alves de Almeida pelas sugestões que permitiram melhorar meu trabalho.

A Prof^{ta} Dr^a Mirela Tinucci Costa por aceitar fazer parte da minha banca de defesa.

Aos alunos e professores da Pós-Graduação em Genética, pelos bons momentos compartilhados nas disciplinas, na organização do Simpósio de Genética e pela amizade.

A FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos e Auxílio Financeiro concedido, indispensáveis para a realização desse projeto.

Ao IBILCE e a FAMERP pela infra-estrutura e profissionais que possibilitaram a realização do projeto.

A Deus, pela proteção, condução aos caminhos certos e convivência com pessoas maravilhosas.

Muito obrigada!!!

Resumo

O estudo dos tumores mamários em cadelas revela-se um excelente modelo para a investigação clínico-patológica, diagnóstica e prognóstica de neoplasias mamárias. As interleucinas desempenham um papel fundamental no câncer, em especial a interleucina-8 (IL-8), que possui propriedades tumorigênicas e pró-angiogênicas e a interleucina-12 (IL-12), com propriedades anti-metastáticas e anti-angiogênicas. O marcador tumoral antígeno-carboidrato (CA 15-3) tem importante significado clínico no seguimento de pacientes com neoplasia mamária. Além disso, o DNA livre circulante de células tem sido considerado um candidato a biomarcador para tumores. Assim, foram objetivos deste estudo mensurar os níveis séricos das proteínas IL-8, IL-12, CA 15-3, bem como estimar o número de cópias das sequências CAN SINEs relacionando-os aos parâmetros clínico-patológicos e a sobrevida do grupo a fim de inferir o possível valor prognóstico desses marcadores para o câncer de mama. Através do ensaio imunoenzimático e da técnica de PCR em tempo real foram avaliadas 33 cadelas com neoplasia mamária e 50 cadelas controle e suas concentrações foram estatisticamente relacionadas aos parâmetros estabelecidos. Foi encontrada diferença significativa entre os níveis séricos de IL-8 nas cadelas com neoplasia mamária quando comparadas ao grupo controle e além disso, verificou-se aumento de IL-8 em relação à evolução tumoral, ao envolvimento linfonodal, recidiva e óbito. Baixos níveis de IL-12 foram observados em cadelas com tumores com maior tempo de evolução, cadelas com idade superior a 10 anos e, além disso, a alta taxa de sobrevida teve correlação com níveis elevados de IL-12. Assim, o aumento da IL-8 e a diminuição da IL-12 podem ser considerados marcadores prognósticos independentes confirmando seu papel como citocina tumorigênica e anti-tumorigênica, respectivamente. Para o marcador CA 15-3, foram encontrados maiores níveis em cadelas com envolvimento linfonodal e com a baixa sobrevida do grupo. Na estimativa do número de cópias de CAN SINEs foi encontrada diferença significativa em relação aos parâmetros indicadores de pior prognóstico e baixa sobrevida. Nossos resultados mostram que as proteínas IL-8, IL-12 e CA 15-3, bem como as sequências SINEs podem ser utilizadas como marcadores prognósticos não invasivos na pesquisa do câncer de mama, sendo úteis na predição de progressão e recidiva tumoral em cadelas com neoplasia mamária.

Palavras-chaves: neoplasia mamária, cadelas, marcadores prognósticos, inflamação

Abstract

Abstract

The study of mammary tumors in dogs appears to be an excellent model to investigate the clinical and pathological diagnosis and prognosis of breast cancer. Interleukins play a key role in cancer, particularly interleukin-8 (IL-8), which have tumorigenic and pro-angiogenic properties and interleukin-12 (IL-12), with anti-metastatic and anti-angiogenic properties. The tumor marker carbohydrate antigen (CA 15-3) also has important clinical significance in monitoring patients with breast cancer. In addition, free circulating DNA has been considered a candidate biomarker for cancer. The objectives of this study were to measure serum levels of protein IL-8, IL-12, CA 15-3 and to estimate the number of copies of CAN SINEs sequences relating them with clinicopathological parameters and survival of the group, in order to infer a likely value as prognostic markers in breast cancer. Through enzyme immunoassay and real-time PCR were evaluated 33 dogs with mammary cancer and 50 control dogs and their concentrations were statistically related with these parameters. Significant difference was found between IL-8 serum levels in bitches with mammary neoplasia in relation to the control group and in relation to disease progression, the lymph node involvement and in relation to death. Low levels of IL-12 were observed in female dogs with tumors with a longer evolution, aged 10 years and in addition, the high survival rate was correlated with high levels of IL-12. Thus, increased IL- 8 and decreased IL-12 can be considered independent prognostic markers which confirm their role as tumorigenic and anti-tumorigenic cytokines, respectively. For the CA 15-3 were found higher levels in dogs with lymph node involvement and poor survival of the group. In estimating the number of copies of CANSINEs, significant difference was found regarding the parameters indicators of poor prognosis and low survival. Our results show that IL-8 protein, IL-12 and CA 15-3, and the effect of SINEs can be used as noninvasive prognostic markers in breast cancer research and is useful in predicting progression and tumor recurrence in bitches with mammary cancer.

Keywords: mammary cancer, dogs, prognostic markers, inflammation

Lista de abreviaturas e símbolos

Lista de abreviaturas e símbolos

µl	micro-litro
µm	micromol
°C	Graus Celsius
AFIP	do inglês Armed Forces Institute of Pathology
Arg	Arginina
bp	do inglês base pare
BSA	do inglês Bovine Serum Albumin
CA 15-3	do inglês carbohydrate antigen
Ct	do inglês Cycle Threshold
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	do inglês Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
g	Gramma
Glu	Glutamina
HE	Hematoxilina-eosina
H₂O	Fórmula química da água
H₂O₂	Fórmula química do peróxido de hidrogênio
H₂SO₄	Ácido sulfurico
HRP	do inglês horseradish peroxidase
IFN	Interferon
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IL-8	Interleucina -8
IL-12	Interleucina -12
IL-18	Interleucina -18
IC	Intervalo de confiança
Leu	Leucina
LINEs	Long interspersed element
mg	Miligramma
mL	Mililitro
mM	Milimolar

MUC	Mucina
ng	Nanograma
NK	do inglês natural killer
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	odds ratio
PBS	do inglês phosphate buffer solution
PCR	do inglês polimerase chain reaction
pg	picograma
pH	Potencial Hidrogeniônico
RNA	Ácido ribonucléico
RNA_t	RNA transportador
ROC	do inglês receiver operating characteristic
S.E.M.	Desvio Padrão
SINE	do inglês short interspersed element
TMB	Tetrametilbenzidina
TEs	do inglês element transponible
TNF	do inglês tumor necrosis factor
TNM	Sistema de estadiamento clínico, T= tumor, N=linfonodo (do inglês node), M= metástase
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidade

Sumário

Sumário

I. INTRODUÇÃO	01
1.1 Fatores prognósticos	04
1.2 Marcadores tumorais sanguíneos	04
1.3 Inflamação e câncer	05
1.4 Citocinas e câncer	06
1.4.1 Interleucina-8	08
1.4.2 Interleucina-12	09
1.5 CA 15-3	10
1.6 Os elementos transponíveis e o câncer	12
II. OBJETIVOS	15
III. MATERIAL E MÉTODOS	17
1. Caracterização das amostras	18
2. Processamento das amostras	19
2.1 Preparação dos fragmentos tumorais e confecção das lâminas	19
2.2 Mensuração sérica pelo teste imunoenzimático de ELISA	20
2.2.1 Protocolo ELISA (IL-8)	20
2.2.2 Protocolo ELISA (IL-12)	21
2.2.3 Protocolo ELISA (CA 15-3)	21
2.3 Técnica de PCR em quantificação absoluta: estimativa do nº de cópia ..	22
2.3.1 PCR convencional para amplificação da sequência CAN SINE .	23
2.3.2 Purificação com o Kit – GFX Illustra	23
2.3.3 Clonagem no Kit topo TA	23
2.3.4 Teste com enzimas de Restrição e seqüenciamento	24
2.3.5 Digestão e linearização do plasmídeo	25
2.3.6 Cálculo do número de cópias	25
2.3.7 Tratamento das amostras com Proteinase K	25
2.3.8 PCR em tempo real – quantificação absoluta	26
3. Análise estatística	27
4. Considerações éticas	28
IV. RESULTADOS	29
1. Dados clínicos	30

2. Concentração sérica da Interleucina-8	30
3. Concentração sérica da Interleucina-12	37
4. Concentração sérica do CA 15-3	41
5. Estimativa do número de cópias das sequências CAN SINEs	45
V. DISCUSSÃO	50
VI. CONCLUSÕES	58
VII. REFERÊNCIAS	60
VIII. APÊNDICES	72
IX. ANEXOS	75
Anexo A	76
Anexo B	78
Anexo C	79

I. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma preocupação mundial, sendo esta, a neoplasia mais comum entre as mulheres e a quinta maior causa de morte relacionada ao câncer. A Organização Mundial da Saúde estima que, por ano, ocorram mais de 1.050.000 casos novos de câncer de mama em todo o mundo. Dados do Instituto Nacional do Câncer - INCA (2010) estimam a ocorrência de 49.240 novos casos desse tipo tumoral para o ano de 2011.

As taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. No Brasil, o câncer de mama é o que mais causa mortes entre as mulheres desde 1979 (INCA, 2003). Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos é de 61% e apesar do progresso nos últimos 30 anos no diagnóstico e tratamento, essa doença é ainda responsável por quase meio milhão de mortes por ano no mundo (SNOUSSI et al., 2010).

As neoplasias mamárias são igualmente ou até mais frequentes na espécie canina, e representam aproximadamente 52% de todas as neoplasias no cão (MacEWEN, 1990; SORENMO, 1998; ZUCCARI, 2001; QUEIROGA; LOPES, 2002; ZUCCARI et al., 2008) e 70% de todos os cânceres na fêmea canina, sendo 41 a 53%, de caráter maligno. A espécie canina, de fato, é a que apresenta espontaneamente, a maior incidência de neoplasias mamárias dentre todos os mamíferos e, quando comparada à mulher, apresenta três vezes mais tumores mamários (BRODEY et al., 1983).

Os tumores mamários em cadelas prestam-se como modelos apropriados, e válidos, ao estudo da biologia do câncer (SCHNEIDER et al., 1970; MOTTOLESE et al., 1994), 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, além de semelhantes características epidemiológicas (MacEWEN, 1990; PELETEIRO, 1994; ANDRADE et al., 2010). Além disso, os tumores de mama em cadelas constituem um desafio para clínicos e, principalmente, para patologistas, uma vez que a nomenclatura e classificação desses tumores têm se revelado muito difíceis e controversas, impossibilitando há muito tempo, estudos comparativos entre os resultados de investigação reportados por diferentes pesquisadores (BRODEY et al., 1983; QUEIROGA; LOPES, 2002).

Devido às muitas semelhanças compartilhadas por estas duas espécies, é natural utilizar cães e suas neoplasias para compreender melhor a patogênese dessa doença. Seres

humanos e cães de estimação também compartilham uma resposta semelhante à cirurgia e esquemas de quimioterapia (PHILLIPS; LEMBCKE; CHAMBERLIN, 2010).

A prevenção primária dessa neoplasia em humanos não é possível devido à variabilidade dos fatores de risco e às características genéticas relacionadas à sua etiologia (SNOUSSI et al., 2006). Além disso, alguns aspectos já estão bem estabelecidos no desenvolvimento da neoplasia mamária em cães: cães de raça têm duas vezes mais chances de desenvolverem tumores mamários, a ausência de receptores de estrógeno e progesterona e o uso de contraceptivos, além de dieta imprópria e idade avançada aumentam as chances de desenvolver a neoplasia. Por outro lado, sabe-se que a castração antes do primeiro cio reduz o risco em até 90%, no entanto, o problema maior é a negligência dos proprietários, que só levam o animal ao especialista quando o nódulo já tem grande diâmetro, diminuindo as chances de tratamento e cura (QUEIROGA; LOPES, 2002).

As pesquisas em câncer têm avançado rapidamente nas últimas décadas, sendo identificadas alterações genéticas associadas à tumorigênese, as quais conduzem ao processo de transformação de uma célula normal em uma célula maligna (HAHN; WEINBERG, 2002). Assim, os fatores genéticos estão cada vez mais sendo reconhecidos como contribuidores ao risco de desenvolvimento do câncer de mama (SNOUSSI et al., 2006) e são fundamentais para a melhoria da prevenção, diagnóstico e tratamento destes tumores.

O câncer é um processo complexo que se desenvolve em várias etapas controladas por perturbações genéticas como a ativação de oncogenes ou silenciamento de genes supressores tumorais e descontrole de eventos epigenéticos que ocorrem dentro da célula. Além disso, tem importância crescente na atualidade, as influências do microambiente tumoral que relacionam os fatores pró e anti-inflamatórios presentes (HAHN; WEINBERG, 2002; BAYLIN, 2005; BARTEL, 2009; PIERCE et al., 2009). O padrão de combinação dos genes mutados pode revelar relações funcionais entre genes e cascatas que levam à tumorigênese, e até identificar alvos para o desenvolvimento de tratamentos clínicos mais efetivos.

A demonstração dos parâmetros clínicos e patológicos com significado prognóstico e/ou terapêutico nesses neoplasmas, é um valioso campo para estudo na medicina veterinária. A alta incidência e a difícil resposta ao tratamento de cadelas com tumores mamários têm estimulado a busca de novos marcadores para uma detecção precoce de metástases e melhor prognóstico (DERIN et al., 2007).

1.1. Fatores Prognósticos

O estabelecimento do prognóstico e do planejamento terapêutico dos carcinomas de mama baseiam-se no tipo e grau histológico do tumor, bem como em outros parâmetros clínicos e histopatológicos, os quais consistem no sistema de estadiamento TNM, ou seja, no tamanho do tumor, no comprometimento de linfonodos regionais e nas metástases à distância (PEDERSEN et al., 2004).

Esses fatores podem ser utilizados sozinhos ou em combinação como marcadores prognósticos para a verificação da sobrevida global, sendo capazes de gerar informações importantes relacionadas ao comportamento clínico dos tumores de mama (RAKHA et al., 2010). No entanto, muitas vezes não conseguem prever a evolução da doença nem tampouco a resposta ao tratamento quimioterápico. De acordo com van't Veer e colaboradores (2005), os maiores fatores preditivos para metástase, como comprometimento de linfonodo ou grau histológico, falharam em classificar os tumores mamários em relação ao seu comportamento clínico.

O uso de marcadores prognósticos no câncer de mama é importante para a rotina de diagnóstico e pesquisa (ZUCCARI et al., 2011). Dessa forma, embora se trate de um procedimento mais complexo, a avaliação da expressão de um ou mais imunomarcadores de prognóstico apresenta-se como uma ferramenta mais útil e conclusiva (THOMAS; BERNER, 2000).

1.2. Marcadores Tumorais Sanguíneos

Os avanços no conhecimento da biologia molecular têm proporcionado melhor entendimento dos mecanismos fundamentais que regulam a proliferação e diferenciação celulares, bem como o desenvolvimento de metástases tumorais. Os marcadores tumorais ou marcadores biológicos são macromoléculas presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, cujo aparecimento e ou alterações em suas concentrações estão relacionados com a gênese e o crescimento de células neoplásicas. Tais substâncias funcionam como indicadores da presença de tumores, e podem ser produzidas diretamente pelo tumor ou pelo organismo, em resposta à presença do tumor. Os marcadores tumorais, em sua maioria, são proteínas ou pedaços de proteínas, incluindo antígenos de superfície celular, proteínas citoplasmáticas, enzimas e hormônios. Esses marcadores podem ser úteis no manejo

clínico dos pacientes com câncer, auxiliando nos processos de diagnóstico, estadiamento, avaliação de resposta terapêutica, detecção de recidivas e prognóstico, além de auxiliar no desenvolvimento de novas modalidades de tratamento. Podem ser caracterizados ou quantificados por meios bioquímicos ou imuno-histoquímicos nos tecidos ou no sangue, e por testes genéticos para pesquisa de oncogenes, genes supressores de tumores e alterações genéticas, sendo que cada marcador tumoral tem um valor de referência determinado (ALMEIDA et al., 2007).

A disponibilidade de anticorpos monoclonais que reagem com antígenos associados aos tumores de mama está se expandindo progressivamente e, dessa forma, vem permitindo que se conheça melhor a biologia das neoplasias, oferecendo com isso, uma avaliação mais precisa de prognóstico, diagnóstico e tratamento (MOTTOLESE et al., 1994). Uma classe específica de marcadores são os biomarcadores sanguíneos, que conseguem detectar precocemente a presença de células malignas no sangue de pacientes pós cirurgia (YANG et al., 2008). Marcadores sanguíneos têm vantagens no diagnóstico precoce do câncer, pois, refletem a dinâmica do estado fisiológico e patológico, e em especial, os níveis séricos destes marcadores sinalizam antes a manifestação dos sintomas clínicos (MAURYA et al., 2007). Além disso, tem como grande benefício ser um procedimento de avaliação não invasivo (WAUGH; WILSON, 2008).

Pesquisas recentes demonstram crescente variedade de marcadores moleculares que podem ser utilizados em conjunto com os marcadores morfológicos e histopatológicos presentes nos tumores, refletindo uma avaliação mais precisa do prognóstico, além de ampliar as estratégias futuras no tratamento do carcinoma mamário (GONZALEZ-ÂNGULO et al., 2007; HICKS; KULKARNI, 2008; GRALOW et al., 2008; DUFFY et al., 2010). De acordo com Barginear e colaboradores (2008), o estudo de fatores prognósticos clássicos ou novos frequentemente apresentam resultados conflitantes na literatura, tornando necessária a busca de outros fatores que possam predizer de forma mais acurada o prognóstico dos carcinomas da mama.

1.3. Inflamação e Câncer

A inflamação é um componente crítico na progressão tumoral. Muitos tipos de câncer surgem a partir de sítios de infecção, irritação e inflamação crônica, deixando claro que o microambiente tumoral, que é em grande parte controlado por células inflamatórias, tem

participação importante no processo neoplásico, promovendo a proliferação, migração, sobrevivência celular (COUSSENS; WEB, 2002) e a produção e/ou ativação de fatores anti e pró-angiogênicos. As atividades coordenadas destes elementos e as interações entre eles podem ter importantes implicações clínicas (HAIN et al., 2011).

Durante a resposta tecidual associada à lesão, a proliferação de células aumenta durante a regeneração do tecido e diminui após a remoção do agente agressor ou do reparo completo. Em contraste, os níveis celulares que sustentam os danos ao DNA e/ou agressão mutagênica continuam a proliferar em microambientes ricos em células inflamatórias, fatores de crescimento e citocinas, os quais suportam seu crescimento e potencializam o risco às neoplasias (KAREN et al., 2011).

A infiltração tumoral por células imunes supressoras na ausência de resposta das células T culmina com a evasão imune tumor-associada. A presença de células capazes de bloquear a ativação imune sistêmica e local limita a utilização de terapias destinadas a promover a imunidade antitumoral. Compreender o papel destas células supressoras na progressão tumoral e durante a imunoterapia é fundamental para melhorar a eficácia das terapias cujo alvo é a modulação imunológica (STEDING et al., 2011).

A evolução do processo inflamatório culmina na morte celular, com importantes conseqüências biológicas. A necrose leva à ruptura da membrana plasmática com liberação de moléculas pró-inflamatórias intracelulares e dano tecidual adjacente. Já a apoptose remove células redundantes mantendo a homeostase do tecido de forma não-imunogênica e sua falha pode levar ao desequilíbrio entre a taxa de proliferação e morte do tecido. Nesse sentido, a apoptose e/ou necrose desempenham papéis fundamentais nas respostas inflamatórias e imunológicas, regulando a taxa de maturação de células B e T e mantendo a viabilidade das células envolvidas nos sítios inflamatórios (WESCHE-SOLDATO et al., 2007).

