

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

CLASSIFICAÇÃO FENOTÍPICA PROGNÓSTICA PARA
NEOPLASMAS MAMÁRIOS EM CADELAS

Giovanna Rossi Varallo
Médica Veterinária

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

**CLASSIFICAÇÃO FENOTÍPICA PROGNÓSTICA PARA
NEOPLASMAS MAMÁRIOS EM CADELAS**

Giovanna Rossi Varallo

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Debora Aparecida Pires de Campos
Zuccari**

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

2016

V287c Varallo, Giovanna Rossi
Classificação fenotípica prognóstica para neoplasmas mamários
em cadelas / Giovanna Rossi Varallo. -- Jaboticabal, 2016
xxi, 101 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientadora: Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari
Banca examinadora: Doroteia Rossi da Silva Souza, Mirela
Tinucci Costa, Andriago Barboza De Nardi, Rodrigo Castro
Bibliografia

1. Cadelas. 2. Expressão Gênica. 3. Imuno-histoquímica 4.
Neoplasias de mama. 5. Prognóstico I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:617:636.7

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CLASSIFICAÇÃO FENOTÍPICA PROGNÓSTICA
PARA NEOPLASMAS MAMÁRIOS EM CADELAS

AUTORA: GIOVANNA ROSSI VARALLO

ORIENTADORA: DÉBORA APARECIDA PIRES DE CAMPOS ZUCCARI

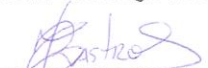
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIRURGIA
VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. DÉBORA APARECIDA PIRES DE CAMPOS ZUCCARI
Departamento de Biologia Molecular / FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP


Prof. Dr. ANDRÍEGO BARBOZA DE NARDI
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. MÍRELA TINUCCI COSTA
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. DOROTÉIA ROSSI SILVA SOUZA
Departamento de Biologia Molecular / FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP


Prof. Dr. RODRIGO CASTRO
UNILAGO - São José do Rio Preto, SP

Jaboticabal, 16 de novembro de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GIOVANNA ROSSI VARALLO - nascida em 03 de novembro de 1983, na cidade de Monte Alto, estado de São Paulo, filha de Erivaldo José Varallo e Alzira Maria Rossi Varallo, graduou-se em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal em dezembro de 2007. Foi admitida no Programa de Aprimoramento Profissional (PAP) em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais do Centro Universitário de São José do Rio Preto em fevereiro de 2009. Ingressou no Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária em março de 2011, área de concentração Oncologia Veterinária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Professor Doutor Carlos Roberto Daleck. Obteve o título de mestre em fevereiro de 2013, com a dissertação intitulada: Diagnóstico comparativo entre a histopatologia e citologia por capilaridade com agulha de insulina nas neoplasias mamárias caninas. Durante o período do mestrado foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do referido programa. Ingressou no Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, curso Doutorado, área de concentração em Oncologia Veterinária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal em março de 2013, sob orientação do Professor Doutor Andriago Barboza De Nardi. Após um ano, passou a ser orientada pela Professora Doutora Debora Aparecida Pires de Campus Zuccari. Em 2015 atuou como docente responsável pelas disciplinas de “Anatomia de Animais Domésticos” e “Anestesiologia e Técnicas Cirúrgicas” do Centro Universitário do Norte Paulista (UNORP), São José do Rio Preto, funções que se perduram até os dias atuais.

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano. Mas o que seria o oceano se não infinitas gotas?”

Isaac Newton

Aos meus pais e a minha avó pelo incentivo,apoio,
colo e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelas graças concedidas e por nunca ter me abandonado nos momentos difíceis, sempre me concedendo força, coragem e fé para seguir em frente com respeito e dignidade.

À professora e amiga Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari pelas oportunidades oferecidas, as quais foram muitas. Sobretudo pelo carinho, paciência, confiança, sinceridade e apoio durante essa jornada. Obrigada por estar ao meu lado e por ter segurado a minha mão nos momentos de alegria e de desespero.

Ao professor e amigo Andrigo Barboza de Nardi pela disponibilidade, confiança, amizade e humildade em aceitar ser meu orientador no primeiro ano de doutorado e, assim, permitir meu ingresso no programa de pós-graduação da FCAV- Unesp Jaboticabal. Também quero agradecer pelas oportunidades e ensinamentos que me foram concedidos.