1.4. Citocinas e Câncer

Citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular, sintetizadas de forma rápida e secretadas por diferentes células, de normais a alteradas (principalmente fagócitos mononucleares e linfócitos T ativados) geralmente após a estimulação. Atuam em diversas células-alvo adjacentes (pleiotropismo), muitas vezes de maneira aditiva, sinérgica ou antagonista e estão envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento da resposta imune. Em organismos multicelulares, citocinas são mediadores

intercelulares que regulam a sobrevivência, diferenciação e funções efetoras das células (NICOLINI et al., 2006).

Uma família de citocinas quimiotáticas, chamadas quimiocinas possui elevado grau de especificidade para quimiotaxia de populações específicas de leucócitos, recrutam células efetoras e atuam nos estágios da inflamação. Algumas quimiocinas denominadas interleucinas, podem ser produzidas por várias células em resposta a estímulos inflamatórios e recrutar leucócitos para locais de inflamação; outras são produzidas normalmente em vários tecidos e recrutam leucócitos (principalmente linfócitos) na ausência de inflamação. O perfil de citocinas/quimiocinas que persistem no sítio inflamatório é importante para o desenvolvimento de doenças crônicas (VICARI; CAUX, 2002). Quimiocinas participam de outros processos, como respostas imunes, doenças infecciosas, desenvolvimento de vários sistemas e órgãos, além de atuar no desenvolvimento e na progressão do câncer (ZLOTNIK, 2004).

As citocinas afetam significativamente o crescimento de tumores *in vivo*, por outro lado, também são produzidas por células tumorais e representam uma rede com grande variedade de moléculas estrutural e funcionalmente diferentes que podem atuar como fatores de crescimento ou de inibição tumoral. Como afetam o crescimento e a função de células imunológicas, podem ativar ou modular respostas antitumorais específicas ou não específicas. Além disso, citocinas são mediadores da resposta efetora da imunidade celular inata e adquirida, e provavelmente estão envolvidas no mecanismo de evasão de células tumorais do sistema de vigilância imunológica (NICOLINI et al., 2006).

As quimiocinas são classificadas em famílias com base no número e na localização dos resíduos de cisteína N-terminais. As duas principais famílias são a das quimiocinas CC, nas quais os resíduos de cisteína são adjacentes, e a família CXC, nas quais esses resíduos são separados por um aminoácido. Cada subfamília possui seu próprio receptor e tem funções diferenciadas umas das outras. As quimiocinas CXC são quimiotáticas para neutrófilos, enquanto a CC não age neste último grupo celular, atraindo monócitos, basófilos e linfócitos (BALESTIERI, 2006).

Algumas células tumorais não só regulam a expressão de quimiocinas para o recrutamento de células inflamatórias, como também usam esses fatores para promover o crescimento e progressão tumoral, sendo que a ativação angiogênica representa uma mudança no equilíbrio entre fatores pró e anti-angiogênicos (RICHMOND; THOMAS, 1986).

Os receptores das quimiocinas partilham até 90% da sequência de aminoácidos e dividem-se em quatro famílias (Figura 1): Receptores da família α ou CXCR – são 5 subtipos (CXCR1-5) e estão envolvidos em funções diferentes, as CXC ELR+ (Interleucina -8, GRO, NAP-2) ligam-se aos receptores CXCR1 e CXCR2, expressos nos polimorfonucleares e tipicamente induzem a inflamação aguda; as CXC ELR- (IP-10, Mig, I-TAC) ligam-se ao receptor CXCR3, expresso em linfócitos T ativados, monócitos e NK e tipicamente, induzem a inflamação crônica (BALESTIERI, 2006).

As quimiocinas CXC com três aminoácidos na região N-terminal (Glu-Leu-Arg/ELR) e o motivo (ELR +) são caracterizadas como pró-angiogênicas, capazes de estimular a quimiotaxia das células endoteliais, enquanto quimiocinas CXC (ELR-) possuem atividade angiostática (VANDERCAPPELLEN et al., 2008).



Fonte: BALESTIERI, 2006.

Figura 1. Subfamílias das quimiocinas (x representa os aminoácidos entre dois resíduos de cisteína) e seus receptores

A expressão das interleucinas na espécie canina não é bem estabelecida e trabalhos envolvendo a verificação dessas proteínas como possíveis marcadores prognósticos das neoplasias mamárias nessa espécie são escassos na literatura.

1.4.1 Interleucina-8

Para que ocorra transformação neoplásica, crescimento, sobrevivência, invasão e metástases há a necessidade de um ambiente pró-angiogênico. A angiogênese local é

consequência de um desequilíbrio na expressão de fatores pró-angiogênicos, em relação aos inibidores da angiogênese (SNOUSSI et al., 2010). A família das quimiocinas CXC é o único grupo de citocinas conhecidas por sua capacidade de se comportar de maneira diferente na regulação da angiogênese. Vários membros das quimiocinas CXC são promotores potentes de angiogênese, enquanto outras inibem o processo angiogênico.

A interleucina-8 (IL-8), quimiocina da família CXC produzida por células sanguíneas e por vários tecidos, é conhecida como uma citocina pró-inflamatória e pró-angiogênica e tem sido associada a progressão tumoral, e conseqüente prognóstico ruim e baixa sobrevida em muitos tipos de câncer (LEE et al., 2008). É um importante quimioatrativo responsável pelo recrutamento de leucócitos e neutrófilos e um indutor da proliferação e angiogênese tumoral (ZLOTNIK; YOSHIE, 2000), agindo como um fator mitogênico, angiogênico e/ou motogênico (XIE, 2001). Por induzir a resposta migratória de células endoteliais através da interação com seus receptores CXCR1 e CXCR2 (BOBROVNIKOVA-MARJO et al., 2004), tem conseqüentemente, participação na neovascularização do câncer.

Vários estudos sugerem o envolvimento da IL-8 no desenvolvimento do câncer. Níveis elevados foram associados com a progressão e recorrência da doença no câncer de próstata, pulmão, estômago e mama (SNOUSSI et al., 2006). Derin et al. (2007) encontraram níveis elevados em pacientes com carcinoma mamário metastático. Alguns estudos indicam que a expressão de IL-8 pode ser usada para prever o prognóstico (PEREZ et al., 2000; Vant't VEER et al., 2005), uma vez que, altos níveis séricos de IL-8 foram observados em pacientes com câncer de mama, considerando-a um fator de prognóstico ruim (BENOY et al., 2004; YAO et al., 2006). Em contraste, Zuccari et al. (2011) mostraram sub-expressão de IL-8 em células mamárias malignas comparadas a tecido normal associada a fraca marcação imunohistoquímica no diagnóstico de carcinoma em cadelas com neoplasia mamária.

1.4.2 Interleucina-12

Interleucina 12 (IL-12) é uma molécula heterodimérica composta de duas subunidades dissulfeto, uma cadeia α (subunidade p35) e uma cadeia β (subunidade p40) ligadas para formar o heterodímero ativo de 74kDa (NICOLINI et al., 2006). As principais fontes de IL-12 são os macrófagos, células dendríticas, monócitos, neutrófilos e em menor grau, células B. Essa quimiocina estimula a produção de interferon-gama (IFN- γ) pelos linfócitos T auxiliares – tipo 1 (TH1) e pelas células *natural killer* (NK), sendo essenciais para a interação entre a

imunidade inata e adaptativa e é a principal citocina responsável pela diferenciação de células T *helper* que promovem a imunidade mediada por células (CATHERINE et al., 2011).

Depois de encontrar agentes infecciosos, células fagocíticas, células B e células dendríticas (DC) produzem IL-12 para ativar as células NK e células T e induzir sua proliferação e principalmente a produção de interferons, e assim aumentar a produção e atividade de linfócitos citotóxicos. A indução de IL-12-mediada na produção de interferons ocorre predominantemente em células NK, células T CD4 + e T CD8 + (LEE et al., 1998) e resulta em um potente *feedback* positivo no qual a IL-12 induz interferon, que por sua vez, induz os macrófagos a gerarem mais IL-12. Este mecanismo para o aumento da produção de IL-12 permite aumentar a produção e atividade de linfócitos citotóxicos, promovendo a imunidade celular-mediada resultando em uma potente resposta inflamatória (YOSHIDA et al., 1998).

A IL-12 tem se mostrado eficaz contra tumores em modelos neoplásicos e ensaios clínicos. Sua atividade anti-tumoral é extensa e inclui propriedades anti-metastáticas e anti-angiogênicas (IMAGAWA et al., 2004; AIROLDI et al., 2007).

Em uma variedade de modelos de tumores experimentais, foi demonstrado que a imunogenicidade do tumor pode ser aumentada através da administração de IL-12 ou por terapia genética utilizando inserção do gene IL-12 em células tumorais (BUBENIK, 1996). Em contraste, Derin et al. (2007) relataram deficiência de IL-12 em pacientes com variados tipos de câncer, incluindo câncer de mama.

1.5 CA 15-3

Para o acompanhamento de pacientes com câncer de mama um dos marcadores tumorais mais utilizados é o CA 15-3 (carbohydrate antigen), que, em combinação com outros parâmetros clínicos, pode ter importante significado no seguimento de pacientes com neoplasia mamária.

O antígeno CA 15-3 é um marcador tumoral recomendado para o acompanhamento do curso e da resposta ao tratamento do câncer de mama na mulher. O "alvo" detectado nos ensaios de CA 15-3 é uma glicoproteína, produto do gene mucina 1 (MUC1). A MUC 1 é um complexo glicoprotéico gigante, com mais de 80% de carboidratos, contendo polipeptídeos com um centro de múltiplos oligossacarídeos ao lado da cadeia de um oxigênio ligado à serina e resíduos de treonina. A parte madura da molécula está ancorada na superfície celular,

através do domínio transmembrana. A maior parte da mucina localiza-se extracelularmente em um alongamento para além de outras superfícies celulares, caracterizando-a como macromolécula (SOUZA, 2002).

A MUC 1, liberada de sua localização na superfície celular, pode cair na circulação e a quantidade dessas moléculas no sangue, verificada pela mensuração do CA 15-3 pode fornecer informações sobre a persistência de tumores e determinar a possibilidade de ocorrência de doença recidivante, progressão e/ou resposta à terapia (SOUZA, 2002).

O marcador tumoral sérico CA 15-3 é secretado por células neoplásicas da mama. O nível de CA 15-3 raramente está elevado em mulheres no início do câncer de mama, por isso tem pouco uso como ferramenta de busca ou diagnóstico, porém é o marcador mais sensível e mais específico para o monitoramento do curso clínico em pacientes com câncer de mama metastático, auxiliando os médicos a determinar a extensão da doença e a resposta do paciente ao tratamento (KIM et al., 2009).

Elevações das concentrações séricas do CA 15-3 podem ser encontradas em aproximadamente 23% dos pacientes com câncer primário de mama e em cerca de 40 a 50% dos pacientes com metástases; em um estudo realizado por Tampellini e colaboradores (2001) foram encontrados níveis de CA 15-3 elevados ($>25\text{U/ml}$) em 75% a 80% das pacientes com tumores de mama em estadio clínico IV, e em 20% a 50% das pacientes com tumor localizado no momento do diagnóstico.

Os valores do CA 15-3 se correlacionam ainda com a extensão e o estadio da lesão. Estudos indicam que a incidência da elevação varia de acordo com o estadiamento da paciente, sendo de 5% a 30% no estadio I, 15% a 50% no estadio II, 60% a 70% no estadio III, e de 65% a 90% no estadio IV (GUIMARÃES et al., 2002). As pacientes que desenvolvem doença metastática têm elevação de CA 15-3, que pode preceder, de 2 a 9 meses os sinais clínicos. As probabilidades de progressão são respectivamente 52%, 85% e 96% para 1, 3 e 6 meses após um teste positivo. A probabilidade de não-progressão após um teste negativo é de 91%. Sua utilização está indicada no acompanhamento da recorrência do câncer de mama, monitoração de metástases e resposta à terapia (AGRAWAL et al., 2010).

Não existem na literatura estudos correlacionando a marcação sérica do CA 15-3 com as características clínico-patológicas e evolução clínica em cadelas com neoplasia mamária.

1.6 Os elementos transponíveis e o câncer

Nos últimos anos, foi observado um progresso significativo no desenvolvimento de ferramentas e reagentes necessários para analisar o genoma canino. Dada a alta homologia entre a sequência do genoma canino e do ser humano, bem como as muitas semelhanças em relação à morfologia, comportamento biológico e curso clínico de tumores mamários em ambas as espécies, isso reafirma o cão como um excelente modelo de comparação.

O genoma de mamíferos é caracterizado por um grande número de sequências repetidas, as quais são altamente variáveis entre uma espécie e outra. A maioria dessas sequências são remanescentes de elementos transponíveis e estão espalhadas por todo o genoma (BENTOLITA et al., 1999).

Os elementos transponíveis (ETs) são definidos como sequências de DNA que se movem de um local para outro no genoma, e frequentemente se duplicam no processo (BELGNAOUI et al., 2006; WESSLER, 2006). Estão envolvidos em uma ampla variedade de fenômenos biológicos, incluindo: mutações causadas pela sua inserção ou pelo transporte de sequências do DNA hospedeiro quando se deslocam de um local para outro; deleções e duplicações de sequências resultantes da recombinação homóloga entre duas cópias e dispersão de uma variedade de genes. Apesar de compreenderem um grupo bem amplo e heterogêneo, apresentam algumas características básicas que permitem sua identificação: possuem sequências nucleotídicas muito similares em ambas as extremidades, denominadas repetições terminais; contêm genes que codificam uma enzima responsável pela sua transposição; criam repetições diretas de alguns nucleotídeos no DNA alvo, como resultado da clivagem assimétrica da dupla fita durante o processo de inserção e existem em múltiplas cópias no genoma (CARARETO et al., 2001; SCHAACK, et al., 2010). Acredita-se que os elementos transponíveis são “*expressos*”, ou mesmo incentivados à ação, quando em situação de estresse, como na formação de gametas, sendo influenciados diretamente pelo ambiente (BIÉMONT; VIEIRA, 2006).

Os ETs podem ser divididos em duas principais classes, de acordo com seu modo de transposição (CAPY et al., 1998). A primeira classificação é quanto a autonomia para realização da transposição. Nesta, eles são chamados de autônomo (possuem os genes necessários para realização da transposição) ou não-autônomos (não os possuem, dependentes dos autônomos). A segunda classificação é quanto ao mecanismo de transposição, ou seja, qual intermediário é utilizado (CORDEIRO, 2007). Os elementos da Classe I, ou

retrotransposons, utilizam um intermediário de RNA, e caracterizam-se por um mecanismo de transposição que se inicia pela transcrição de sua sequência, seguida da síntese de DNA a partir do RNA produzido, realizado pela enzima transcriptase reversa por ele codificada, e se completa com a inserção da cópia desse DNA em outra posição no genoma. Os elementos da Classe II, ou transposons, utilizam o intermediário de DNA, são aqueles cuja transposição ocorre principalmente pela sua saída do sítio onde estão inseridos e reinserção em outro local. Em uma terceira classe estão incluídos diversos ETs, cujo mecanismo de transposição é desconhecido (CARARETO et al., 2001). Existe ainda uma terceira classe possível, onde se enquadraria os elementos que possuem características intermediárias as duas classes descritas anteriormente. Nesta, se encaixariam os MITEs, que são miniaturas invertidas de elementos transponíveis repetidos, que tem preferências por regiões ricas em genes (CORDEIRO, 2007).

Cerca de 97% do genoma humano é DNA não-codificante, boa parte dos quais resultou da transcrição reversa de RNAs celulares e de sua inserção em novas localizações genômicas. Uma outra parte é constituída por elementos transponíveis das superfamílias SINEs (elementos repetitivos intercalados curtos de DNA) e LINEs (elementos repetitivos intercalados longos de DNA), das quais as famílias *Alu* e *Line-1* são as principais, além dos retropseudogenes (BENTOLITA et al., 1999).

SINEs são repetições genômicas de comprimento de 80-400pb, originados de RNA (mais comumente RNAt), que constituem cerca de 5-10% do genoma. Um típico SINE consiste em três regiões: região t-RNA relacionada, região t-RNA não-relacionada e uma região rica em adenina. A região t-RNA relacionada contém um promotor interno de RNA polimerase III que permite sua transcrição. Devido ao mecanismo de amplificação, a região 3' de SINE é rica em adeninas e os elementos genômicos são flanqueados por curtas repetições (CAPY, 1998).

Já é estabelecido que SINEs devem consumir recursos de seu hospedeiro para replicação, amplificação e expressão. Além disso, novos eventos de transposição podem causar alterações graves nas atividades celulares do hospedeiro, no entanto, não está claro se SINEs são parasitas intracelulares do genoma anfitrião indefeso, ou se eles são simbioses tolerados por causa de suas ocasionais influências positivas sobre a evolução do genoma. Eles certamente são implicados na dinâmica da evolução do genoma, em que novos elementos funcionais aparecem, e os antigos são extintos (MAKALOWSKI, 2000).

SINEs foram inicialmente encontrados em primatas e roedores, e atualmente é aceito que muito dessas famílias estão presentes na maioria dos eucariotos superiores. Pelo menos

300Mb (10%) do genoma humano é composto por uma família única de SINEs, conhecida como Alus. Em carnívoros, CAN-SINE é uma família altamente repetida no genoma (~400,000pb no genoma haplóide do cão) (VASSETZKY; KRAMEROV, 2002).

Uma série de estudos mostram que pequenas quantidades de DNA circulam livremente no plasma sanguíneo e que altas quantidades são encontradas em pacientes com câncer, assim, níveis absolutos de DNA livre circulante têm sido relacionados à presença de células epiteliais malignas (STROUN et al., 2001).

O DNA circulante pode ser derivado de necrose celular uma vez que inicialmente foi encontrado DNA mutante apenas no plasma de pacientes com tumores com grande extensão. Além disso, a apoptose também é uma provável fonte de DNA plasmático, baseada predominantemente no padrão eletroforético produzido pelo DNA plasmático, semelhante ao encontrado no DNA extraído de células apoptóticas (UMETANI et al., 2006). Estudos de Umetani e colaboradores (2006) encontraram que em indivíduos saudáveis, a principal fonte de DNA livre circulante são células apoptóticas. Em contraste, o DNA liberado de células malignas varia em tamanho, porque a morte celular nos tumores malignos resulta não só da apoptose, mas também da necrose, autofagia e/ou catástrofe mitóticas.

O DNA livre circulante de células tumorais no sangue é um promissor biomarcador candidato à verificação da malignidade tumoral e do prognóstico, além disso, o estudo das sequências CAN SINEs afim de predizer o prognóstico no câncer é desconhecido, principalmente na espécie canina.

Objetivos

II. OBJETIVOS

Este estudo teve por objetivo avaliar a relação das Interleucinas 8 e 12, do CA 15-3 e do DNA livre circulante como potenciais marcadores prognósticos nas neoplasias mamárias em cadelas.

A busca pelo objetivo geral foi propiciada pelos seguintes objetivos específicos:

- Mensurar os níveis séricos de IL-8 e IL-12 e do marcador tumoral CA 15-3 no soro sanguíneo de cadelas com neoplasia mamária, relacionando-os com parâmetros clínico-patológicos, evolução clínica e sobrevida, a fim de verificar seu possível valor prognóstico;
- Estimar, por meio da expressão absoluta, o número de cópias das sequências CAN SINEs no soro sanguíneo de cadelas com neoplasia mamária, relacionando-os aos parâmetros clínico-patológicos, evolução clínica e sobrevida, a fim de verificar seu possível valor prognóstico.