Ao professor Daleck pela amizade, companheirismo, parceria, orientação, ensinamentos e contribuições para a minha formação pessoal e profissional. Além disso, por ter intermediado os contatos iniciais entre mim e a professora Debora.

Aos grandes amigos do LIMC: Thaíz F. Borin, Bruna V. Jardim-Perassi, Marina G. Moschetta, Lívia C. Ferreira, Camila Leonel, Larissa B. Maschio, Gustavo R. Martins, Naiane N. Gonçalves, Juliana R. Lopes, Jucimara Colombo, Tialfi Castro, Nathália Sonehara, Rubens P. Junior, Jéssica Z. Lacerda, Alexandra P. Fantinatti e André L. Mota, pela amizade e companheirismo todos os dias. Agradeço por muitos se tornarem amigos para a vida toda e por estarem sempre presentes nos momentos profissionais e pessoais durante todos esses anos. Meu carinho por vocês é eterno.

Aos amigos da velha guarda do SOV: Giovanni Vargas Hernández, Livia Souza Semolin, Rosana da Cruz Lino Salvador, Talita Mariana Morata Raposo Ferreira e Marília Gabriele Prado Albuquerque Ferreira pela amizade e companheirismo.

À banca examinadora do exame geral de qualificação, Profa. Dra. Rosemeire de Oliveira Vasconceles, Prof. Dr. Andriago Barboza de Nardi, Prof. Dr. Carlos Roberto Daleck e Prof. Dr. Áureo Evangelista Santana pelas sugestões que permitiram melhorar meu trabalho.

Aos Professores: Profa. Dra. Doroteia Rossi da Silva Souza, Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa, Prof. Dr. Andriago Barboza de Nardi e Prof. Rodrigo Castro por aceitarem fazer parte da banca de defesa.

À FAPESP (Proc. 12/14079-5) e à FAPERP (Proc. 208/2014) pelo auxílio financeiro indispensável para a realização desse projeto.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo (Proc. 140624/2013-9) no país.

À FCAV/ UNESP, à FAMERP, à USP (Hemocentro de Ribeirão preto) e ao AC Camargo Cancer Center pela infraestrutura e profissionais (Prof. Dr. Andriago, Barboza de Nardi, Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa, Prof. Dr. Rafael Malagoli Rocha, Prof. Wilson Araújo Silva Junior, Dra. Kamila Peronni, MsC. Marina França Resende e Carlos Ferreira Nascimento) que possibilitaram a realização do projeto.

Ao VETPAT por disponibilizar alguns blocos parafinados com amostras de neoplasmas mamários em cadelas para esse estudo.

Aos meus pais, Erivaldo e Alzira, por sonharem meus sonhos e torna-los realidade. Sei que para isso muitas coisas foram prorrogadas, abdicadas e até mesmo esquecidas. Espero, um dia, conseguir retribuir tudo o que fizeram por mim. Amor eterno e sempre juntos.

À minha irmã, Fabiana Rossi Varallo, pelos incentivos, conselhos, companheirismo, apoio e o amor oferecido durante toda a minha existência. Obrigada por vibrar com minhas conquistas e por chorar e me consolar nas minhas derrotas.

Ao Alexandre Agreli de Melo, meu noivo e amigo, pela paciência, carinho, amor, apoio, parceria e cumplicidade. Obrigada por estar ao meu lado sempre, mesmo quando não compartilhávamos da mesma opinião.

À minha avó Shirley Ciquini Rossi (*in memoriam*) pelo exemplo de mulher e pessoa, pelo amor à família, pela generosidade, por ter me ensinado o desapego, a humildade e o verdadeiro caráter. Espero ter aprendido direito. Saudades eternas.

Às pacientes que participaram do estudo. E que, por meio delas, consigamos melhorar a oncologia veterinária brasileira.

Aos meus anjos presentes e ausentes de quatro patas, Pitoco, Yuri, Ico, Porvinha, Neguitinha, Cidinha e Bruninha por sempre despertarem os melhores sentimentos em mim.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
LISTA DE TABELAS.....	xix
LISTA DE FIGURAS.....	xx
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 A Glândula Mamária.....	3
2.2 O Câncer de Mama em Cadelas.....	5
2.2.1 Definição.....	5
2.2.2 Epidemiologia.....	5
2.2.3 Etiopatogenia.....	6
A Fatores de Risco.....	6
B Transição Epitélio-Mesenquimal, Progressão Tumoral e Metástase.....	7
C Células-Tronco Tumorais.....	11
2.2.4 Potenciais Marcadores para o Câncer de Mama em Cadelas.....	13
2.2.4.1 Receptores Hormonais.....	14
A Receptor de Estrógeno.....	15
B Receptor de Progesterona.....	15
2.2.4.2 Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2.....	16
2.2.4.3 Moléculas de Adesão Celular e Junções Celulares.....	17
A Junções Aderentes ou de Ancoragem: E-caderina	17
B Junções Ocludentes: Claudinas.....	19
2.2.5 Diagnóstico.....	22
2.2.5.1 Classificação Histopatológica.....	23
2.2.5.2 Classificação Fenotípica.....	26
2.2.6 Estadiamento.....	29
2.2.7 Tratamento.....	30
2.2.8 Prognóstico.....	31

OBJETIVOS.....	33
3.1 Geral.....	33
3.2 Específicos.....	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Considerações éticas.....	33
4.2 Etapa 1.....	35
4.2.1 Grupo Experimental 1.....	35
4.2.2 .Tissue Microarray.....	36
4.2.3 Imuno-histoquímica.....	37
4.2.4 Análise e Interpretação da Imuno-histoquímica.....	38
4.2.5 Análise estatística.....	39
4.3 Etapa 2.....	40
4.3.1 Grupo Experimental 2.....	40
4.3.2 Extração avaliação da integridade do RNA amostral.....	40
4.3.3 Microarranjo.....	41
4.3.4 Técnica de PCR quantitativa.....	42
4.3.5 Análise estatística do microarranjo.....	43
4.3.6 Análises de Enriquecimento do microarranjo.....	43
4.3.7 Análise do gene HYAL-1 por PCR para validação.....	43
RESULTADOS.....	44
5.1 Parte 1.....	44
5.1.1 Características Clínicas, Patológicas e Moleculares.....	44
5.1.2 Determinação dos prognósticos dos fenótipos.....	47
5.1.2.1 Relação dos fenótipos com as características clínico-patológicas.....	47
5.1.2.2 Fenótipos e sobrevida.....	48
5.1.2.3 Expressão da E-caderina nas neoplasias mamárias de cadelas.....	50
5.1.2.4 Expressão das claudinas 1, 3, 4 e 7 nas neoplasias mamárias de cadelas.....	53
5.1.3 Células-tronco tumorais (CD44+/CD24-).....	55
5.2 Etapa 2.....	57
5.2.1 Características Clínicas, Patológicas e Moleculares.....	57

5.2.2	Expressão gênica global das neoplasias mamárias de cadelas.....	57
5.2.3	Enriquecimento do Microarranjo.....	59
5.2.3.1	Genes Regulados Positivamente.....	59
A	Função Molecular dos Genes.....	59
B	Função Biológica dos Genes.....	60
C	Vias Metabólicas.....	61
5.2.3.2	Genes Regulados Negativamente.....	61
A	Função Molecular dos Genes.....	61
B	Função Biológica dos Genes.....	62
C	Vias Metabólicas.....	63
5.2.4	Novo marcador para o câncer de mama de cadelas.....	63
5.2.4.1	Validação do HYAL-1.....	63
	DISCUSSÃO.....	66
	CONCLUSÕES.....	77
	REFERÊNCIAS.....	78
	APÊNDICE.....	90

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária de São José do Rio Preto (Protocolo: 3231/2012).



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Comissão de Ética na Experimentação Animal - CEEA

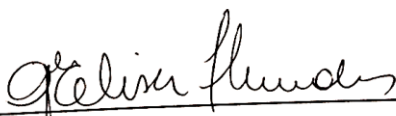
FAMERP Autarquia Estadual, Av. Brig. Faria Lima 5416 CEP 15090.000 Tel. 3201-5700 S.J.Rio Preto/

DELIBERAÇÃO CEEA Nº 010/2012

A Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – CEEA/FAMERP, em reunião nesta data, analisou o projeto de pesquisa intitulado “**Reclassificação prognóstica das neoplasias mamárias em cadelas por marcadores imunohistoquímicos**” (Protocolo FAMERP nº 3231/2012), sob responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari, e deliberou que de acordo com os princípios éticos estabelecidos na Lei nº 11.794/2008 e na Resolução nº 714/2002 o mesmo foi **aprovado**.