Material e Métodos

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Caracterização das amostras

Foram coletadas amostras de sangue periférico de 33 cadelas com neoplasia mamária (grupo teste) e 50 cadelas hígdas (grupo controle), atendidas nas clínicas veterinárias de São José do Rio Preto e região durante os anos de 2009 e 2010. As coletas de sangue foram realizadas no momento da excisão cirúrgica do tumor, um mês, seis meses e um ano após a cirurgia. Foram colhidos fragmentos tumorais para diagnóstico histopatológico e estes foram classificados de acordo com Misdorp et al. (1999) pela AFIP (Armed Forces Institute of Pathology). Os parâmetros usados para estadiamento clínico estão de acordo com o sistema TNM (tamanho, envolvimento linfonodal, metástase) estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para tumores mamários caninos (CASSALI et al., 2010, modificado). Os critérios de exclusão para as cadelas do grupo controle foram rigorosamente seguidos, tendo sido incluídas no grupo apenas cadelas em anestro e diestro, sem histórico de doença/inflamação e procedimento cirúrgico em período próximo.

As cadelas do grupo teste foram avaliadas com relação as características clínicas (raça e idade), patológicas (tempo de evolução tumoral – período relacionado ao aparecimento tumoral até a excisão cirúrgica, número de nódulos, tamanho tumoral, grau histológico, status linfonodal, estadiamento clínico, ulceração e vascularização) e com a evolução clínica (ocorrência de metástase, recidiva local e óbito). Com relação ao estadiamento clínico (TNM) (OWEN, 1980) foi estabelecido o tamanho tumoral (T) - T1: < 3cm - T2: entre 3 e 5cm - T3: > 5cm; o envolvimento linfonodal (N) - N0: sem envolvimento aparente - N1: envolvimento unilateral - N2: envolvimento bilateral e presença de metástase à distância (M) - M0: sem metástases evidentes - M1: metástase à distância incluindo linfonodos não regionais, sendo classificados como I, II, III ou IV de acordo com a extensão tumoral e estabelecimento do prognóstico.

As cadelas que vieram a óbito por qualquer causa que não a neoplasia mamaria, sua recidiva ou metástase, foram excluídas do grupo.

2. Processamento das amostras

No momento da cirurgia foram coletados 3mL de sangue em tubo (Vacutainer) contendo gel separador (filtro 13-mm) e pequenos fragmentos tumorais, que foram armazenados em tubos estéreis tipo Falcon contendo formol 10%, para posterior preparação histopatológica e visibilização em Hematoxilina-Eosina (HE).

As amostras de sangue foram transportadas ao laboratório, incubadas em banho maria a 37°C por 20 minutos e em seguida centrifugadas por 25 minutos a 1000g. O soro foi aliquoteado e estocado à -80 °C.

2.1 Preparação dos fragmentos tumorais e confecção das lâminas

A inclusão do material em parafina oferece resistência permitindo seu corte em espessuras de 3µm a 5µm. Após a retirada do tumor a fresco, o preparo das lâminas permanentes envolveu as etapas de: Fixação: formol 10% seguido de álcool 70%; inclusão: pela desidratação em etanol com aumento progressivo da concentração, diafanização: xilol por 1 hora cada e impregnação: mergulhado em parafina.

O bloco foi preso ao micrótomo, a espessura do corte foi regulada para 3µm e os cortes colocados em lâmina identificada e deixados na estufa a 60°C por 24 horas.

As lâminas passaram pelo processo de desparafinização em xilol, seguida por hidratação em álcool absoluto I, II e III finalizando com 6 mergulhos em água corrente. Para a coloração de núcleo as lâminas permaneceram em um corante básico denominado Hematoxilina por 4 a 6 minutos e foram lavadas em água corrente (6 mergulhos). Em seguida as lâminas foram mergulhadas rapidamente em álcool 70%, lavadas com água corrente por 10 minutos e submetidas a 6 mergulhos em álcool 80%. Para a coloração de citoplasma as lâminas permaneceram 30 segundos em um corante ácido denominado Eosina. Em seguida o tecido foi desidratado em álcool 95% (6 mergulhos) e álcool absoluto I e II (6 mergulhos em cada) e clarificados em Xilol I, II e III (6 mergulhos em cada) finalizando com a montagem das lâminas.

Ao final da coloração as estruturas basófilas do tecido foram coradas em tonalidade azul, roxa ou violeta, enquanto as estruturas acidófilas apresentaram tonalidade rósea.

2.2 Mensuração sérica pelo teste imunoenzimático de ELISA

A quantificação dos níveis séricos das proteínas IL-8, IL-12 e CA 15-3 foi estabelecida pela reação imunoenzimática com os respectivos Kits específicos.

2.2.1 Protocolo ELISA (IL-8)

A quantificação da proteína IL-8 foi determinada pelo Kit ELISA Canine CXCL/IL-8 Quantikine (R&D Systems Minneapolis, MN). O método utiliza um anticorpo monoclonal direcionado contra um antígeno distinto determinante sobre a molécula de IL-8.

Foram utilizados os anticorpos: monoclonal *mouse anti-canine* IL-8 (720µg/mL em 1.0mL de PBS¹) - captura, policlonal biotilado *mouse anti-canine* IL-8 (45µg/mL de BSA/Tween-PBS² – reagente diluente) - padrão e *canine recombinant* IL-8 (110ng/mL em 0.5mL de BSA/Tween-PBS) - detecção.

No primeiro dia da reação foram acrescentados 100uL da solução de anticorpo de captura já diluído em cada cavidade da microplaca de poliestrieno e incubado com filme plástico à temperatura ambiente “overnight” (no mínimo 12 horas). No segundo dia, foram adicionados 300uL de reagente diluente e incubado com filme plástico por 1 hora. Posteriormente, foram adicionados 100µL das amostras e do anticorpo padrão em diluições seriadas de 2000 – 1000 – 500 – 125 – 62,5 – 31,25pg/mL e incubados por 2 horas. Após, foram adicionados 100uL do anticorpo de detecção já diluído e incubado com filme plástico por 2 horas. Foram adicionados 100uL de estreptavidina (Streptavidina-HRP - R&D Systems) já diluída e a placa coberta com papel alumínio (ausência total de luz) por 20 minutos. Foram então adicionados 100uL de solução de substrato cromógeno (H₂O₂ + Tetramethylbenzidine³ - R&D Systems) já diluído e a placa coberta com papel alumínio por 20 minutos para dar início à reação enzimática e ao desenvolvimento da coloração se o antígeno estiver presente. Foram adicionados 50uL de solução de parada (2N H₂SO₄⁴) para cessar a reação. As amostras foram quantificadas pelo Leitor de ELISA (ThermoPlate), o filtro utilizado foi de 450nm. Ao intervalo de cada etapa - da inclusão dos anticorpos, amostras e reagentes - foi realizada a lavagem da placa, com o chip da lavadora programado para 3 lavagens com 300uL de solução de lavagem (0.05% Tween 20 em PBS⁵). Todas as amostras e padrões foram acrescentados na placa em duplicata.

^{1,2,3,4,5} Os protocolos de preparo das soluções estão descritos no Apêndice A.

O cálculo das DOs foi estabelecido através da curva de ajuste *four parameter logistic* (4-PL) pelo software SkanIt for Multiskan FC 2.5.1. A intensidade da coloração foi proporcional à concentração do antígeno IL-8. As amostras com DOs acima do ponto mais alto da curva padrão foram diluídas em solução de reagente diluente em séries individuais de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32 e as concentrações multiplicadas pelo fator de diluição.

2.2.2 Protocolo ELISA (IL-12)

A quantificação da proteína IL-12 foi determinada pelo Kit ELISA Canine IL-12/IL-23 p40 Quantikine (R&D Systems Minneapolis, MN). O método utiliza um anticorpo monoclonal direcionado contra um antígeno distinto determinante sobre a molécula de IL-12. A reação seguiu o mesmo protocolo de ELISA descrito para o Kit CXCL/IL-8 Quantikine, com algumas modificações descritas abaixo:

Foram utilizados os anticorpos: monoclonal *goat anti-canine* IL-12/IL-23 p40 (144µg/mL em 1.0mL de PBS) - captura, policlonal biotilado *goat anti-canine* IL-12/IL-23 p40 (18µg/mL em 1.0mL de BSA/Tween-PBS) - padrão e *canine recombinant* IL-12 (70ng/mL em 0.5mL de BSA/Tween-PBS) - detecção. Os padrões seguiram as diluições seriadas de 4000 – 2000 – 1000 – 500 – 125pg/mL. As amostras foram quantificadas pelo Leitor de ELISA (ThermoPlate), o filtro utilizado foi de 450nm.

O cálculo das DOs foi estabelecido através da curva de ajuste *four parameter logistic* (4-PL) pelo software SkanIt for Multiskan FC 2.5.1. A intensidade da coloração foi proporcional à concentração do antígeno IL-12. Não foram necessárias diluições das amostras.

2.2.3 Protocolo ELISA (CA 15-3)

A quantificação da proteína CA 15-3 foi determinada pelo Kit ELISA CANAG CA 15-3 EIA DuoSet (Fujirebio Diagnostics AB Sweden). O método utiliza um anticorpo monoclonal para a determinação quantitativa do antígeno associado ao câncer MUC-1 em soro.

O CanAg CA 15-3 é baseado em 2 anticorpos monoclonais derivados de rato, Ma695 como um anticorpo ligador reconhecendo o epítipo do carboidrato expresso no antígeno

MUC-1 e Ma552 como um anticorpo direcionado ao TRPAPG região da proteína core. A reação baseou-se em um ensaio de fase sólida não-competitivo.

Inicialmente a microplaca foi lavada com solução de lavagem (Tris-HCl + Tween 20⁶), onde foram acrescentados 25µL dos calibradores, padrões e amostras em conjunto com 100µL da solução de trabalho (Tracer HRP + Biotina Anti-CA15-3⁷) e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Após a primeira incubação, a microplaca foi novamente lavada e adicionados 100µL do substrato cromógeno (H₂O₂ + Tetramethylbenzidine) e incubado por 30 minutos com agitação constante, a abrigo da luz. Foram adicionados 100µL da solução de parada (2N H₂SO₄). As amostras foram quantificadas pelo Leitor de ELISA (ThermoPlate), o filtro utilizado foi 405nm.

O cálculo das DOs foi estabelecido através da curva de ajuste de *interpolação point to point* pelo software SkanIt for Multiskan FC 2.5.1. A intensidade da coloração foi proporcional à concentração do antígeno CA 15-3.

2.3 Técnica de PCR em quantificação absoluta: estimativa de número de cópias

Para a quantificação absoluta das sequências CAN SINEs a fim de estimar o número de cópias, foram necessárias várias etapas, seguindo os protocolos descritos abaixo.

2.3.1 Tratamento com o DNAzol

Foi realizado um pré-tratamento no soro sanguíneo nas amostras selecionadas para clonagem dos primers a fim de inativar e/ou eliminar inibidores e contaminantes da PCR (*polymerase chain reaction*) incluindo proteases e enzimas degradantes de ácidos nucleicos para posterior amplificação do fragmento CAN SINE.

Foi utilizado o kit DNAzol® Direct (Molecular Research Center – Inc. Ohio), um reagente universal para o procedimento de lise celular. O protocolo consistiu em aliquotar 1-20µL (foi estabelecido 10 µL como melhor diluição para obter a quantidade final de lisado adequada) em 0,1mL da solução de DNAzol, incubar a mistura durante 15 minutos a temperatura ambiente, passar pelo “vórtex” o lisado e aliquotar 2-5 µL do sobrenadante direcionado à PCR com volume de mix de 20-50 µL.

^{6,7} Os protocolos de preparo das soluções estão descritos no Apêndice A.

2.3.2 PCR convencional para amplificação da sequência CAN SINE

Após inúmeras pesquisas a respeito das sequências SINEs presentes no genoma canino, foi estabelecida a sequência dos oligonucleotídeos iniciadores do elemento CAN SINE, de 174 pb - CAN SINE: 5' CTGGGTGGCTCAGTCRGT 3' e 5' AGCACAGAGCCYGAYGYG 3' (VASSETZKY; KRAMEROV, 2002).

Para a PCR convencional, os oligonucleotídeos foram amplificados seguindo as seguintes condições: 30 ciclos de reação, 0,08 mM de cada dNTP, 0,4 mM de cada iniciador, 2 mM de MgCl₂ e 0,625 U de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) em tampão 1X, submetidos a 94 °C durante 10 minutos, 30 ciclos de 20 segundos de desnaturação a 94 °C, 30 segundos de anelamento a 57 °C e 30 segundos de alongação a 72 °C, seguido por dez minutos de extensão final a 72 °C. Os amplificadores foram corados com brometo de etídeo e separados a 90 V em gel de agarose 1%.

2.3.3 Purificação com o kit GFX- Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit.

Os fragmentos amplificados por meio da reação da PCR foram purificados com o kit GFX- Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare), conforme as condições do fabricante. O material purificado foi verificado por meio de um gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, e posteriormente utilizado para a clonagem.

2.3.4 Clonagem no kit Topo TA

A sequência CAN SINEs foi clonada no plasmídeo Topo TA vector ®, utilizando-se o TOPO® TA Cloning kit (Invitrogen). As condições seguidas para a clonagem foram utilizadas conforme as condições do fabricante: 4 µL do produto de PCR purificado com o Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare), foi colocado com 1 µL solução *Salt Solution* e 1 µL do vetor Topo® TA e incubado primeiramente por 30 minutos a 23 °C e em seguida no gelo por 10 minutos. Todo o volume foi colocado em 110 mL de células competentes (One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*) e incubado no gelo durante 30 minutos. Em seguida foi dado o choque térmico de um minuto a 42 °C, seguido por cinco minutos no gelo. Após o choque térmico, foi acrescentado 250 µL de meio

SOC (Invitrogen) e colocado no agitador a 200 rpm a 37 °C, durante uma hora. O material foi dividido em duas placas com meio LB sólido (preparado da seguinte forma: 0,5 g de triptona, 0,25 g de extrato de levedura, 0,5 g de NaCl e 0,75 g de ágar diluídos em 50 mL de água destilada) com 50 µg/mL de antibiótico ampicilina e 40 mg/mL de X-gal. As placas foram mantidas em estufa 37 °C *overnight*. Apenas as colônias brancas observadas continham a inserção do plasmídeo. Dessas colônias, 12 foram testadas para a presença do inserto, utilizando iniciadores M13F e M13R sob as seguintes condições: 200 mM de cada dNTP, 0,4 mM de cada iniciador, 1,25 mM de MgCl₂ e 0,5 U de Taq polimerase (Invitrogen) em tampão 1X, submetidos a 95 °C durante 10 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 56 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto e, 10 minutos a 72 °C para a extensão final das cadeias. Os amplificadores foram corados com brometo de etídeo e separados a 90 V em gel de agarose 1%. Os fragmentos amplificados tinham 183 pb (plasmídeo) mais o comprimento do fragmento que está sendo estudado (174 pb). O resto da colônia foi inoculado em tubos contendo 3 mL de meio líquido LB (0,5 g de triptona, 0,25 g de extrato de levedura, 0,5g de NaCl diluídos em 50 mL de água destilada) com 50 µg/mL de antibiótico ampicilina. Os tubos foram colocados no agitador a 120 rpm a 37 °C *overnight* para aumentar o número de bactérias contendo o plasmídeo com o inserto. Posteriormente foi realizada a extração dos plasmídeos utilizando fenol-clorofórmio. A presença da sequência de interesse no plasmídeo foi confirmada pelo perfil de restrição (por meio de enzimas de restrição) e sequenciamento.

2.3.5 Teste com enzimas de Restrição e Sequenciamento

Para o teste de enzimas de restrição foram utilizadas diferentes combinações com enzimas com cortes em diferentes posições do plasmídeo. Enzima HindIII, enzima ECOR₁, enzimas XmaI + ECOR₁ e enzimas XmaI + KpnI.

Para o sequenciamento, foi feita a reação de “*Big Dye*”⁸ de 4 amostras clonadas, sendo escolhida as amostras com melhor padrão de bases da sequência clonada.

⁸ Os protocolos de extração plasmidial e reação de “*Big Dye*” para sequenciamento estão descritos no Apêndice A.

2.3.6 Digestão e Linearização do plasmídeo

A Enzima HindIII (Invitrogen), que contém apenas um sítio no vetor, foi usada para a digestão para que o plasmídeo ficasse linear. A digestão foi realizada usando 1U de enzima para cada 1 µg de amostra, a 37 °C durante duas horas e meia, seguido de 10 minutos a 65 °C. Após a digestão, o material foi purificado usando o Illustra *GFX* PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare). Foi feita a quantificação pelo Nanodrop para o cálculo do número de cópias.

2.3.7 Cálculo do número de cópias

A quantificação foi feita pelo aparelho NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific), sendo estabelecido uma concentração final de 83,6ng/µL para o plasmídeo linearizado com a sequência CAN SINE de interesse. De acordo com Zhang; Fang (2006) e Liang et al. (2008), foi calculada o número estimado de cópias da sequência de interesse através da fórmula $(x \text{ g}/\mu\text{l DNA}) \times 6,022 \times 10^{23}/\text{tamanho do oligo em pb} \times 649$, sendo estabelecido o valor em número de cópias de 1.89×10^{13} no plasmídeo.

2.3.8 Tratamento das amostras com Proteinase K

Para a reação de PCR em tempo real, foi necessário o pré-tratamento das amostras seguindo o protocolo de Umetani et al. (2006) – “modificado” com proteinase K (Fermentas),

O protocolo seguiu as seguintes etapas: em 20 µL do soro, foram acrescentados 20 µL de uma solução de tampão contendo 2,5% de tween 20, 50 mmol/L Tris e 1 mmol/L EDTA. Essa mistura foi digerida com 16 µg de solução de proteinase K a 37 °C e deixados *overnight*, seguido de inativação durante 5 minutos a 95 °C. Após, as amostras foram centrifugadas a 10000*g durante 5 minutos e o sobrenadante foram aliqotadas aliqotado em freezer -20 °C para posterior quantificação.

Após quantificadas em Nanodrop, as amostras foram utilizadas na reação de PCR em tempo real.

2.3.9 PCR em tempo real – quantificação absoluta

Foi realizada uma etapa de otimização para determinar a melhor concentração dos oligonucleotídeos iniciadores de CAN SINEs, sendo estabelecida a concentração de 10 pmol/ μ L, essa etapa garante a saturação dos iniciadores para que não sejam fatores limitantes na velocidade de amplificação. Foi realizada também a diluição seriada para a curva na quantificação absoluta a fim de estabelecer a melhor concentração do plasmídeo no ponto inicial da curva. As diluições foram realizadas no fator de 10, com 5 pontos,

Para esta etapa, as reações foram processadas em 20 μ L contendo 19 μ L de Master Mix SybrTM Green (Applied Biosystems) e as amostras incluídas em concentração de 100 ng/ μ L. Para melhor análise dos resultados, os ensaios de otimização de concentração dos iniciadores e plasmídeo foram realizados em triplicata. Em todos os experimentos havia controles negativos da reação.

As reações foram realizadas no equipamento Real-Time PCR System Step One Plus (Applied Biosystems) pelo método SYBR Green (Applied Biosystems) através da quantificação da curva padrão (*Quantitation – Standard curve*), sendo que a cada reação foi incluída a curva padrão correspondente, com distinção do valor inicial em número de cópias e as cinco diluições seriadas. As reações compreenderam uma etapa inicial de 10 minutos a 95 °C, seguida por desnaturação inicial de 15 minutos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C. Em seguida, em estágio de curva melt, o programa continuou com 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C para anelamento dos iniciadores e extensão das cadeias, seguidos de 15 segundos a 95 °C para coleta do sinal.

Em cada reação, foi gerada uma reta com os cinco pontos da curva e todas as amostras estavam inseridas dentro desse intervalo. O resultado de cada reação foi avaliado de acordo com a eficiência da amplificação, calculada usando o *slope*, que corresponde à inclinação da reta da curva padrão, a partir do coeficiente de correlação (R^2), que é a medida da proximidade de ajuste entre a linha de regressão e os dados individuais dos pontos de C_t (*Cycle threshold*) das reações e os valores de C_t , que é o momento no qual o sistema de amplificação começa a detectar um aumento no sinal associado ao aumento exponencial do produto de PCR na fase linear da reação.

Os valores do *slope* foram padronizados de -3,1 a -3,4, refletindo eficiência de amplificação entre 100% a 110%.