Atenção: **Até 30 dias após a finalização do projeto**, o pesquisador deverá preencher o Formulário do Relatório Final disponível no site e enviar ao CEEA. O descumprimento desta obrigação poderá prejudicar o andamento de futuras solicitações.

São José do Rio Preto, 16 de agosto de 2012.



Prof. Dra. Gloria Elisa Florido Mendes
Vice-Presidente da CEEA
FAMERP

CLASSIFICAÇÃO FENOTÍPICA PROGNÓSTICA PARA NEOPLASMAS MAMÁRIOS DE CADELAS

RESUMO - O câncer de mama é uma doença heterogênea. Em mulheres está estabelecido um perfil imuno-histoquímico para utilização na rotina clínica de pacientes com câncer de mama. Os fenótipos luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e triplo negativo apresentam diferenças prognósticas e preditivas. Entretanto, para a neoplasmas mamários em cadelas, não há uma classificação fenotípica definida. As diferenças prognósticas entre os fenótipos são atribuídas às assinaturas do tumor. Os estudos gênicos possibilitam averiguar o perfil genético da doença e a identificação de novos marcadores moleculares. O objetivo do estudo foi propor uma classificação fenotípica para a determinação de quatro fenótipos: luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e triplo negativo, bem como avaliar a imunoexpressão dos marcadores anti-E-caderina, anti-claudinas 1, 3, 4, 7 e do anti-CD24 e anti-CD44. Na segunda etapa do estudo, objetivou-se avaliar o perfil de expressão gênica global dos carcinomas de mama e a diferença de expressão gênica entre os grupos fenotípicos. Para a avaliação imuno-histoquímica, o grupo experimental foi composto por 110 amostras de câncer de mama dispostas em lâminas de *tissue microarray*. Obteve-se 42 tumores luminal A, 41 luminal B, 17 triplo negativo e 10 HER2 superexpresso. Constatou-se que estes últimos apresentam fenótipos mais agressivos e com menores sobrevidas. A expressão positiva da E-caderina foi mais acentuada nos grupos luminal A e luminal B, já a negativa no triplo negativo e no HER2 superexpresso. O padrão das expressões das claudinas 1, 3, 4 e 7 foi semelhante entre os subfenótipos. As células-tronco tumorais foram relacionadas aos graus histológicos mais agressivos (II e III). Para a avaliação da expressão gênica foram usadas 12 amostras de carcinoma mamário de cadelas e quatro mamas normais. Não foi evidenciada diferença na expressão gênica entre os grupos luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e triplo negativo pelo microarranjo. O perfil genético global das neoplasias estudadas mostrou 878 genes superexpressos e 821 genes subexpressos. A análise de enriquecimento aplicada aos genes superexpressos apontou o gene HYAL-1 como um potencial marcador diagnóstico e de recidiva. O PCR confirmou esse resultado. Conclui-se que a classificação molecular é uma ferramenta importante para a avaliação prognóstica dos pacientes com neoplasmas mamários. O gene HYAL-1 diferencialmente expresso participa da via de sinalização metabólica relacionada à carcinogênese mamária e a superexpressão está relacionada com o desenvolvimento do câncer e à recidiva.

Palavras-chave: cadelas, classificação, expressão gênica, HYAL-1, neoplasias da mama, prognóstico.