Após a etapa de padronização, foram realizadas as análises para estimar o número de cópias da sequência alvo. Dessa forma, a partir dos valores de C_t de cada amostra, foram calculadas as médias das triplicatas. Posteriormente, foram calculadas as médias das triplicatas, triplicatas com desvios acima de 10 foram novamente analisadas, sendo estimada a quantidade em número de cópias de cada amostra, bem como o desvio padrão (S.E.M.).

3. Análise Estatística

Os dados obtidos na mensuração das proteínas, bem como na estimativa do número de cópias das sequências CAN SINEs foram separados de acordo com os grupos de cadelas com neoplasia mamária e cadelas controle, bem como com as características clínico-patológicas e o seguimento nas coletas para avaliação de recidiva e sobrevida.

Os resultados foram submetidos previamente à análise descritiva para determinação da normalidade e foram considerados com distribuição normal. Assim, as médias das análises referentes às quantificações para cada grupo foram comparadas pelo teste t de student ou ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Todos os valores obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão (S.E.M.).

A curva de sobrevida foi realizada pelo método de Kaplan Meier. Os pontos de corte para a expressão de cada proteína e quantificação absoluta do número de cópias foram estabelecidos através das curvas *Receiver Operating Characteristic* (ROC). Foram calculadas a sensibilidade e especificidade entre os valores obtidos e a ocorrência de óbito nas cadelas com neoplasia mamária. Os valores indicados por meio da curva ROC constituem o ponto de corte que podem promover um equilíbrio mais adequado de sensibilidade (verdadeiros positivos) e especificidade (falsos positivos) para o índice de expressão protéica e estimativa do número de cópias como discriminador do risco de óbito nas cadelas com neoplasia mamária.

Para avaliar a correlação entre cada característica clínico-patológica ao maior risco de óbito foi realizado o teste exato de *Fisher* e a influência simultânea dos fatores prognósticos sobre a mortalidade foi realizada através da análise de regressão logística multivariada.

Valores para p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Todas as análises foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism4 e Stats Direct.

4. Considerações éticas

O presente estudo não acarretou riscos físicos às cadelas selecionadas, uma vez que foram utilizados fragmentos tumorais de descarte do exame histopatológico. Os proprietários foram informados dos objetivos da pesquisa, bem como das coletas sanguíneas subseqüentes e assinaram o termo de consentimento informado (Anexo A), o médico veterinário responsável preencheu a ficha clínica do animal (Anexo B) e os dados foram plotados em tabela para posterior correlação com os dados obtidos. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP (Protocolo nº 3945/2009) (Anexo C).

Resultados

IV. RESULTADOS

1. Dados Clínicos

No grupo teste (n= 33 cadelas) a idade das cadelas variou de 6 a 16 anos com média de 10 anos. A maioria dos tumores foi classificado como maligno (88,0%), com predominância do carcinoma em tumor misto (56,0%), seguido pelo carcinoma papilar (10,0%), carcinoma túbulo-papilar (10,0%), carcinossarcoma (6,9%), sarcoma (6,9%), comedocarcinoma (3,4%), carcinoma sólido (3,4%) e carcinoma inflamatório (3,4%). Dos tumores benignos: 75% foram classificados como tumores mistos benignos e 25% como papiloma. Dentre as características clínico-patológicas, foi predominante a graduação histológica III (33%). A taxa de recidiva local foi de 24%, metástase 30% e a taxa de óbito de 30%. Além disso, 80% das cadelas que vieram a óbito apresentaram graduação histológica III/IV (Tabela 1).

As cadelas foram acompanhadas de 30 a 360 dias com média de 304 dias (0,83 anos). Para a mensuração de IL-8 e IL-12 o grupo teste foi de 30 cadelas, para a mensuração do CA 15-3 o grupo teste foi de 25 cadelas e para a estimativa do número de cópias das sequências CAN SINEs o grupo teste foi de 28 cadelas.

2. Concentração sérica da Interleucina-8

A média das concentrações séricas de IL-8 das cadelas com neoplasia mamária foi de 6334,72pg/mL e das cadelas controle de 3297,33pg/mL, com diferença estatisticamente significativa entre as dosagens dos dois grupos ($p=0,01$) (Tabela 2) (Tabela 3) (Figura 2). A média dos níveis séricos de IL-8 das coletas subseqüentes foram 6391,10pg/mL um mês após a cirurgia, 5242,63pg/mL seis meses após a cirurgia e 6041,96pg/mL um ano após a cirurgia, não sendo observada diferenças significativas entre os quatro períodos de coleta.

Quando as mensurações dos quatro períodos foram avaliadas, observou-se aumento na concentração de IL-8 um mês após a cirurgia e no último período de seguimento em 70% das cadelas que vieram a óbito e, naquelas sem histórico de recidiva tumoral, mas que foi relatada a ocorrência de processos inflamatórios e/ou infecciosos sistêmicos ou localizados.

Pela da análise univariada, foi possível verificar concentrações de IL-8 significativamente maiores em cadelas que apresentaram tempo de evolução tumoral maior que 18 meses ($p=0,02$), cadelas com múltiplos tumores na cadeia mamária ($p=0,03$) e cadelas

com envolvimento linfonodal (N1/N2) ($p=0,03$). Quanto à evolução clínica, houve associação entre o aumento dos níveis de IL-8 e a recidiva ($p=0,01$) e com o óbito ($p=0,04$) (Tabela 3) (Figura 2).

Para análise da curva de sobrevida, o melhor ponto de corte para discriminar o risco de óbito elevado nas cadelas do grupo foi de 2591,05pg/mL (sensibilidade de 80% e especificidade de 45%) (Figura 3). Para avaliar a relação entre os níveis de IL-8 e a sobrevida das cadelas foi realizado o teste Kaplan Meier, que mostrou uma correlação entre a alta concentração da proteína e a baixa taxa de sobrevida do grupo (O.R. 3,072; IC 95%= 0,7519 a 9,562; $p=0,10$) (Figura 4).

Quando cada característica clínico-patológica foi associada ao maior risco de óbito, apresentaram relação significativa: recidiva (O.R. 13,5; $p=0,007$), metástase (O.R. 9,0; $p=0,02$) e ulceração (O.R. 9,33; $p=0,01$). Além disso, foi observada tendência significativa com o pior estadiamento clínico (O.R. 6,0; $p=0,05$) e quando avaliadas as mensurações da última coleta de IL-8 (O.R. 6,0; $p=0,05$).

Ao final das coletas, foram reavaliadas as mensurações de IL-8 das cadelas que vieram a óbito por recidiva e metástase tumoral sendo novamente observado aumento significativo nos níveis dessa citocina ($p=0,03$).

Tabela 1. Características clínicas e patológicas das cadelas teste

	Raça¹	Idade (anos)	Tempo de evolução (meses)	Exame histopatológico	Nº de nódulos	TNM	Estadiamento	Recidiva	Ulceração	Vascularização	Censura	Seguimento (dias)
C1	SRD	12	até 6	Carcinoma inflamatório	múltiplos	T4/N1b/M1	IV	não	sim	abundante	óbito	30
C2	Basset hound	14	até 6	Carcinoma em tumor misto	múltiplos	T3/N0/M2	IV	sim	sim	moderada	óbito	150
C3	Poodle	12	entre 6 e 18	Carcinoma em tumor misto	único	T2/N1a/M0	II	sim	sim	abundante	óbito	240
C4	Poodle	12	entre 6 e 18	Carcinoma em tumor misto	múltiplos	T1/N0/M0	I	sim	sim	abundante	óbito	330
C5	Akita	10	até 6	Sarcoma	múltiplos	T3/N0/M0	III	sim	sim	abundante	óbito	300
C6	Dachshund	6	até 6	Carcinoma papilar	único	T2/N0/M0	II	não	não	moderada	viva	360
C7	SRD	15	mais de 18	Carcinoma em tumor misto	único	T1/N0/M0	I	não	não	moderada	viva	360
C8	SRD	9	entre 6 e 18	Carcinoma em tumor misto	múltiplos	T1 /N0/M0	I	não	não	moderada	viva	360
C9	Poodle	6	até 6	Carcinoma papilar	único	T1/N2a/M0	II	sim	não	moderada	viva	360
C10	Cocker spaniel	7	até 6	Carcinoma em tumor misto	único	T1/N0/M0	I	não	não	moderada	viva	360
C11	Poodle	10	até 6	Tumor misto benigno	múltiplos	T1/N1/M0	II	não	não	moderada	viva	360
C12	Poodle	15	até 6	Carcinoma em tumor misto	único	T1/N0/M0	I	não	não	abundante	viva	360
C13	Poodle	12	até 6	Carcinoma túbulo-papilar	múltiplos	T3/N2/M1	IV	sim	não	abundante	óbito	150
C14	SRD	8	mais de 18	Carcinossarcoma	múltiplos	T3/N0/M1	IV	não	não	moderada	óbito	300
C15	Poodle	11	até 6	Carcinoma em tumor misto	múltiplos	T1/N2/M0	II	não	não	moderada	viva	360
C16	SRD	12	mais de 18	Carcinoma túbulo-papilar	único	T1/ N0/M1	IV	não	não	moderada	viva	360
C17	SRD	7	até 6	Comedocarcinoma	único	T2/N1b/M0	II	não	sim	abundante	viva	360
C18	Pinscher	10	mais de 18	Carcinoma em tumor misto	múltiplos	T3/N2a/M0	III	sim	não	abundante	viva	360
C19	Boxer	8	até 6	Carcinossarcoma	único	T3/N0/M0	III	não	não	abundante	viva	360
C20	Pinscher	16	mais de 18	Carcinoma papilar	único	T3/N0/M0	III	não	sim	moderada	óbito	180
C21	SRD	11	até 6	Papiloma	múltiplos	T2/N0/M0	II	não	não	moderada	viva	360
C22	SRD	7	até 6	Tumor misto benigno	único	T1/N0/M0	I	não	não	moderada	viva	360
C23	Poodle	11	entre 6 e 18	Carcinoma em tumor misto	único	T3/N0/M0	III	não	não	moderada	viva	360
C24	SRD	8	até 6	Carcinoma em tumor misto	único	T3/N0/M0	III	não	sim	abundante	viva	360
C25	SRD	8	até 6	Carcinoma em tumor misto	único	T1/N0/M0	I	não	sim	abundante	viva	360
C26	Cocker spaniel	14	mais de 18	Sarcoma	único	T3/N0/M0	III	não	sim	moderada	viva	360
C27	Boxer	8	até 6	Carcinoma em tumor misto	único	T3/N0/M1	IV	não	não	abundante	viva	360
C28	Poodle	7	entre 6 e 18	Carcinoma em tumor misto	múltiplos	T1/N0/M0	I	não	não	abundante	viva	360
C29	Boxer	9	entre 6 e 18	Carcinoma tubulo-papilar	único	T3/N1a/M0	III	sim	sim	abundante	óbito	90
C30	SRD	11	mais de 18	Carcinoma em tumor misto	múltiplos	T3/N2/M0	III	não	não	abundante	viva	360
C31	SRD	13	entre 6 e 18	Carcinoma sólido	múltiplos	T3/N1b/M0	III	não	não	abundante	viva	360
C32	SRD	14	entre 6 e 18	Tumor misto benigno	único	T3/N0/M0	III	não	não	abundante	viva	360
C33	Poodle	9	entre 6 e 18	Carcinoma em tumor misto	único	T2/N1/M3	IV	não	não	moderada	óbito	150

¹ SRD - sem raça definida

Tabela 2. Concentração das proteínas IL-8, IL-12, CA 15-3 e estimativa do número de cópias CAN SINEs

	IL-8 (ng/mL)	p		IL-12 (ng/mL)	p		CA 15-3 (U/mL)	p		CAN SINEs (cópias)	p
Controle	3297 ± 405,3 ^a	0,01*	Controle	392,4 ± 50,46	0,1	Controle	1,868 ± 0,267	0,3	Controle	30536 ± 3474	0,6
Teste	6335 ± 1369 ^a		Teste	295,6 ± 41,36		Teste	1,501 ± 0,309		Teste	32985 ± 4738	

Dados foram expressos como média ± desvio padrão.

* Comparação feita pelo teste *t* student's

Tabela 3. Relação entre a concentração de IL-8 e os parâmetros clínico-patológicos

Parâmetros clínico-patológicos	Número de cadelas	IL-8
Característica Clínica*		
Controle	50	3297 ± 405.3 ^a
Amostras	30	6335 ± 1369 ^a
p		0,01
Idade*		
≤ 10 anos	16 (53%)	6201 ± 1987
>10 anos	14 (47%)	5636 ± 1447
p		0,82
Tipo Histológico*		
Maligno	27 (90%)	5795 ± 1401
Benigno	3 (10%)	5139 ± 2395
p		0,88
Número de nódulos*		
Múltiplos	12 (40%)	9581 ± 3172 ^a
Único	18 (60%)	3497 ± 1098 ^a
p		0,03
Tamanho#		
T1	11 (37%)	4249 ± 1408
T2	5 (17%)	4363 ± 1218
T3	14 (46%)	7381 ± 2452
p		> 0,05
Linfonodos regionais#		
N0	17 (56%)	3336 ± 688,8 ^a
N1/N2	13 (44%)	4184 ± 1120 ^a
p		0,03
Metástase*		
MO	23 (77%)	4985 ± 1118
M1	7 (23%)	8177 ± 4160
p		0,29
Tempo de Evolução#		
Até 6 meses	14 (47%)	3952 ± 1040 ^b
Entre 6 e 18 meses	9 (30%)	3771 ± 1311
Mais que 18 meses	7 (23%)	11725 ± 4197 ^b
p		0,02
Recidiva – Cirurgia*		
Sim	8 (27%)	8012 ± 2429 ^a
Não	22 (73%)	3380 ± 647,0 ^a
p		0,01
Recidiva/Metástase – Óbito*		
Sim	10 (33%)	8244 ± 1889 ^a
Não	20 (67%)	3769 ± 1035 ^a
p		0,03
Ulceração*		
Sim	11 (37%)	4445 ± 1524
Não	19 (63%)	6473 ± 1817
p		0,45
Vascularização*		
Abundante	14 (47%)	3857 ± 1208
Moderada	16 (53%)	7368 ± 2098
p		0,17
Estadiamento Clínico#		
I	7 (23%)	2877 ± 1159
II	7 (23%)	5633 ± 1971
III	9 (31%)	6119 ± 2258
IV	7 (23%)	8177 ± 4160
p		> 0,05
Censura*		
Óbito	10 (33%)	9365 ± 3321 ^a
Viva	20 (67%)	3705 ± 916,6 ^a
p		0,04

* diferentes letras indicam diferentes análises estatísticas (teste *t* student's, $p < 0,05$).

diferentes letras indicam diferentes análises estatísticas (teste *Anova*, $p < 0,05$).

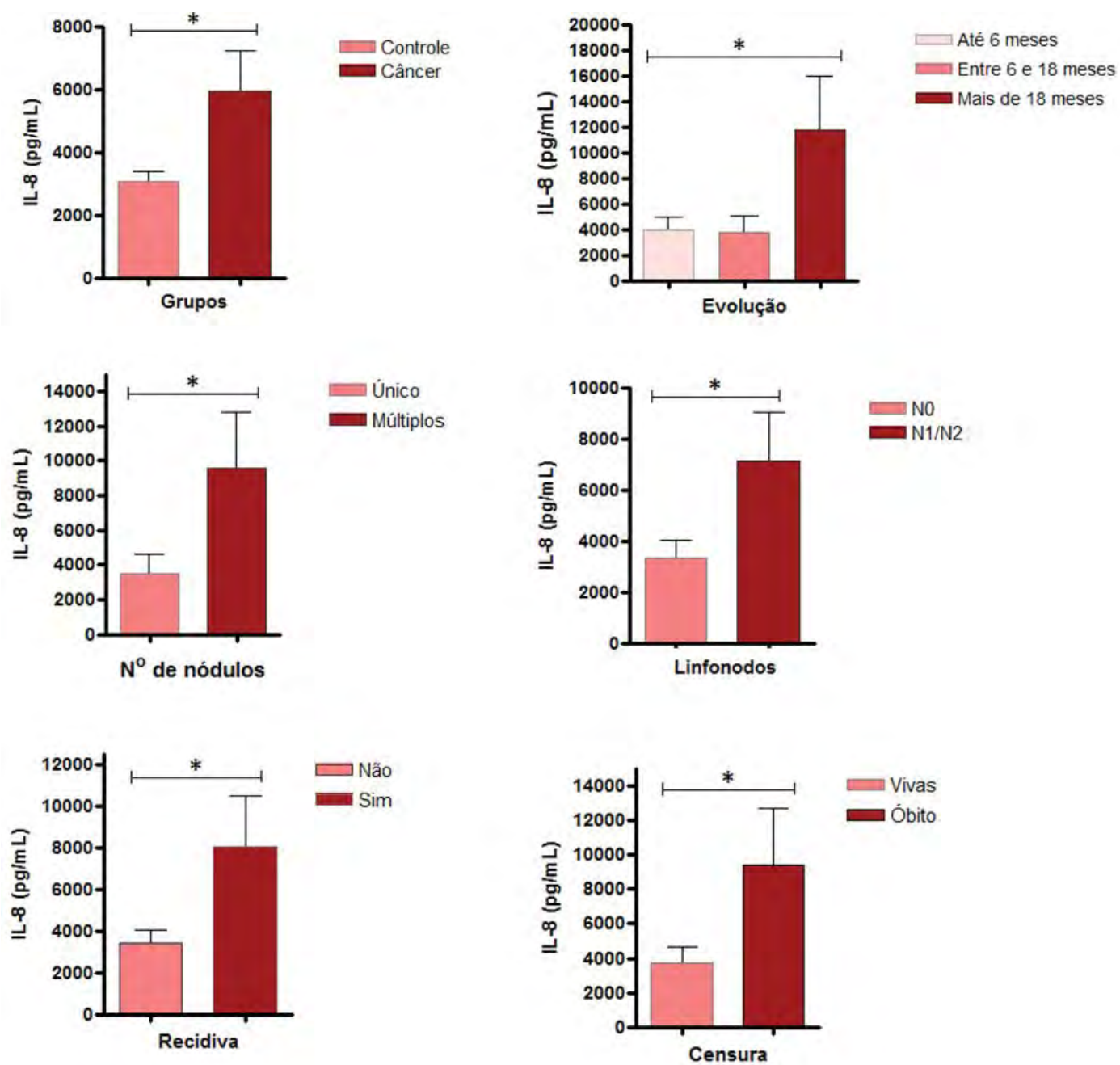


Figura 2. Representação das mensurações de IL-8 em cadelas com neoplasia mamária - Correlação entre os grupos controle e teste ($p=0,01$); diferentes tempos de evolução ($p=0,02$); número de nódulos ($p=0,03$); envolvimento linfonodal ($p=0,03$); recidiva ($p=0,01$), e censura ($p=0,04$).

* p = valor significativo pelo teste t student's e *Anova*.

IL-8

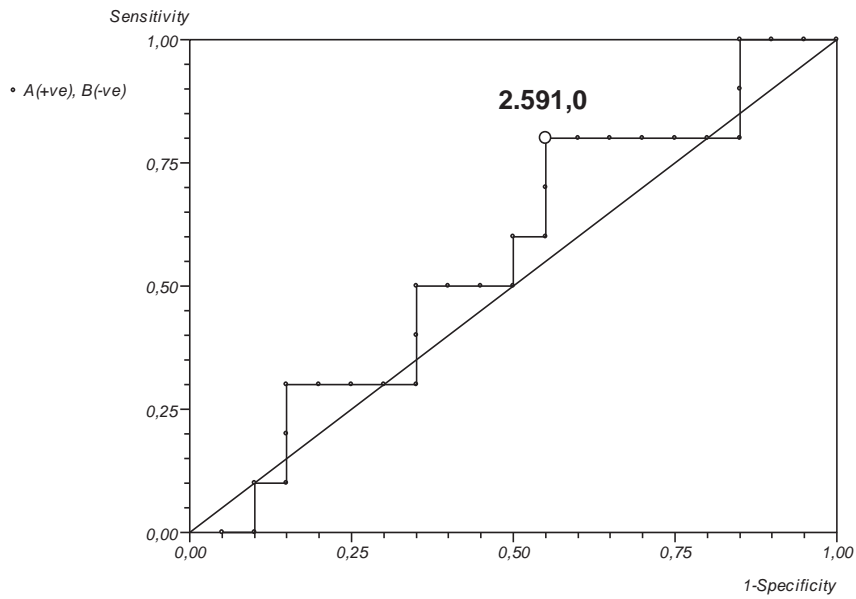


Figura 3. Valor de corte estabelecido para ocorrência de óbito pela curva ROC no grupo teste (n=30). Sensibilidade (95%IC) = 80%, Especificidade (95% IC) = 45%.

IL-8

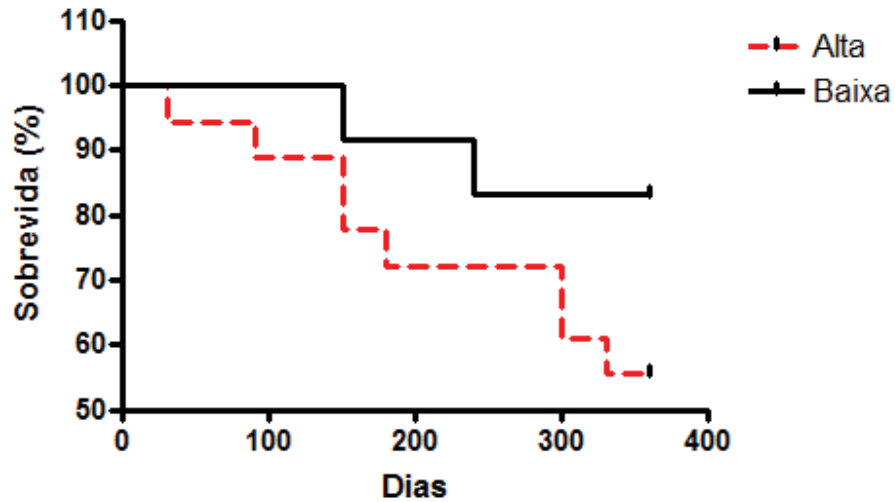


Figura 4. Sobrevida global das cadelas com alta e baixa concentração de IL-8 (valor de corte: 2591,05pg/mL) (O.R. 3,072; IC 95%= 0,7519 – 9,562; p=0,10).

3. Concentração sérica da Interleucina-12

A média das concentrações séricas de IL-12 das cadelas com neoplasia mamária foi de 295,6pg/mL e das cadelas controle de 420,3pg/mL. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as dosagens ($p>0,05$) (Tabela 2) (Tabela 4). A média dos níveis séricos de IL-12 das coletas subsequentes foram 236,2pg/mL um mês após a cirurgia, 371,5pg/mL seis meses após a cirurgia e 411,8pg/mL um ano após a cirurgia, não sendo encontrada diferença significativa entre os quatro períodos de coleta.

Quando relacionados os níveis séricos de IL-12 com as características clínico-patológicas e evolução clínica, foi possível verificar concentrações de IL-12 significativamente menores em cadelas que apresentaram tempo de evolução tumoral entre 6 e 18 meses ou maiores que 18 meses ($p=0,04$), cadelas com idade superior a 10 anos ($p=0,01$), e cadelas sem envolvimento linfonodal (N0) ($p=0,03$) (Tabela 4) (Figura 5).

Quanto à evolução clínica, foi observada diminuição dos níveis de IL-12 em cadelas que vieram a óbito e naquelas com histórico de recidiva tumoral, porém sem relação estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Para análise da curva de sobrevida, o melhor ponto de corte para discriminar o risco de óbito elevado nas cadelas do grupo foi de 167,8pg/mL (sensibilidade de 50% e especificidade de 80%) (Figura 6). Através do teste Kaplan Meier foi encontrada correlação significativa entre a alta concentração de IL-12 com a alta taxa de sobrevida do grupo (O.R. 0,2760; IC 95%= 0,03761 a 0,8129; $p=0,02$) (Figura 7).

Através do teste exato de *Fisher*, foi observada associação entre menores concentrações de IL-12 relacionadas ao maior risco de óbito (O.R. 0,1; $p=0,02$).

Tabela 4. Relação entre a concentração de IL-12 e os parâmetros clínico-patológicos

Parâmetros clínico-patológicos	Número de cadelas	IL-12
Característica Clínica*		
Controle	50	392,4 ± 50,46
Amostras	30	295,6 ± 41,36
p		0,1
Idade*		
≤ 10 anos	16 (53%)	342,9 ± 43,40 ^a
>10 anos	14 (47%)	183,6 ± 31,43 ^a
p		0,01
Tipo Histológico*		
Maligno	27 (90%)	289,3 ± 43,43
Benigno	3 (10%)	352,2 ± 159,7
p		0,6
Número de nódulos*		
Múltiplos	12 (40%)	384,9 ± 102,7
Único	18 (60%)	257,3 ± 38,60
p		0,1
Tamanho#		
T1	11 (37%)	291,0 ± 51,63
T2	5 (17%)	297,6 ± 121,3
T3	14 (46%)	297,7 ± 70,33
p		> 0,05
Linfonodos regionais#		
N0	17 (56%)	420,4 ± 90,27 ^a
N1/N2	13 (44%)	242,3 ± 31,06 ^a
p		0,03
Metástase*		
MO	23 (77%)	404,1 ± 139,4
M1	7 (23%)	287,2 ± 39,57
p		0,2
Tempo de Evolução#		
Até 6 meses	14 (47%)	333,7 ± 49,14 ^b
Entre 6 e 18 meses	9 (30%)	155,2 ± 28,36
Mais que 18 meses	7 (23%)	193,0 ± 45,52 ^b
p		0,04
Recidiva – Cirurgia*		
Sim	8 (27%)	263,5 ± 51,73
Não	22 (73%)	331,8 ± 56,06
p		0,4
Recidiva/Metástase – Óbito*		
Sim	10 (33%)	296,7 ± 86,46
Não	20 (67%)	396,1 ± 71,06
p		0,4
Ulceração*		
Sim	11 (37%)	364,6 ± 106,4
Não	19 (63%)	283,3 ± 31,79
p		0,3
Vascularização*		
Abundante	14 (47%)	392,1 ± 71,62
Moderada	16 (53%)	257,0 ± 39,7
p		0,1
Estadiamento Clínico#		
I	7 (23%)	253,0 ± 56,70
II	7 (23%)	332,2 ± 100,6
III	9 (31%)	221,3 ± 52,64
IV	7 (23%)	397,0 ± 118,0
p		> 0,05
Censura*		
Óbito	10 (33%)	222,3 ± 49,26
Viva	20 (67%)	412,7 ± 72,82
p		0,1

* diferentes letras indicam diferentes análises estatísticas (teste *t* student's, $p < 0,05$).

diferentes letras indicam diferentes análises estatísticas (teste *Anova*, $p < 0,05$).

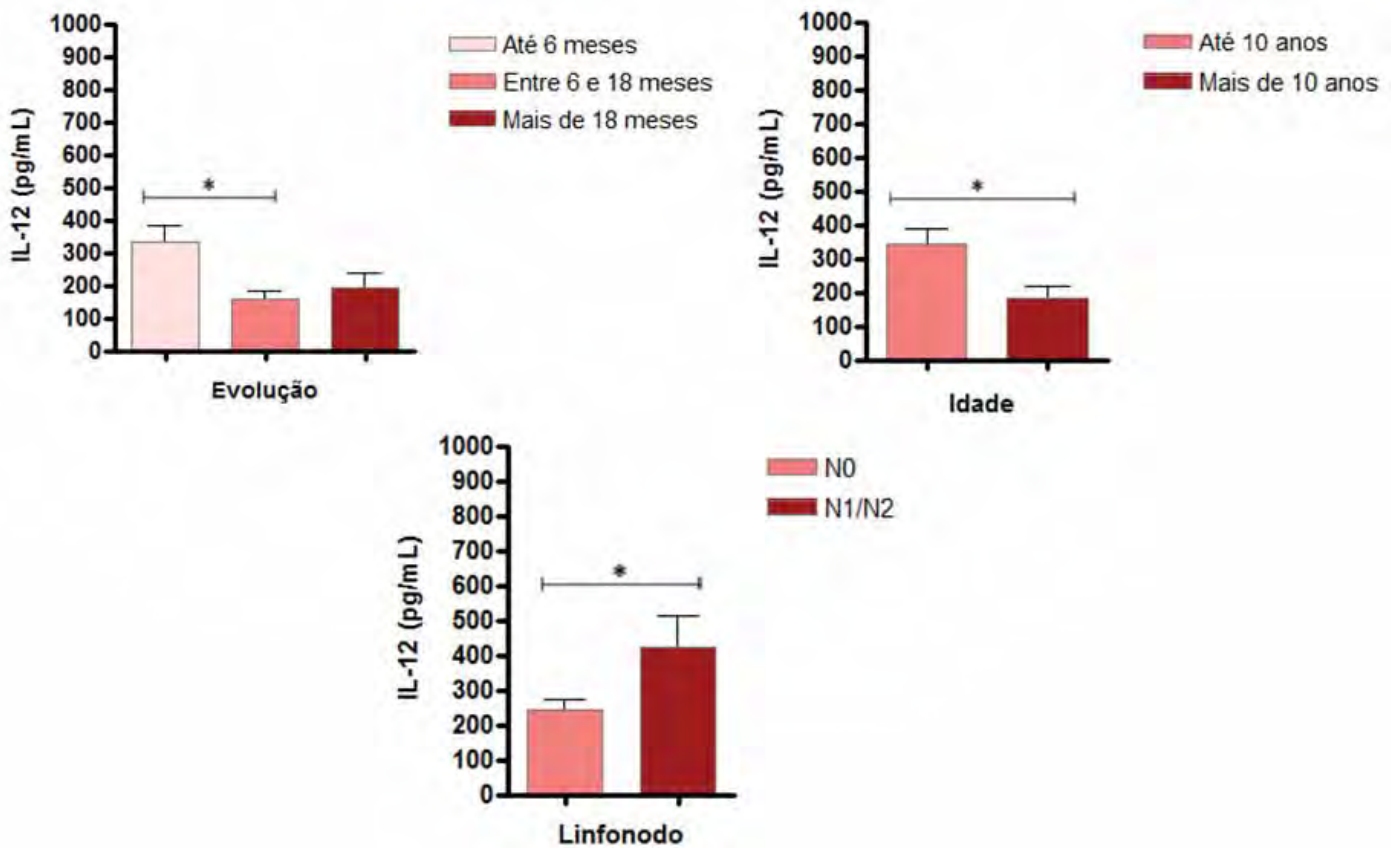


Figura 5. Representação das mensurações de IL-12 em cadelas com neoplasia mamária - Correlação entre os diferentes tempos de evolução ($p=0,04$); idade ($p=0,01$) e envolvimento linfonodal ($p=0,03$)

* p = valor significativo pelo teste t student's e *Anova*.

IL- 12

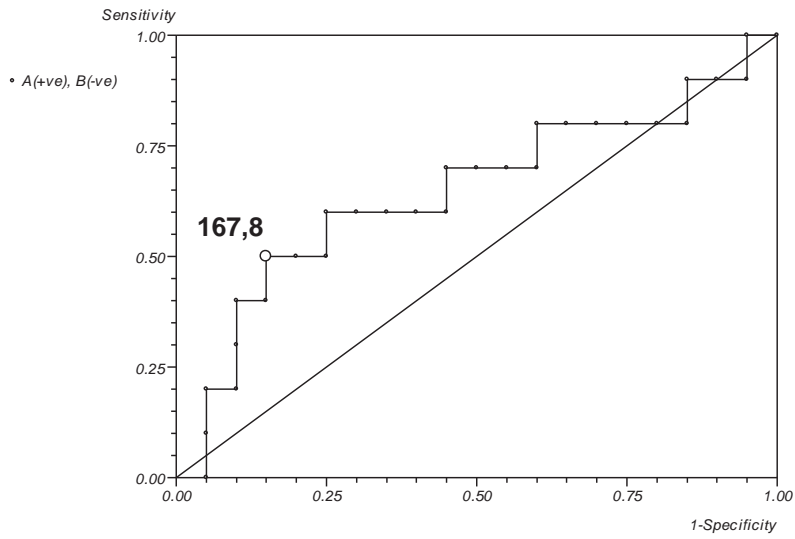


Figura 6. Valor de corte estabelecido para ocorrência de óbito pela curva ROC no grupo teste (n=30). Sensibilidade (95%IC) = 50%, Especificidade (95%IC) = 85%. IC: intervalo de confiança.

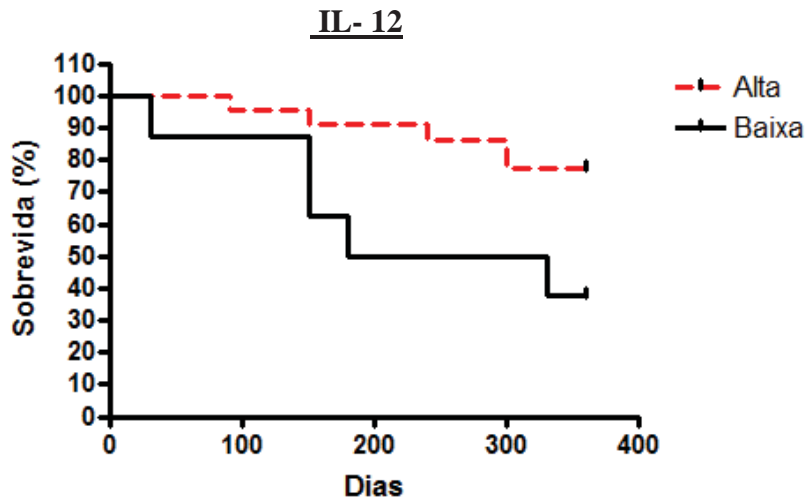


Figura 7. Sobrevida global das cadelas com alta e baixa concentração de IL-12 (valor de corte: 167,8pg/mL) (O.R. 0,2760; IC 95%= 0,03761 a 0,8129; p=0,02).

4. Concentração sérica do marcador tumoral CA 15-3

A média das concentrações séricas de CA 15-3 das cadelas com neoplasia mamária foi de 1,5U/mL e das cadelas controle de 2,0U/mL, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as dosagens ($p>0,05$) (Tabela 2) (Tabela 5). A média dos níveis séricos de CA 15-3 das coletas subsequentes foram 3,82U/mL um mês após a cirurgia, 4,68U/mL seis meses após a cirurgia e 3,78U/mL um ano após a cirurgia, não sendo encontrada relação significativa entre os quatro períodos de coleta.

Quando relacionados os níveis séricos de CA 15-3 com as características clínico-patológicas das cadelas e evolução clínica, foi possível verificar concentrações significativamente maiores em cadelas com tumores únicos na cadeia mamária ($p=0,04$) e cadelas com envolvimento linfonodal (N1/N2) ($p=0,04$) (Tabela 5) (Figura 8). Quanto à evolução clínica, não foi verificada diferença significativa nas mensurações das cadelas que vieram a óbito e/ou com histórico de recidiva tumoral ($p>0,05$). No entanto, pôde ser observada tendência de associação entre altos níveis de CA 15-3 e tumores ulcerados, tamanho T3/T4, evolução tumoral e maior estadiamento clínico.

Para análise da curva de sobrevida, o melhor ponto de corte para discriminar o risco de óbito elevado nas cadelas do grupo foi de 0,18U/mL (sensibilidade de 100% e especificidade de 35%) (Figura 9). Através do teste Kaplan Meier foi possível correlacionar a alta concentração de CA 15-3 com a baixa taxa de sobrevida do grupo ($p=0,07$) (Figura 10).

Quando cada característica clínico-patológica do grupo foi associada ao óbito, a recidiva tumoral e a presença de ulceração apresentaram relações estatisticamente significantes (O.R. 26,6; $p=0,005$) (O.R. 14; $p=0,009$) respectivamente, além disso, foi observada tendência significativa com metástase tumoral (O.R. 7,5; $p=0,05$).

Tabela 5. Relação entre a concentração de CA 15-3 e os parâmetros clínico-patológicos

Parâmetros clínico-patológicos	Número de cadelas	CA 15-3
Característica Clínica*		
Controle	40	1,868 ± 0,267
Amostras	25	1,501 ± 0,309
p		0,3
Idade*		
≤ 10 anos	13 (52%)	1,219 ± 0,248
>10 anos	12 (48%)	1,807 ± 0,589
p		0,3
Tipo Histológico*		
Maligno	23 (92%)	1,518 ± 0,334
Benigno	2 (8%)	1,310 ± 0,620
p		0,8
Número de nódulos*		
Múltiplos	11 (44%)	0,816 ± 0,247 ^a
Único	14 (56%)	2,039 ± 0,478 ^a
p		0,04
Tamanho#		
T1/T2	12 (48%)	1,11 ± 0,260
T3/T4	13 (52%)	1,862 ± 0,570
p		0,9
Linfonodos regionais#		
N0	14 (56%)	0,930 ± 0,210 ^a
N1/N2	11 (44%)	2,300 ± 0,703 ^a
p		0,04
Metástase*		
M0	19 (76%)	1,702 ± 0,391
M1	6 (24%)	0,865 ± 0,262
p		0,2
Tempo de Evolução#		
Até 6 meses	14 (56%)	1,163 ± 0,203
Entre 6 e 18 meses	6 (24%)	1,643 ± 0,927
Mais que 18 meses	5 (20%)	2,278 ± 0,988
p		0,4
Recidiva – Cirurgia*		
Sim	6 (24%)	0,805 ± 0,213
Não	19 (76%)	1,721 ± 0,391
p		0,2
Recidiva/Metástase – Óbito*		
Sim	8 (32%)	4,951 ± 3,865
Não	17 (68%)	3,791 ± 1,466
p		0,7
Ulceração*		
Sim	9 (36%)	1,834 ± 0,744
Não	16 (64%)	1,137 ± 0,205
p		0,2
Vascularização*		
Abundante	11 (44%)	1,018 ± 0,226
Moderada	14 (56%)	1,997 ± 0,506
p		0,2
Estadiamento Clínico#		
I/II	10 (40%)	1,084 ± 0,288
III/IV	15 (60%)	1,796 ± 0,528
p		0,3
Censura*		
Óbito	8 (32%)	0,811 ± 0,318
Viva	17 (68%)	1,494 ± 0,343
p		0,2

* diferentes letras indicam diferentes análises estatísticas (teste *t* student's, $p < 0,05$).

diferentes letras indicam diferentes análises estatísticas (teste *Anova*, $p < 0,05$).

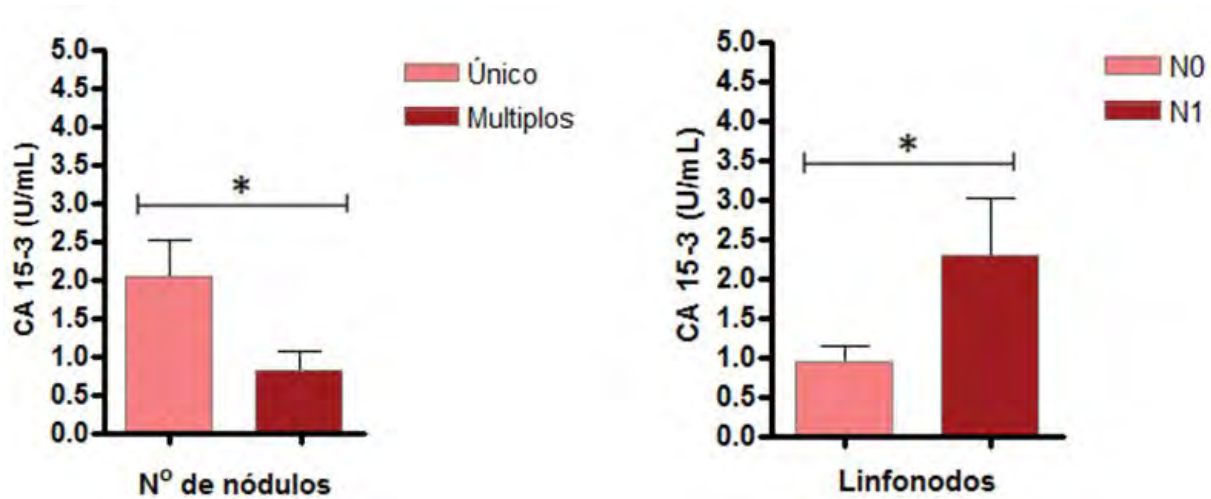


Figura 8. Representação das mensurações de CA 15-3 em cadelas com neoplasia mamária - Correlação entre localização tumoral ($p=0,04$) e envolvimento linfonodal ($p=0,04$)

* p = valor significativo pelo teste t student's e *Anova*.