PROGNOSTIC PHENOTYPIC CLASSIFICATION FOR MAMMARY TUMORS IN BITCHES

ABSTRACT - The mammary cancer is a heterogeneous disease. In women, an immunohistochemical profile is established for use in the clinical routine of patients with breast cancer. The luminal A, luminal B, HER2 overexpressed and triple negative phenotypes present prognostic and predictive differences. However for mammary neoplasms in bitches, there is no definite phenotypic classification. Prognostic differences between phenotypes are attributed to tumor signatures. Genetic studies make it possible to ascertain the genetic profile of the disease and the identification of new molecular markers. The objective of the study was to propose a phenotypic classification for the determination of four phenotypes in bitches: luminal A, luminal B, HER2 overexpressed and triple negative, as well as to evaluate the immunoexpression of the anti-E-cadherin, anti-claudin markers 1, 3, 4, 7 and anti-CD24 and anti-CD44. In the second stage of the study, the objective was to evaluate the overall gene expression profile of mammary carcinomas and the difference in gene expression between the phenotypic groups. For the immunohistochemical evaluation, the experimental group consisted of 110 mammary cancer samples arranged in tissue microarray slides. 42 luminal A, 41 luminal B, 17 triple negative and 10 HER2 superexpressed tumors were obtained. It was verified that the latter present more aggressive phenotypes and with lower survival rates. Positive expression of E-cadherin was more pronounced in the luminal A and luminal B groups, whereas the negative expression in triple negative and HER2 overexpressed. The standard expression of claudins 1, 3, 4 and 7 was similar among subphenotypes. Tumor stem cells were related to the most aggressive histological grades (II and III). For the evaluation of gene expression, 12 samples of mammary carcinoma of bitches and four normal breasts were used. There was no difference in gene expression between the luminal A, luminal B, HER2 superexpressed and triple negative groups by the microarray. The overall gene profile of the neoplasms studied showed 878 overexpressed genes and 821 underexpressed genes. The enrichment analysis applied to the overexpressed genes pointed to the HYAL-1 gene as a potential diagnostic and relapse marker. PCR confirmed this result. It is concluded that molecular classification is an important tool for the prognostic evaluation of patients with breast neoplasms. The differentially expressed HYAL-1 gene participates in the metabolic signaling pathway related to mammary carcinogenesis and overexpression is related to the development of cancer and relapse.

Keywords: dogs, classification, gene expression, mammary cancer, prognosis, HYAL-1.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac: anticorpo

CAM: molécula de adesão celular

CTT: células-tronco tumorais

CK: citoqueratina

EMT: transição epitélio-mesenquimal

FCAV: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

FC: do inglês: *fold change*

GH: do inglês: *growth hormone* (hormônio do crescimento).

HER2: receptor de fator de crescimento epidérmico humano-2

IGF-1: do inglês *insulin growth factor 1* (fator de crescimento insulina 1)

IHC: imuno-histoquímica

JC: junção celular

LIMC: laboratório de investigação molecular do câncer

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno

MEC: matriz extracelular

mL: mililitros

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCR: do inglês: *polymerase chain reaction*

PPAR: receptores ativados por proliferador de peroxissoma

RE: receptor de estrógeno

RNA: do inglês: *ribonucleic acid*

RP: receptor de progesterona

RPE: washing of membrane-bound RNA buffer

RIN: número de integridade

RTL: lysis buffer

RW1: washing of membrane-bound RNA buffer

TNM: do inglês: *tumor, node, metastasis*

TMA: do inglês: *tissue microarray*

UNESP: Universidade Estadual Paulista

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Distribuição de função das claudinas 1, 3, 4 e 7 nos tecidos.....	21
Tabela 2. Classificações histopatológicas publicadas para o diagnóstico de neoplasias mamárias em cadelas.....	23
Tabela 3. Classificação internacional histopatológica para neoplasmas mamários de cadelas – classificação da OMS.....	24
Tabela 4. Classificação TNM para neoplasmas mamários de cadelas.....	30
Tabela 5. Anticorpos primários utilizados na técnica de IHQ e suas respectivas especificações.....	37
Tabela 6. Distribuição da classificação fenotípica nos tipos histológicos dos neoplasmas mamários de cadelas.....	45
Tabela 7. Características clínicas, patológicas e moleculares das cadelas que constituíram a parcela experimental do estudo gênico.....	57
Tabela 8. Quantidade de genes diferencialmente expressos no grupo carcinoma em relação às amostras normais (≤ -1 FC ≥ 1).....	58

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Representação esquemática das fases do desenvolvimento da glândula mamária do rato.....	4
Figura 2.	Representação esquemática das fases da disseminação metástica.....	10
Figura 3.	Representação esquemática da estrutura proteica das caderinas.....	18
Figura 4.	Esquema ilustrativo da estrutura das claudinas.....	20
Figura 5.	Fluxograma das atividades experimentais desenvolvidas no estudo.....	34
Figura 6.	Esquema da técnica do TMA.....	36
Figura 7.	Fotomicrografia dos perfis fenotípicos classificados por marcadores imuno-histoquímicos (ER, PR e HER2) em tumores mamários caninos (40x).....	46
Figura 8.	Distribuição das características clinicopatológicas e os estádios nos fenótipos luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e triplo negativo.....	48
Figura 9.	Curva de sobrevivência Kaplan-Meier das cadelas diagnosticadas com câncer de mama e reclassificadas em fenótipos moleculares por IHQ em luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e triplo negativo.....	49
Figura 10.	Porcentagem de óbitos das cadelas portadoras de câncer de mama segundo a classificação molecular em luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e triplo negativo.....	50
Figura 11.	Intensidade da imunoexpressão da E-caderina nos fenótipos luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e triplo negativo dos neoplasmas mamários de cadelas.....	51
Figura 12.	Fotomicrografia da imunoexpressão da proteína E-caderina em tumores mamários caninos (40x).....	52
Figura 13.	Padrão da marcação (positiva e negativa) das claudinas 1, 3, 4 e 7 nos neoplasmas mamários de cadelas..	53

Figura 14.	Pontuações (escores) das expressões das claudinas 1, 3, 4 e 7 obtidas após a avaliação da intensidade de marcação e quantidade de células marcadas nas amostras caninas de tumor de mama.....	54
Figura 15.	Fotomicrografia da imunoexpressão das claudinas 1 (A), 3 (B), 4 (C) e 7 (D) em neoplasias mamária de cadelas (40x).....	55
Figura 16.	Fotomicrografia da imunoexpressão das proteínas CD44+ e CD24-, caracterizando o fenótipo de célula-tronco tumoral em neoplasma mamário canino (40x).....	56
Figura 17.	Dispersão dos genes diferencialmente expressos nos carcinomas mamários ($-1 \leq \log FC \leq 1$) em relação às amostras mamárias normais de.....	58
Figura 18.	Funções moleculares dos genes regulados positivamente no carcinoma mamário canino.....	59
Figura 19.	Categoria dos processos biológicos dos genes positivamente regulados no carcinoma mamário canino.....	60
Figura 20	Funções moleculares dos genes regulados negativamente no carcinoma mamário canino.....	61
Figura 21.	Funções biológicas dos genes regulados negativamente no carcinoma mamário canino.....	62
Figura 22.	Análise da expressão gênica por PCR do gene HYAL-1 em tecido tumoral de cadelas.....	64
Figura 23.	Análise da expressão gênica por PCR do gene HYAL-1 em tecido tumoral mamário de cadelas agrupadas segundo o tipo de evolução da enfermidade.....	65

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que os tumores de mama de cadelas compreendem 52% de todos os neoplasmas que acometem tais pacientes (BRODY et al., 1985; ALL-DISSI et al., 2010) e destes 41% a 53 % são malignos (LANA et al., 2007; ALL-DISSI et al., 2010). Entretanto, pesquisas brasileiras mostram que a incidência dos tumores mamários malignos varia entre 60% a 82% (FELICIANO ET al., 2012, OLIVEIRA FILHO et al., 2010). Trata-se, portanto, de uma enfermidade de grande importância, em especial devido à alta taxa de mortalidade e morbidade nessa espécie (ZUCCARI et al., 2008; MANUALI, 2012).

Indicadores prognósticos clínicos e histopatológicos para a doença são muito estudados e considerados como parâmetros importantes para a determinação do possível curso e evolução da moléstia (LANA et al., 2007, CASSALI et al., 2013). Entretanto, ainda são incipientes e não são capazes de determinar fatores preditivos e prognósticos precisos (ZUCCARI et al., 2008).

Todas as classificações histopatológicas para tumores de mama em cadelas descritas na literatura falham em definir possíveis diferenças comportamentais entre os subtipos histológicos, em especial nos tumores que recebem o mesmo diagnóstico e em pacientes com mesmo estágio da doença. Diante disso, os fenótipos das células vislumbram uma nova ferramenta que contribui para o entendimento da biologia tumoral (ZUCCARI et al., 2008).