CA 15-3

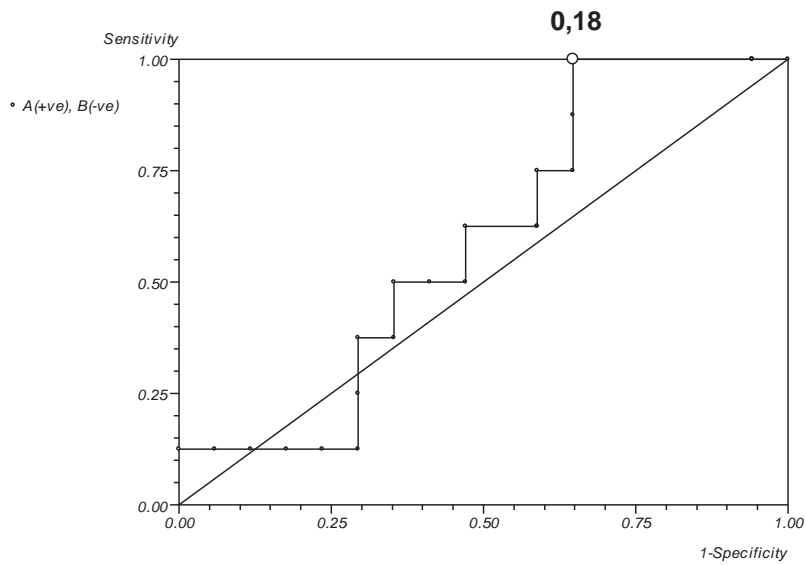


Figura 9: Valor de corte estabelecido para ocorrência de óbito pela curva ROC no grupo teste (n=25). Sensibilidade (95% IC) = 100%, Especificidade (95% IC) = 35%. IC: intervalo de confiança.

CA 15-3

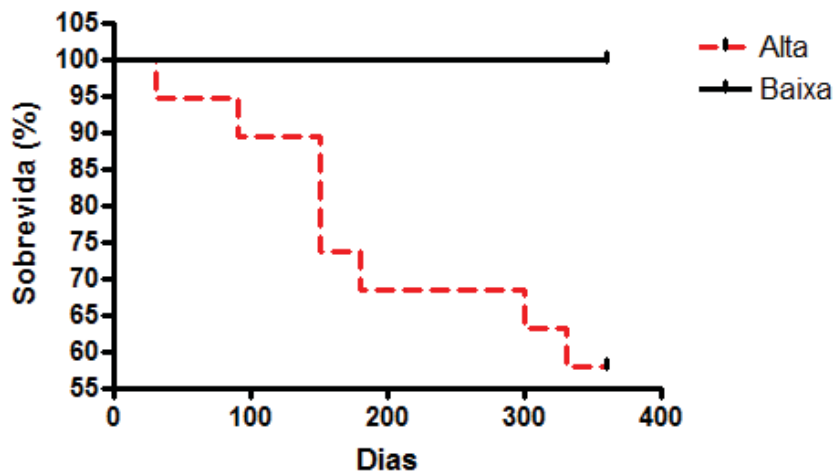


Figura 10: Sobrevida global das cadelas com alta e baixa concentração de CA 15-3 (valor de corte: 0,18U/mL) ($p=0,07$).

5. Estimativa do número de cópias das sequências CAN SINEs

Através da técnica de PCR utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores de CAN SINEs, que se ligam a regiões específicas do elemento transponível CAN, o fragmento de interesse foi amplificado e clonado e a presença da sequência de interesse no plasmídeo foi confirmada por PCR usando oligonucleotídeos iniciadores específicos para a sequência do plasmídeo (M13). Foi verificado um produto de PCR evidenciado em gel de agarose 1% com ~350pb (183 pb do plasmídeo mais 174pb do fragmento estudado), demonstrando a inserção do elemento. Para a PCR quantitativa, o plasmídeo foi linearizado e purificado, e após, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% evidenciando a banda correspondente ao tamanho do plasmídeo Topo TA (3,9Kb) mais a sequência de interesse (Figura 11).

Depois de quantificado, foi estabelecida a concentração final de 83,6ng/μL nas amostras e calculado o número estimado de cópias da sequência de interesse. O valor estabelecido foi de 1.89×10^{13} em 100ng/μL do plasmídeo. As reações para estimativa do número de cópias através do software de PCR em tempo real apresentou valores correspondentes ao número estimado da sequência CAN SINE para cada amostra do grupo de cadelas com neoplasia e cadelas controle e os resultados correlacionados às características clínico-patológicas.

A média do número estimado de cópias CAN SINE das cadelas com neoplasia mamária foi de 35.364,54 cópias e das cadelas controle de 33.793,72 cópias, não sendo observada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p>0,05$) (Tabela 2) (Tabela 6).

Através da análise univariada, houve aumento no número de cópias em cadelas com idade superior a 10 anos ($p=0,02$), tempo de evolução tumoral maior que 18 meses ($p=0,01$) (Tabela 6) (Figura 12).

Para análise da curva de sobrevida, o melhor ponto de corte para discriminar o risco de óbito elevado nas cadelas do grupo teste foi de 19.132,00 cópias (sensibilidade de 78% e especificidade de 58%) (Figura 13). Através do teste Kaplan Meier foi encontrada correlação significativa entre o aumento no número de cópias com a baixa taxa de sobrevida do grupo ($p=0,04$) (Figura 14).

Quando cada característica clínico-patológica do grupo foi associada ao óbito, a recidiva tumoral (O.R. 17; $p=0,004$), metástase (O.R. *infinity*; $p<0,001$) e ulceração (O.R. 7,5; $p=0,03$) apresentaram relação estatisticamente significativa e quando avaliadas as estimativas do número de cópias, a correlação foi estatisticamente significativa (O.R. *infinity*; $p=0,04$).

A influência simultânea dos fatores prognósticos e do número de cópias sobre o risco de óbito nas cadelas com neoplasia mamária apresentaram correlações significativas com o maior tempo de evolução ($p=0,04$), a ocorrência de recidiva tumoral ($p=0,001$), metástase ($p<0,0001$), ulceração ($p=0,001$) e o aumento no número de cópias CAN SINEs ($p=0,04$).

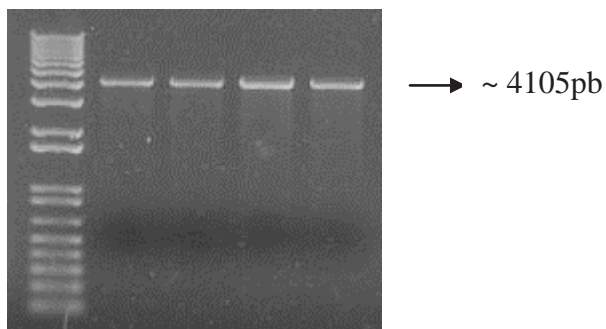


Figura 11. Padrão eletroforético em gel de agarose 1% evidenciando a banda correspondente ao tamanho do plasmídeo Topo TA (3,9Kb) mais a sequência de interesse.

Tabela 6. Relação entre o número de cópias e os parâmetros clínico-patológicos

Parâmetros clínico-patológicos	Número de cadelas	CAN SINEs
Característica Clínica*		
Controle	46	30536 ± 3474
Amostras	28	32985 ± 4738
p		0,6
Idade*		
≤ 10 anos	15 (54%)	25850 ± 4282 ^a
>10 anos	13 (46%)	45780 ± 7291 ^a
p		0,02
Tipo Histológico*		
Maligno	25 (89%)	33701 ± 4682
Benigno	3 (11%)	49228 ± 14944
p		0,2
Número de nódulos*		
Múltiplos	11 (39%)	37010 ± 9274
Único	17 (61%)	34300 ± 5837
p		0,7
Tamanho#		
T1/T2	14 (50%)	3655 ± 7156
T3/T4	14 (50%)	3418 ± 5634
p		0,7
Linfonodos regionais#		
N0	16 (57%)	28270 ± 5058
N1/N2	12 (43%)	44284 ± 7337
p		0,07
Metástase*		
M0	23 (82%)	34000 ± 5101
M1	5 (18%)	41620 ± 9312
p		0,5
Tempo de Evolução#		
Até 6 meses	13 (46%)	24638 ± 3696 ^b
Entre 6 e 18 meses	10 (36%)	41188 ± 8613
Mais que 18 meses	5 (18%)	60977 ± 10876 ^b
p		<0,05
Recidiva – Cirurgia*		
Sim	8 (28%)	36100 ± 8849
Não	20 (72%)	35070 ± 5318
p		0,9
Ulceração*		
Sim	10 (36%)	30380 ± 7634
Não	18 (64%)	38130 ± 5574
p		0,4
Vascularização*		
Abundante	15 (53%)	34214 ± 6213
Moderada	13 (47%)	36692 ± 6693
p		0,7
Estadiamento Clínico#		
I/II	13 (46%)	35900 ± 76980
III/IV	15 (54%)	34900 ± 52950
p		0,9
Censura*		
Óbito	9 (32%)	46049 ± 8811
Viva	19 (68%)	29227 ± 4863
p		0,08

* diferentes letras indicam diferentes análises estatísticas (teste *t* student's, p<0,05).

diferentes letras indicam diferentes análises estatísticas (teste *Anova*, p<0,05).

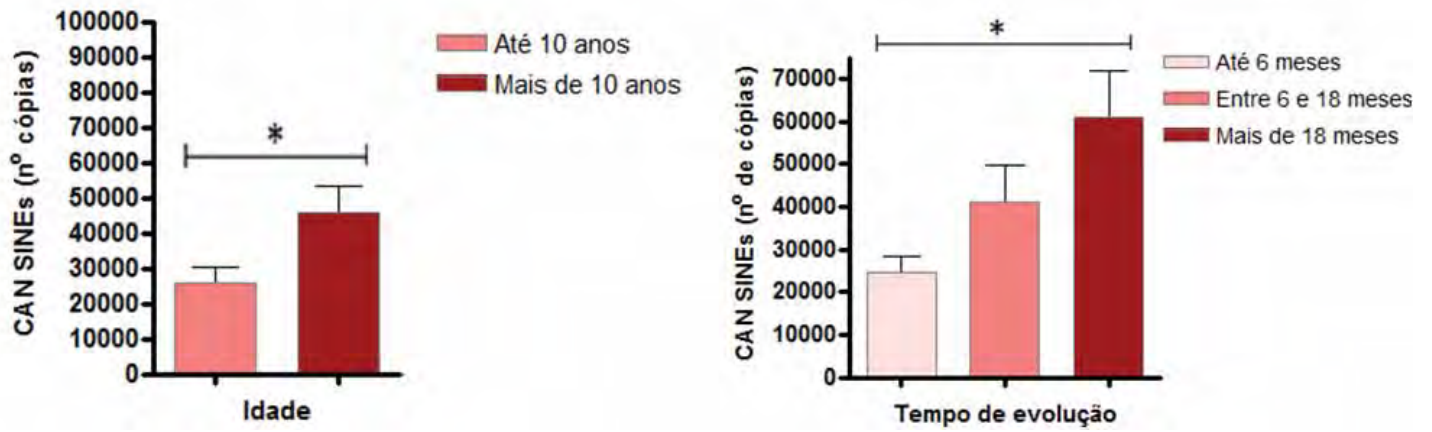


Figura 12. Representação em número de cópias em cadelas com neoplasia mamária – Correlação entre idade ($p=0,02$) e os diferentes tempos de evolução ($p=0,01$)

* p = valor significativo pelo teste *t* student's e *Anova*.

CAN SINEs

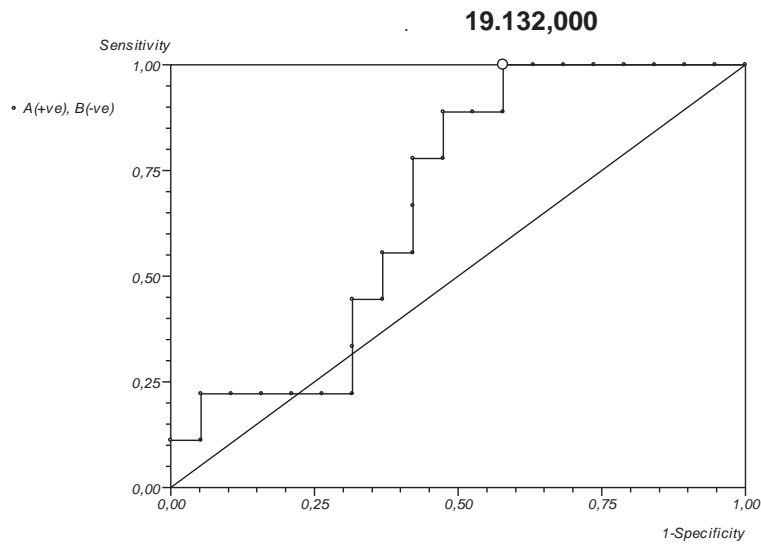


Figura 13. Valor de corte estabelecido para ocorrência de óbito pela curva ROC no grupo teste (n=28). Sensibilidade (95%IC) = 78%, Especificidade (95%IC) = 58%. IC: intervalo de confiança.

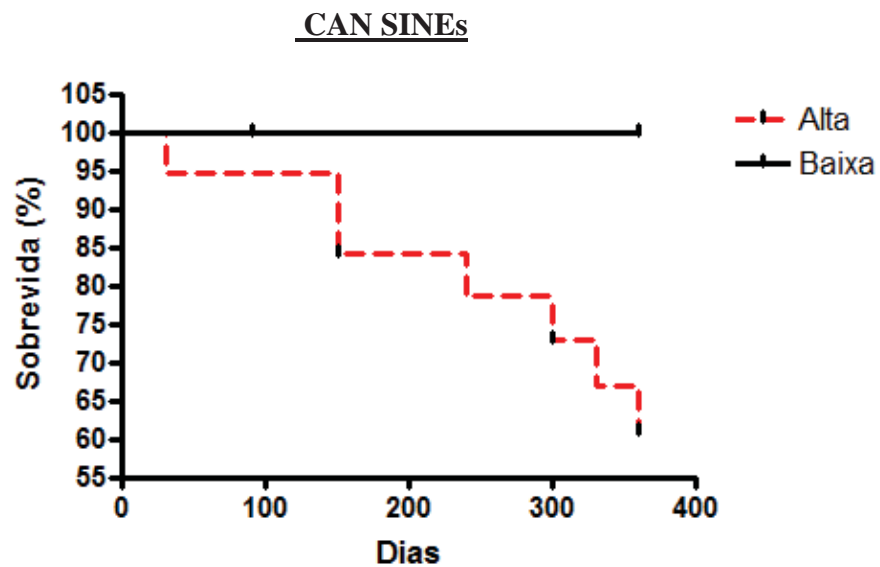


Figura 14. Sobrevida global das cadelas com alto e baixo número de cópias CAN SINEs (valor de corte: 19.132,00) (p=0,04).

V. DISCUSSÃO

A grande heterogeneidade do câncer de mama dificulta a avaliação precisa da agressividade do tumor. Torna, ainda, complexas as decisões terapêuticas e propicia tratamentos inadequados em alguns casos. Uma terapia baseada em uma avaliação prognóstica possibilita a aplicação das diferentes modalidades terapêuticas utilizadas no tratamento do câncer com a intensidade e a efetividade adequadas e individualizadas para cada paciente específico (ABREU; KOIFMAN, 2002).

Tumores espontâneos em animais de companhia representam um recurso valioso e pouco utilizado na pesquisa do câncer, uma vez que já são reconhecidos como modelos de estudo para o câncer de mama humano. A complexa interação entre o tumor e o microambiente do hospedeiro associados ao desenvolvimento e progressão tumoral podem ser efetivamente avaliados neste modelo animal e, como tal, oferecer uma perspectiva sobre a biologia do câncer (HAHN; WEINBERG, 2002).

A prevalência de malignidade estabelecida neste estudo de 88,0% foi maior que a verificada em outros estudos de neoplasias mamárias em cadelas, que consideram 50% malignos (SLATER, 2007). Este resultado inesperado pode ser considerado um ponto de interesse para investigações futuras, e pode-se inferir que este alto percentual indica que a busca pelo atendimento e subsequente exérese tumoral em nosso meio ocorre em estágios já avançados da doença. Além disso, foi constatado que a sobrevida é diretamente proporcional à diferenciação histológica, sendo observado menor sobrevida em grau III. Resultados do estudo de Karayannopoulou et al. (2005) em cães com neoplasia mamária corroboram com os achados, verificando que o número de mortes no período de dois anos foi de 0/27 (0%) para cães com carcinoma de grau I, 13/28 (46,4%) para cães com carcinoma de grau II e 26/30 (86,7 %) para cães com carcinoma de grau III.

É de extrema importância a identificação de novos fatores com potencial valor prognóstico e que possam prever o diagnóstico precoce de metástases linfonodais ou à distância, dados estes considerados fundamentais para o direcionamento de procedimentos clínicos e terapêuticos, favorecendo a sobrevida do animal. É a partir deste conceito que o uso de marcadores tumorais séricos se faz necessário, uma vez que eles desempenham papel importante no diagnóstico precoce, determinação do prognóstico, previsão da resposta terapêutica específica, detecção precoce de recorrência após cirurgia e acompanhamento de terapia em pacientes com doença avançada (KIM et al., 2009), além de ser um método pouco invasivo e de alta especificidade.

Sabe-se que há uma forte relação entre a inflamação e o câncer e esta desempenha papel diferencial na gênese e progressão do câncer. O ponto chave deste processo é o equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias secretadas (BIEN et al., 2009).

Os resultados encontrados neste estudo sugerem que a IL-8 pode ser usada como um marcador prognóstico na neoplasia mamária canina, corroborando com o estudo de Waugh et al. (2008), que sugerem que a IL-8 funciona como um fator regulatório no microambiente tumoral, sendo observado aumento na sua expressão e receptores em células tumorais, endoteliais, neutrófilos infiltrantes e macrófagos tumor-associados.

Os níveis séricos de IL-8 foram significativamente maiores nas cadelas com neoplasia mamária, quando comparados às controles. Da mesma forma, alguns estudos têm relacionado fatores inflamatórios e angiogênicos à malignidade tumoral e indicam que a expressão da IL-8 pode ser usada para prever o prognóstico (PEREZ et al., 2000; Vant't VEER et al., 2005). De acordo com Yeon et al. (2011) altos níveis de citocinas pró-inflamatórias foram verificados em pacientes com câncer de mama. Estudos de Benoy et al. (2004) e Kozlowski et al. (2003) encontraram elevadas concentrações de IL-8 em pacientes com câncer de mama bem como em estágios avançados da doença.

Através das coletas subsequentes, foi possível observar diferenças nos níveis de IL-8 a cada período pós-cirúrgico. O aumento nas concentrações de IL-8 em grande parte do grupo na coleta realizada um mês após a cirurgia, pode ser explicado pela liberação desta citocina nos sítios de inflamação e na resposta à injúria celular, que ocorre no período de cicatrização. Coussens et al. (2002) observaram que as quimiocinas possuem um grau elevado de especificidade para quimiotaxia de populações de leucócitos específicos, que recrutam células efectoras e determinam a evolução natural da resposta inflamatória.

As correlações entre o aumento nos níveis de IL-8 e os fatores de malignidade tumoral, envolvendo os parâmetros clínico-patológicos indicadores de pior evolução clínica, podem caracterizar essa citocina como marcador de prognóstico ruim. Trabalhos relacionando a IL-8 com esses parâmetros apresentam resultados controversos na literatura. Estudos de Ahmed et al. (2006) verificaram altos níveis de IL-8 em pacientes com câncer de mama com envolvimento linfonodal e presença de metástase. Yao et al. (2006) encontraram relação significativa entre os níveis de IL-8 e o tipo histológico e status linfonodal, considerando-a como fator útil no prognóstico no câncer de mama. Ao contrário, Derin et al. (2007) não encontraram diferença entre os níveis de IL-8 em pacientes com câncer e controle mas apenas relação com metástase.

Pela curva de Kaplan-Meier foi observado que 80% das cadelas que vieram a óbito apresentaram níveis elevados de IL-8 e quando reavaliadas as concentrações da última coleta

nas cadelas com recidiva e metástase tumoral, os valores apresentaram aumento estatisticamente significativo. Esses resultados sugerem que o aumento nos níveis dessa citocina possa ser considerado uma marcação prognóstica independente para a sobrevida e na identificação de pacientes com pior prognóstico. Da mesma forma, Zhou et al. (2006) conferem a essa citocina um papel de indicador da agressividade tumoral. Benoy et al. (2004) observaram altos níveis de IL-8 em 67% dos pacientes com câncer de mama avançado os quais sobreviveram por um curto período. A expressão de IL-8 e seus receptores em linhagens celulares de câncer de mama sugerem que essas células estão sujeitas aos efeitos de sinalização autócrina/parácrina dessa citocina, a qual é associada à proliferação celular, migração e invasão (WAUGH; WILSON, 2008), além de relação com o fenótipo metastático (BOBROVNIKOVA-MARJO et al., 2004; DE LARCO et al., 2003; SLATER, 2007).

Através da análise univariada com relação ao óbito, foi encontrada associação dos fatores preditivos de avanço e pior prognóstico tumoral com o aumento nas concentrações de IL-8. Tem-se bem estabelecido na literatura que o risco de recidiva e óbito em pacientes com câncer de mama é relativamente proporcional ao tamanho tumoral, envolvimento de linfonodos e presença de metástases. Além disso, de acordo com Sakao et al. (2006), pacientes com pior estadiamento clínico apresentam menor sobrevida global. Corroborando com nossos resultados, um estudo de Xie (2001) encontrou alta expressão de IL-8 associada ao pior estágio tumoral, a progressão e recorrência da doença não só no câncer de mama como também em pacientes com melanoma, câncer gástrico, de ovário e próstata. Bobrovnikova-Marjon et al. (2004) e De Larco et al. (2003) relacionaram a IL-8 ao fenótipo metastático de mama e também a promoção do potencial das células tumorais, principalmente porque essa área recebe um rico suprimento sanguíneo.

Ao contrário dos achados para IL-8, elevados níveis de IL-12 têm sido associados ao melhor prognóstico, enquanto níveis reduzidos caracterizam esta citocina como prognóstico negativo no câncer de mama (BIEN et al., 2009).

Os níveis séricos de IL-12 foram menores nas cadelas com neoplasia mamária quando comparadas às controles. Estudo de Derin et al. (2007) caracterizaram a IL-12 na imunidade antitumoral através da inibição da angiogênese, sendo sua deficiência relatada em pacientes com tipos variados de câncer, incluindo câncer de mama. Estudo de Bien et al. (2009) encontraram baixos níveis de IL-12 em grupos de pacientes com sarcomas, linfomas Hodgkin's e leucemia classificados com pior prognóstico e pior resposta a terapias adjuvantes. Ao contrário, Derin et al. (2007) não encontraram diferença entre os níveis de IL-12 em pacientes com câncer de mama ao grupo controle.

Estudos têm demonstrado resposta imune deficiente e citocinas desreguladas em pacientes diagnosticados com câncer. Já é estabelecido que células malignas são capazes de escapar da vigilância imune através de estratégias variadas, entre elas, a produção e secreção de fatores solúveis capazes de suprimir respostas antitumorais específicas; evidências suportam a idéia que a mudança de respostas do tipo Th1 para o tipo Th2 pode ser relevante em inibir as reações imunes antitumorais eficazes e promover o crescimento tumoral e sua disseminação (BIEN et al., 2009). A diminuição nos níveis de IL-12 e sua relação com parâmetros clínico-patológicos indicadores de pior evolução clínica, como o maior tempo de evolução tumoral, histórico de recidiva, óbito e idade avançada corroboram com a idéia de que a supressão dessa citocina está associada aos fatores de risco de tumorigênese e progressão tumoral. Níveis baixos de IL-12 também foram relacionados ao curto intervalo livre da doença no estudo de Bien et al. (2009) em variados tipos de câncer através da análise multivariada.

Na análise de sobrevida do grupo, foi verificado que 85% das cadelas que permaneceram vivas durante o intervalo de acompanhamento nas coletas apresentaram níveis elevados de IL-12 e, através do teste exato de *Fisher*, foi observada ainda associação entre menores concentrações de IL-12 ao maior risco de óbito. Estudos de Nagashima et al. (2008) também mostraram altos níveis de IL-12 associados a alta sobrevida em pacientes com câncer cervical. Assim, níveis elevados podem ser associados ao melhor prognóstico também em cadelas.

A IL-12 tem o potencial não só de promover a resposta imune antitumoral, mas também de bloquear a atividade de células do sistema imune. Steding et al. (2011) avaliaram a IL-12 como modulador da atividade de células supressoras mielóides através da terapia gênica e encontraram alteração na função supressora dessas células, decréscimo no percentual de células no microambiente tumoral e aumento de células T CD8(+). Além disso, o tratamento com IL-12 resultou no aumento da taxa de sobrevida, pela redução de metástases, classificando-a como um modulador da supressão imune com significativo potencial terapêutico. Estudo de Yong et al. (2011) a partir da administração de IL-12 e IL-21 na indução da atividade antitumoral de células mononucleares de sangue em pacientes com câncer endometrial, observaram aumento da citotoxicidade nas células com conseqüente inibição da apoptose celular.

A manipulação de citocinas no ambiente local tumoral tornou-se o método mais eficaz para quebrar a tolerância imunológica tumor-induzida. Muitos estudos têm descrito a terapia gênica com IL-12 no tratamento de tumores de animais de laboratório, incluindo melanomas, carcinomas de cólon e de mama (CHUANG et al., 2009). Um estudo de Chuang

et al. (2009) reportaram o tratamento com IL-12 em cães da raça *beagle* com tumor venéreo transmissível canino (CTVT), sendo observada alta resposta imunológica. Sabel et al. (2010) avaliaram a combinação de IL-12, IL-18 e TNF- α na geração da resposta imune tumor específica e na sobrevida em modelos metastáticos de câncer de mama e observaram o aumento na maturação de células dendríticas e apresentadoras de antígenos e de células T citotóxicas, resultando em uma resposta de células T anti-tumorais com base imunológica capaz de erradicar a doença disseminada.

Embora a mensuração de marcadores tumorais no câncer de mama esteja em destaque há quase 20 anos, sua utilidade permanece obscura. Em pacientes com carcinoma de mama metastático os marcadores tumorais parecem ser úteis durante o acompanhamento, mas existe uma grande variedade nas taxas de positividade, de 50 a 80%, e mais especificamente, no câncer de mama primário, são relatadas variações de 4 a 51%. Assim, estudos relacionando os marcadores tumorais com fatores prognósticos já estabelecidos no câncer visam classificá-los como potenciais parâmetros na avaliação prognóstica (MOLINA et al., 2010).

Os níveis séricos de CA 15-3 encontrados nesse estudo não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre o grupo de cadelas com neoplasia mamária e cadelas controle, confrontando com a maioria dos trabalhos encontrados na literatura. Estudo de Marchesi et al. (2010) mostraram diferença significativa entre os valores séricos desse marcador no grupo de cadelas com neoplasia comparado ao grupo controle. Estudos de Samy et al. (2010) encontraram altos níveis de CA15-3 em pacientes com câncer associados a reincidência e ao comportamento agressivo do tumor.

Os resultados controversos dos níveis séricos de determinadas proteínas encontrados na literatura, em cadelas com neoplasia mamária podem ser explicados pela grande variedade de tipos histológicos tumorais encontrados nessa espécie (MARIC et al., 2011; MARCHESI et al., 2010).

As correlações encontradas nesse estudo no aumento dos níveis de CA 15-3 aos fatores de malignidade, como ulceração, envolvimento linfonodal, maior tamanho, grau de estadiamento elevado e evolução clínica, caracterizam-na como marcador de prognóstico ruim. Estudo de Azawi et al. (2006) também relacionaram elevações nos níveis de CA 15-3 ao prognóstico ruim, incluindo maior tamanho tumoral, estágio avançado da doença e presença de metástase. No entanto, foram observados maiores níveis do marcador em nódulos únicos na cadeia mamária, corroborando com o estudo de Molina et al. (2010) onde níveis elevados do marcador foram observados em pacientes sem envolvimento linfonodal.

Pela curva de Kaplan-Meier, mesmo não sendo observada correlação significativa nos níveis da proteína com a sobrevida do grupo teste, foi verificado que todas as cadelas que

vieram a óbito apresentaram níveis elevados de CA15-3 corroborando a idéia que a evolução clínica da doença está diretamente relacionada a níveis elevados de CA 15-3. Estudo de Velaiutham et al. (2008) encontraram taxa de sobrevivência global de cinco anos em 85% dos pacientes com valores dentro do intervalo de normalidade de CA15-3 em comparação a 38% dos pacientes com valores elevados do marcador. Estudo de Martín et al. (2006) demonstraram elevados níveis séricos do antígeno associado a uma pior evolução clínica da paciente.

O entendimento do funcionamento do genoma humano em indivíduos saudáveis e doentes pode ser melhor compreendida quando comparados à estrutura do genoma de outras espécies. Cães domésticos são um exemplo particularmente bom, sendo considerada uma estrutura populacional incomum que oferece oportunidades únicas na compreensão da genética na base da morfologia, comportamento e doenças suscetíveis (KIRKNESS et al., 2003). As mudanças genéticas e epigenéticas no DNA plasmático tem sido associadas ao pior prognóstico em vários tumores. Há relatos de que cerca de 50% de todos os pacientes com câncer têm aumento do DNA na circulação, assim, níveis de DNA livre circulante podem ser usados como mais uma alternativa no estudo do câncer (...).

O aumento no número de cópias do elemento CAN SINE observado nesse estudo pode caracterizá-lo como um marcador de pior prognóstico. Estudos têm demonstrado elevados níveis de DNA livre circulante no plasma de pacientes com variados tipos de câncer. Yang et al. (2008) indicaram que a integridade de DNA circulante, calculada por valores de *threshold* de 400pb e 100pb de um gene específico por qPCR pode ser um biomarcador molecular para detecção de cânceres ginecológicos e de mama. A partir de um estudo de Umetani et al. (2006) com níveis absolutos de sequências ALU, foram observadas elevações nos níveis das sequências, relacionados a estágios avançados do câncer de mama em humanos. Schaefer et al. (2007) verificaram que cães com neoplasia linfóide apresentam aumento do DNA plasmático, caracterizando-o como um indicador de prognóstico ruim.

Em indivíduos saudáveis, o processo de apoptose é a principal fonte de DNA livre circulante, o qual, através do processo de clivagem enzimática, libera fragmentos de 185 a 200 pares de base (pb) de comprimento. Ao contrário, em células malignas o tamanho dos fragmentos é bastante variável, devido aos diversos processos que levam à morte celular: apoptose, necrose, autofagia ou catástrofe mitótica. Assim, altos níveis de fragmentos longos de DNA podem ser ótimos marcadores para a detecção de DNA tumoral maligno em sangue (UMETANI et al., 2006).

O DNA livre circulante no soro/plasma é um biomarcador promissor do câncer, pois contém DNA liberado a partir da morte celular e tem sido considerado um preditor da

existência e/ou progressão câncer de mama e ginecológico (BRANT et al., 2003). As correlações encontradas entre o aumento no número de cópias das sequências CAN SINEs com os fatores de evolução tumoral caracterizam o DNA livre circulante como potencial marcador prognóstico no câncer de mama.

Através das análises uni e multivariadas com relação ao óbito, foram encontradas associações dos fatores preditivos de avanço e pior prognóstico tumoral juntamente a quantificação do DNA livre circulante. A partir dos nossos achados, o aumento na liberação do DNA e conseqüente aumento no número de cópias das sequências SINEs estão associados à recidiva tumoral, evolução tumoral, presença de metástase e ulceração. Estudo de Umetani et al. (2006) avaliaram a integridade do DNA em câncer colorretal, considerando-o como um biomarcador clinicamente útil na detecção do câncer; mostrando níveis significativamente maiores na malignidade do tumor.

Foi observado ainda que todas as cadelas que vieram a óbito apresentaram aumento no número de cópias do elemento CAN SINE, inferindo na maior liberação do DNA livre circulante associado às modificações celulares malignas que acontecem no câncer, e concluindo que essa estimativa de marcação prognóstica é independente para a sobrevida, podendo ser utilizada no controle do estadiamento do câncer de mama.

Os dados aqui obtidos poderão ser correlacionados a informações clínicas, e permitir, por exemplo, o diagnóstico precoce de metástases linfonodais ou à distância, dados estes, considerados fundamentais para o direcionamento de procedimentos clínicos e terapêuticos, que podem favorecer a sobrevida da paciente.

Conclusões

VI. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

- Altos níveis séricos de IL-8 e baixos níveis de IL-12 em cadelas com neoplasia mamária tiveram relação com parâmetros clínico-patológicos de pior prognóstico e evolução clínica permitindo inferir sua marcação prognóstica não invasiva de acompanhamento. Os resultados corroboram na concordância de que altos níveis de IL-8 e baixos níveis IL-12 tem relação com o prognóstico reservado para a cadela portadora de neoplasia mamaria;
- Altos níveis séricos do CA 15-3, marcador prognostico já estabelecido na rotina clinica das pacientes com câncer de mama, tiveram relação com a rápida evolução tumoral e menor sobrevida das cadelas, inferindo seu possível uso como marcador de pior prognóstico também na espécie canina;
- Altos níveis circulantes das sequências SINEs verificados nas cadelas deste estudo com rápida evolução tumoral e maior risco de óbito corroboram em classificá-lo como marcador de prognóstico ruim para cadelas portadoras de neoplasia mamaria. O desenvolvimento de ensaios clínicos rápidos e de mínima invasão como o índice de DNA circulante em tumores mostraram-se importantes e potenciais marcadores de prognóstico e evolução do câncer, além de ser um método preciso e inovador.

Referências

VII. REFERÊNCIAS

ABREU, E.; KIOFMAN, S. Fatores Prognósticos no câncer de mama feminino. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.48, n.1, p.113-31, 2002.

AGRAWAL, A. K. et al. The Importance of Preoperative Elevated Serum Levels of CEA and CA 15-3 in Patients with Breast Cancer in Predicting its Histological Type. **Folia Histochemica**, v.48, n.1, p.26-29, 2010.

AHMED, O. I. et al. Prognostic value of serum level of interleukin-6 and interleukin-8 in metastatic breast cancer patients. **Egypt Journal Immunology**, v.13, n.2, p.61-8, 2006.

AIROLDI, I.; DI CARLO, E.; COCCO, C. Endogenous IL-12 triggers an antiangiogenic program in melanoma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.104, p.3996–4001, 2007.

AL-AZAWI, D.; KELLY, G.; MYERS, E. CA 15-3 is predictive of response and disease recurrence following treatment in locally advanced breast cancer. **BMC Cancer**, n.6, p.445-448, 2006.

ALMEIDA, J. R. C. et al. Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 305-316, 2007.

ANDRADE, F. H. E. et al. Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. **Diagnostic Pathology**, 2010.

BALESTIERI, F. M. P. *Imunologia*. Ed. Manole, 2006.

BARGINEAR, M. F. et al. Implications of applied research for prognosis and therapy of breast cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.65, n.3, p.223-34, 2008.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v.136, p.215-233, 2009.

BAYLIN, S. B. DNA methylation and gene silencing in cancer. **National Clinical Practice Oncology**, v.2(Suppl 1):S4-S11, 2005.

BELGNAOUI, S. M. et al. Human LINE-1 Retrotransposon Induces DNA Damage and Apoptosis in Cancer Cells. **Cancer Cell International**, v.6, n.13, 2006.

BENOY, I. H. et al. Increased Serum Interleukin-8 in Patients with Early and Metastatic Breast Cancer Correlates with Early Dissemination and Survival. **Clinical Cancer Research**, v.10, p.7157-7162, 2004.

BENTOLILA, S. et al. Analysis of major repetitive DNA sequences in the dog (*Canis familiaris*) genome. **Mammalian Genome**, v.10, p.699–705, 1999.

BIEN, E. et al. Pre-treatment serum levels of interleukin-10, interleukin-12 and their ratio predict response to therapy and probability of event-free and overall survival in childhood soft tissue sarcomas, Hodgkin's lymphomas and acute lymphoblastic leukemias. **Clinical Biochemistry**, v.42, p.1144-1157, 2009.

BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. Junk DNA as Evolutionary Force. **Nature**, n.443, pp.521-524, 2006.

BOBROVNIKOVA-MARJON, E. V. et al. Expression of Angiogenic Factors Vascular Endothelial Growth Factor and Interleukin-8/CXCL8 Is Highly Responsive to Ambient Glutamine Availability. **Cancer Research**, v.64, p.4858-4869, 2004.

BRODEY, R. S.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ROSZEL, J. R. Canine mammary gland neoplasms. **Journal of American Animal Hospital Association**, v.19, p.61-89, 1983.

BUBENIK, J. Cytokine gene-modified vaccines in the therapy of cancer. **Pharmacology Theraphic**, n.69, p.1-14, 1996.

CAPY, P. Structure of Transposable elements. **Dynamics and Evolution of Transposable Elements**, 1998.

CARARETO, C. M. A.; ESTÉCIO, W. R. H.; TAJARA, E. H. Elementos transponíveis e doenças humanas: da instabilidade genômica à carcinogênese. **HB Científica**, vol.8, n.2, 2001.

CASSALI, G. D. et al. Perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of mammary neoplasms in dogs. 34th World Small Animal Veterinary Congress - WSAVA 2009, 2009, São Paulo. **Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress - WSAVA 2009**, 2010.

CATHERINE MULLER. Stromal Adipocytes: a new component of the tumour microenvironment. **American Journal Cancer Research**, 2011.

CHUANG, et al. Electroporation-mediated IL-12 gene therapy in a transplantable canine cancer model. **International Journal Cancer**, n.125, p.698–707, 2009.

CORDEIRO, J. Investigação sobre a presença de retrotransposons em populações naturais do grupo *cardini* do gênero *drosophila* (diptera: drosophilidae) do sul do Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, 2005.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v.19, n.420, p.860-867, 2002.

DE LARCO, J. E. et al. Atypical methylation of the Interleukin-8 Gene Correlates Strongly with the metastatic Potential of Breast Carcinoma. **Cells Cell Biology**, v.24, p.13988-13993, 2003.

DERIN, D. et al. Serum IL-8 and IL-12 levels in breast cancer. **Medical Oncology**, v. 24, n. 2, p. 163-168, 2007.

DUFFY, M. J.; O'DONOVAN, N.; CROWN, J. Use of molecular markers for predicting therapy response in cancer patients. **Cancer Treatment Reviews**, v.37, n.2, p. 151-59, 2010.

GUIMARÃES, R. C. et al. Uso dos Marcadores Tumorais na Prática Clínica. **Serviço de Oncologia do Hospital da Baleia (Fundação Benjamim Guimarães)**, n. 23, ano IV, 2002.

GONZALEZ-ÂNGULO, A. M.; MORAES-VASQUEZ, F.; HORTOBAGYL, G. N. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. **Advanced Experimental Medicine and Biology**, v.608, p.1-22, 2007.

GRALOW, J. et al. Clinical cancer advances 2007: major research advances in cancer treatment, prevention, and screening. A report from the American Society of Clinical Oncology. **Journal Clinical Oncology**, v. 26, n. 2, p. 313-325, 2008.

HAIM, K.; WEITZENFELD, P.; MESHEL, T.; BEN-BARUCH, A. Epidermal Growth Factor and Estrogen Act by Independent Pathways to Additively Promote the Release of the Angiogenic Chemokine CXCL8 by Breast Tumor Cells. **Neoplasia**, v.13, p.230–243 2011.

HAHN, W. C.; WEINBERG, R. A. Rules for making human tumor cells. **National England Journal Medical**, v.347, p.1593-1603, 2002.

HICKS, D. G.; KULKARNI, S. Trastuzumab as adjuvant therapy for early breast cancer. **Archive Pathology Laboratory Medical**, v.132, p.1008-1015, 2008.

IMAGAWA, Y.; SATAKE, K.; KATO, Y.; TAHARA, H.; TSUKUDA, M. Antitumor and antiangiogenic effects of interleukin 12 gene therapy in murine head and neck carcinoma model. **Auris Nasus Larynx**, v.31, p.239–45, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativas 2010: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>>. Acessado em 10 de julho de 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativas sobre a Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil – 2002**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2003. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativas/2003/>>. Acessado em 12 de dezembro de 2010.

KARAYANNOPOULOU, M. et al. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. **Journal Comparative Pathology**, n.133, p. 246-252, 2005.

KAREN, S. ET AL. Plasma Proteome Profiles Associated with Inflammation, Angiogenesis, and Cancer Proteomics of Systemic Inflammatory Response. **PlosOne**, v.6, 2011.

KIM, H. S. et al. Clinical significance of a serum CA15-3 surge and the usefulness of CA15-3 kinetics in monitoring chemotherapy response in patients with metastatic breast cancer. **Breast Cancer Research Treatment**, DOI 10.1007/s10549-09-0377-2 – 2009

KIRKNESS, E. F. et al. The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. **Science**, v.301, n.5641, p.1898-1903, 2003 - DOI: 10.1126/science.1086432

KOZLOWSKI, L. et al. Concentration of interleukin-6 (Il-6), interleukin-8 (Il-8) and interleukin-10 (Il-10) in blood serum of breast cancer patients. **Annales Academiae Medicae Bialostocensis**, v.48, 2003.

LEE, H. L. et al. Serum and urine levels of interleukin-8 in patients with non-Hodgkin's lymphoma. **Cytokine**, v.43, n.1, p.71-5, .2008.

MacEWEN, E. G. Spontaneous tumors in dogs and cats: Models for the study of cancer biology and treatment. **Cancer and Metastases Review**, v.9, n.1, p.125-136, 1990.

MAKALOWSKI, W. Genomic scrap yard: how genomes utilize all that junk. **Gene**, v.259, p. 61–67, 2000.

MARCHESI, M. C. et al. Cancer antigen 15/3: possible diagnostic use in veterinary clinical oncology. Preliminary study. **Veterinary Research Communications**, v.34, n.1, 103-6, 2010.

MARIC, M. C. et al. Tumor markers in breast cancer--evaluation of their clinical usefulness. **Coll Antropol.**, v.35, n.1, p.241-7, 2011.

MARTIN, A. et al. Prognostic Value of Pre-operative Serum CA 15.3 Levels in Breast Cancer. **Anticancer Research**, v.26, p.3965-3972, 2006.

MAURYA, P. et al. Proteomic approaches for serum biomarker discovery in cancer. **Anticancer Research**, v.27, p.1247-1255, 2007.

MISDORP, W. et al. Definitions and explanatory notes. Who Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat. Washington: **Armed Forces Institute of Pathology**, p.18-27, 1999.

MOLINA, R. et al. Prospective Evaluation of Carcinoembryonic Antigen (CEA) and Carbohydrate Antigen 15.3 (CA 15.3) in Patients with Primary Locoregional Breast Cancer. **Clinical Chemistry**, v.56, n.7, p.1148–1157, 2010.

MOTTOLLESE, M. et al. Spontaneous Canine Mammary Tumors – A Model for Monoclonal Antibody Diagnosis and Treatment of Human Breast Cancer. **Laboratory Investigation**, v.71, n.2, p. 182, 1994.

NAGASHIMA, N. et al. Prognostic Significance of the Local Expression of Interleukin-12 in Patients with Advanced Gastric Cancer. **Anticancer Research**, n.28, p.1277-1284, 2008.

NICOLINI, A.; CARPI, A.; ROSSI, G. Cytokine & Growth Factor Reviews. **Cytokines in breast cancer**, v.17, p.325–337, 2006.

OWEN, L. N. TNM Classification of tumors of domestic animals, **1st ed. WHO**, Geneva, 1980.

PEDERSEN, L. et al. The prognostic influence of multifocality in breast cancer patients. **Breast**, v.13, p.188-93, 2004.

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

PEREZ, A. M. D. M. et al. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumors. **Journal Small Animal Practice**, v.41, p.476, 2000.

PHILLIPS, J. C.; LEMBCKE, L.; CHAMBERLIN, T. A novel locus for canine osteosarcoma (OSA1) maps to CFA34, the canine orthologue of human 3q26. **Genomics**, 2010.

PIERCE, B. L. et al. Elevated biomarkers of inflammation are associated with reduced survival among breast cancer patients. **Journal Clinical Oncology**, v.27, p.3437-3444, 2009.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos fatores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 97, n. 543, p.119-127, 2002.

RAKHA, E.A. et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Res.**, v. 12, n. 4, p. 1-12, 2010.

RICHMOND, A.; THOMAS, H. Purification of melanoma growth stimulatory activity. **Journal Cell Physiology**, v.129, p.375-384, 1986.

SABEL, M. S. et al. Intratumoral delivery of encapsulated IL-12, IL-18 and TNF-alpha in a model of metastatic breast cancer. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 122, n. 2, p. 325-336, 2010.

SAMY, N. et al. Prognostic significance of serum Her2/neu, BCL2, CA15-3 and CEA in breast cancer patients: a short follow-up. **Cancer Biomark**, v.6, n. 2, p.63-72, 2010.

SAKAO, Y.; MIYAMOTO, H.; YAMAZAKI, A. Prognostic significance of metastasis to the highest mediastinal lymph node in non-small cell lung cancer. **Ann Thorac Cardiovasc, Surg.**, v.81, n.3, p.292-8, 2006.

SCHAACK, S.; GILBERT, C.; FESCHOTTE, C. Promiscuous DNA: horizontal transfer of transposable elements and why it matters for eukaryotic evolution. **Trends in Ecology and Evolution**, vol.25, p.537–546, 2010.

SCHAEFER, D. M. W. et al. Quantification of plasma DNA as a prognostic indicator in canine lymphoid neoplasia. **Veterinary Comparative Oncology.**, v.5, n.3, p.145-55, 2007.

SCHNEIDER, R. Comparison of age, sex and incidence rates in human and canine breast cancer. **Cancer**, v.26, n.2, p.419-426, 1970.

SLATER, D. Oncology in Reproductive System. In: **Manual of Small Animal Surgery**, p.2439-2442, 2007.

SNOUSSI, K. et al. Genetic Variation in IL-8 Associated with Increased Risk and Poor Prognosis of Breast Cancer. **Human Immunology**, v.67, p.13-21, 2006.

SNOUSSI, K. et al. Combined effects of *IL-8* and *CXCR2* gene polymorphisms on breast cancer susceptibility and Aggressiveness. **BMC Cancer**, v.10, n.283, 2010.

SORENMO, K. An Update on canine mammary gland tumors. **Proceedings of the16th Acvim Forum**, p.387-8, 1998.

SOUZA, J. V. Marcadores mucinosos associados a câncer. **Revista AMRIGS**, v. 46, n.1,2, p. 70-83, 2002.

STEDING, C. E. et al. The role of interleukin-12 on modulating myeloid-derived suppressor cells, increasing overall survival and reducing metastasis. **Immunology**, v.133, n.2, p.221-38, 2011.

STROUN, M. et al. *Alu* repeat sequences are present in increased proportions compared to a unique gene in plasma/serum DNA. **Circulating nucleic acids in plasma or serum**, v.945, p.258–264, 2001.

TAMPELLINI, M. et al. Relationship between CA 15-3 serum levels and disease extent in predicting overall survival of breast cancer patients with newly diagnosed metastatic disease. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 4, n. 1, p. 21-23, 2001.

THOMAS, E.; BERNER, G. Prognostic and Predictive Implications of HER2 Status for Breast Cancer Patients. **European Journal of Oncology Nursing**, v.4, p.10-17, 2000.

UMETANI, N. et al. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. **Journal of Clinical Oncology**, v.24, n.26, p.4270-4276, 2006.

VANDERCAPPELLEN, J.; VAN DAMME, J.; STRUYF, S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. **Cancer Lett**, v.267, p.226-244, 2008.

VAN'T VEER, L. J.; PAIK, S.; HAYES, D. F. Gene expression profiling of breast cancer: a new tumor marker. **Journal Clinical Oncology**, v.23, n.8, p.1631-5, 2005.

VASSETSKY, N.S., KRAMEROV, D.A. CAN-a pan-carnivore SINE family. **Mammalian Genome**. v.13,p.50-57, 2002.

VELAIUTHAM, S. et al. Does the pre-operative value of serum CA 15-3 correlate with survival in breast cancer?. **Research Communications**, 2008.

VICARI A.P., CAUX C. Chemokines in cancer. **Cytokine Growth Factor Review**, v.13, p.143–154, 2002.

XIE, K. Interleukin-8 and human cancer biology. **Cytokine Growth Factor Rev**, v.12, p.375-91, 2001.

YANG, Y. et al. Integrative genomic data mining for discovery of potential blood-borne biomarkers for early diagnosis of cancer. **Journal Plos One**, v.3, n.11, 2008.

YAO, M. et al. Activation of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) is critical in IL-8-induced angiogenesis. **Journal of Leukocyte Biology**, v.80, 2006.

YEON, J. et al. Evaluation of dietary factors in relation to the biomarkers of oxidative stress and inflammation in breast cancer risk. **Nutrition**, [doi:10.1016/j.nut.2010.10.012](https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.10.012), 2011.

YONG, T. et al. . Effect of Interleukin 21 and/or Interleukin 12 on the Antitumor activity of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients with Endometrial Cancer. **Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao**, v.33, n.3, p.292-8, 2011.

YOSHIDA, A.; KOIDE, Y.; UCHIJIMA, M.; YOSHIDA, T. O. IFN- γ induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.198, p.857– 61, 1998.

WAUGH, D. J. J.; WILSON, C. The interleukin-8 pathway in cancer. **Clinical Cancer Research**, v.14, p.6735-6741, 2008.

WESCHE-SOLDATO, D. E.; SWAN, R. Z.; CHUNG, C.S. The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis. **Current Drug Targets**, v.8, p.493–500, 2007.

WESSLER, S. R. Eukaryotic Transposable Elements: Teaching Old Genomes New Tricks. **The Implicit Genome**, p.138-165, 2006.

ZHANG, T.; FANG, H. H. P. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. **Appl Microbiology Biotechnology**, v.70, p.281-289, 2006.

ZHOUS, S. et al. Eukaryotic Initiation Factor 4E (eIF4E) and angiogenesis: prognostic markers for breast cancer. **BMC Cancer**, v.6, p.1471-2407, 2006.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, v.12, n.2, p.121-7, 2000.

ZLOTNIK, A. Chemokines in Neoplastic Progression. **Semin Cancer Biological**, v.14, n.3, p.181-5, 2004.

ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 38, n. 1, p. 38-41, 2001.

ZUCCARI, D. A. P. C. et al. Immunohistochemical evaluation of e-cadherin, Ki-67 and PCNA in canine mammary neoplasias: Correlation of prognostic factors and clinical outcome. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 207-215, 2008.

ZUCCARI, D. A. P. C. et al. Interleukin-8 Expression Associated with Canine Mammary Tumors. **Genetics and Molecular Research**, v.10, n.3, p.1522-1532, 2011.

I. Apêndice

APÊNDICE A - Protocolos de preparo das soluções

¹ PBS 1x (pH 7,2 – 7,4)

Cloreto de Sódio -----	8,02g
Cloreto de Potássio -----	0,201g
Fosfato dissódico -----	1,15g
Fosfato de potássio -----	0,21g
Água destilada (pH 7,2 – 7,4) -----	1 litro

² Reagente Diluente (BSA + Tween 20) 1%

PBS -----	70 mL
BSA -----	0,7g

³ Solução cromógeno

TMB -----	5,5mL
H ₂ O ₂ -----	5,5mL

⁴ Solução de parada

H ₂ SO ₄ -----	19,6mL
Água destilada -----	80,4mL

⁵ Solução de lavagem (0.05% Tween 20 em PBS)

Tween 20 ----- 500µL

PBS ----- 1 litro

⁶ Solução de lavagem (Tris-HCl + Tween 20)

Solução de lavagem (Tris-HCl + Tween 20) ----- 50mL

Água destilada ----- 1200mL

⁷ Solução trabalho (Tracer HRP + Biotina Anti-CA15-3)

Tracer HRP ----- 600µL

Diluyente biotina ----- 12mL

⁸ Reação de Big Dye - Sequenciamento

2µL de DNA

2µL de Big Dye

1µL de Tampão

4µL de H₂O

1µL de primer (M13)

I. Anexos

ANEXO A - Modelo do Termo de Consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com os princípios éticos estabelecidos na Lei nº 11.794/2008 e na resolução nº 714/2002)

Título da Pesquisa: “Detecção de potenciais marcadores prognósticos e preditivos em neoplasia mamária de cadelas”

→ “Avaliação do CA 15-3, IL-8, IL-12 e DNA livre circulante como marcadores prognósticos no soro sanguíneo de cadelas com neoplasia mamária”

→ “Avaliação da glutatona e de suas enzimas, e do estresse oxidativo, como marcadores prognósticos e preditivos de neoplasia mamária em cadelas”

Pesquisadores Responsáveis: Profª. Dra. Debora A. P. C. Zuccari – Coordenadora / Gabriela Bottaro Gelaleti – Mestranda / Camila Leonel da Silva – Treinamento Técnico.

Para obter maior conhecimento dos mecanismos envolvidos no câncer de mama em cadelas, os pesquisadores estão desenvolvendo uma pesquisa científica que poderá melhorar o nosso conhecimento sobre esse tumor e, portanto oferecer novas possibilidades de tratamento e de melhora na qualidade de vida dos nossos animais de estimação.

- A. O estudo tem como objetivo avaliar o papel das proteínas CA 15-3, IL-8 e IL-12 e do DNA livre circulante em cadelas em diferentes momentos, além de avaliar o papel da proteína glutatona e suas enzimas relacionadas; a fim de verificar a relação entre os valores e utilizá-los como marcadores de crescimento tumoral e no surgimento de metástases.
- B. Será coletada uma amostra sanguínea do animal (3 mL) no momento da cirurgia e posteriores coletas serão feitas: um mês após a cirurgia, seis meses após a cirurgia e 18 meses após a cirurgia.
- C. Após a cirurgia para retirada do tumor será cortado parte deste material, um pedacinho que será enviado ao laboratório para diagnóstico histopatológico. Não haverá mudança na técnica cirúrgica para esta coleta.

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador sobre a utilização para estudo de amostra sanguínea e um fragmento da lesão tumoral (pedacinho de 1 cm do tumor) a ser retirado durante o procedimento cirúrgico, já estipulado no tratamento, consinto em participar livre e espontaneamente deste estudo e me comprometo a manter contato com o grupo para as 3 coletas subseqüentes em 1 mês, 6 meses e 18 meses após a cirurgia.

Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão. E comprometo-me a conceder a coleta de amostras sanguíneas da minha cadela durante os quatro períodos da pesquisa e ainda, comprometo-me a manter o pesquisador informado no caso de mudança de endereço ou telefone.

Nome do(a) proprietário(a):

Nome da cadela:

Idade da cadela:

Data em que o tumor foi observado pelo proprietário:

Data em que o animal foi levado para consulta:

Data do diagnóstico do tumor pelo profissional:

Início do tratamento:

Endereço residencial:

nº

Bairro:

Telefone residencial:

Celular:

Data:...../...../...../ **Assinatura:**.....

Declaração de responsabilidade: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me a disposição para perguntas e respondi a todas. Obtive o consentimento de maneira livre e me coloquei à disposição para esclarecimento de qualquer dúvida sobre o estudo pelos endereços abaixo indicados.

Nome do(a) pesquisador:

Data:...../...../...../ **Assinatura:**.....

Inscrição no Conselho Regional:

Profa. Dra. Debora A.P.C. Zuccari – Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular – UPGEM.

Av. Brigadeiro Faria Lima, nº 5416 – FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
São José do Rio Preto, SP - CEP 15090-000

Fone: (17) 3201-5885

e-mail: debora.zuccari@famerp.br

ANEXO B - Modelo da Ficha Clínica do animal

FICHA CLÍNICA n° _____

RGHospital: _____
Data de atendimento: _____
Proprietário: _____
Telefone: _____
Residente responsável: _____

Raça: _____ Idade: _____ Peso: _____

Sexo: F () M ()

Tecido ou órgão afetado: _____

História clínica: recidiva? ()

tempo de evolução: 1 mês () até 6 meses () mais de 6 meses ()
metástase? ()

Localização: _____

Dimensões do tumor (T):- x x (cm)

T0 - ausência do tumor primário evidente ou ausência de recidiva
T1 - < 3cm
T2 - entre 3 e 5 cm
T3 - >5cm

Envolvimento de linfonodos regionais: _____

N0 - sem envolvimento evidente

N1 - envolvimento unilateral

N2 - envolvimento bilateral

N1a - móveis

N2a - móveis

N1b - fixos

N2b - fixos

Quanto à confirmação histológica de envolvimento de linfonodos: (-) ou (+)

Metástase à distância: _____

M0 - sem metástases evidentes

M1 - metástases à distância incluindo linfonodos não regionais

Mx - impossível avaliar existência de metástases

Características do tumor:

forma: arredondada () lobulada () cística ()

hemorragia: ulceração () necrose () odor ()

secreção: tipo: _____

coloração: _____
sésil () pedunculado () encapsulado ()

consistência: dura () mole ()

caráter infiltrativo: sim () não ()

superfície externa: lisa () granular () brilhante () nodular ()

irrigação: escassa () abundante () moderada ()

ANEXO C - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Comissão de Ética na Experimentação Animal - CEEA

FAMERP Autarquia Estadual Av. Brig. Faria Lima 5416 CEP 15090-000 Tel. 3201-5700 S.J. Rio Preto/ SP

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação do CA 15-3, IL-8, IL-12 e DNA livre circulante como marcadores prognósticos no soro sanguíneo de cadelas com neoplasia mamária" (Protocolo FAMERP nº3945/2009), sob responsabilidade da Profa. Dra. Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari, está de acordo com os princípios éticos estabelecidos na Lei nº 11.794/2008 e na Resolução nº 714/2002 e foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (CEEA-FAMERP).

Lembramos ao senhor pesquisador a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

We certify that Project entitled "Evaluation of CA 15-3, IL-8, IL-12 and free circulating DNA as prognostic markers in blood serum of female dogs with mammary neoplasia" (Protocol nº 3945/2009), agrees with the Ethical Principles for Animal Research established by Brazilian law nº11.794/2008 and Resolution nº 714/2002 and was approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Research of Faculty of Medicine from São José do Rio Preto (CEEA – FAMERP) on July 01, 2009.

São José do Rio Preto, 03 de julho de 2009.

Prof. Dra. Cristiane Damas Gil
Presidente Da CEEA – FAMERP