Diante do exposto, a análise da expressão imuno-histoquímica de marcadores prognósticos e preditivos nos câncer de mama se revela como uma modalidade diagnóstica importante. O que permite o melhor conhecimento da biologia e comportamento da neoplasia, oferecendo uma avaliação mais acurada do prognóstico, diagnóstico e tratamento dessa classe tumoral (BODEY, 2002, ZUCCARI et al., 2008).

Muitos marcadores imuno-histoquímicos foram propostos e hoje já está estabelecido um painel para utilização na rotina clínica de mulheres com câncer de mama. Este painel compreende os receptores hormonais de estrógeno e progesterona, o oncogene HER-2/neu, o marcador de proliferação celular Ki-67 e o supressor tumoral p53 (ZUCCARI et al., 2008). Todavia, na medicina veterinária, há

poucas pesquisas relacionadas com o assunto e os resultados publicados são discrepantes (PEÑA et al., 2014).

Além destes, a E-caderina, uma molécula de adesão, é considerada uma proteína supressora de tumor que reduz a progressão e invasividade das células neoplásicas, por isso pode ser usada como um marcador prognóstico do câncer de mama (BARANWAL et al., 2009). Em tumores mamários caninos parece existir uma significativa correlação entre a perda de expressão das E-caderinas e outros indicadores conhecidos de prognóstico reservado, tais como tamanho do tumor, ulceração, tipo histológico, tipo de crescimento, metástase em linfonodos e necrose, indicando que a perda da expressão pode ter um valor prognóstico ruim em neoplasias mamárias caninas (MATOS et al., 2006).

Com o advento de técnicas que viabilizam o mapeamento das expressões genéticas de tecidos identificou-se perfis de neoplasias da glândula mamária em mulheres. Perou et al. (1999; 2000) e Sorlie et al. (2001; 2003) mostraram que os carcinomas mamários de mulheres poderiam ser classificados em subtipos conforme o perfil de expressão gênica. Assim, a classificação prognóstica atual para mulheres portadoras de câncer de mama considera, além dos subtipos histológicos, os subtipos moleculares caracterizados nos seguintes fenótipos: Luminal A, Luminal B, Basal like e HER2 superexpresso (PEROU, 2011). A importância dessa classificação é denotada pela competência prognóstica e preditiva para o melhor manejo do câncer de mama.

Diante do exposto, o objetivo do referido estudo foi propor uma classificação fenotípica prognóstica com marcadores imuno-histoquímicos receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) e fator de crescimento epidérmico humano – 2 (HER2) para o câncer de mama em cadelas baseada em quatro perfis: luminal A (RE⁺ e/ou RP⁺, HER2⁻), luminal B (RE⁺ e/ou RP⁺, HER2⁺), HER2 superexpresso (RE⁻, RP⁻, HER2⁺) e triplo negativo (RE⁻, RP⁻ e HER2⁻) e associá-los à expressão da E-caderina. Após a classificação fenotípica, verificou-se o perfil de expressão gênica entre os fenótipos e a expressão gênica global dos carcinomas para a busca e identificação de novos marcadores de diagnóstico, de prognóstico e de malignidade para a enfermidade nessa espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Glândula Mamária

As glândulas mamárias são apêndices epidérmicos originadas a partir de glândulas sudoríparas apócrinas. São órgãos secretórios encontrados apenas em mamíferos e são constituídos por uma rede de ductos circundados por um estroma fibrovascular rico em adipócitos (SORENMO et al., 2011; MACIAS & HINCH, 2012).

O epitélio mamário é formado por dois principais tipos celulares: basal e luminal. O epitélio basal é composto por células mioepiteliais, as quais geram a camada exterior da glândula. O epitélio luminal compreende os ductos e os alvéolos secretores, além de conter as células epiteliais (MACIAS & HINCH, 2012).

Durante o desenvolvimento da glândula mamária é possível identificar três grandes fases: a embrionária, a púbere e a reprodutiva. É importante salientar que grande parte dos mecanismos envolvidos nessas etapas foi obtida a partir de estudos em roedores (MACIAS & HINCH, 2012). A figura 1 mostra as modificações que ocorrem na glândula mamária durante o processo de desenvolvimento desse órgão.

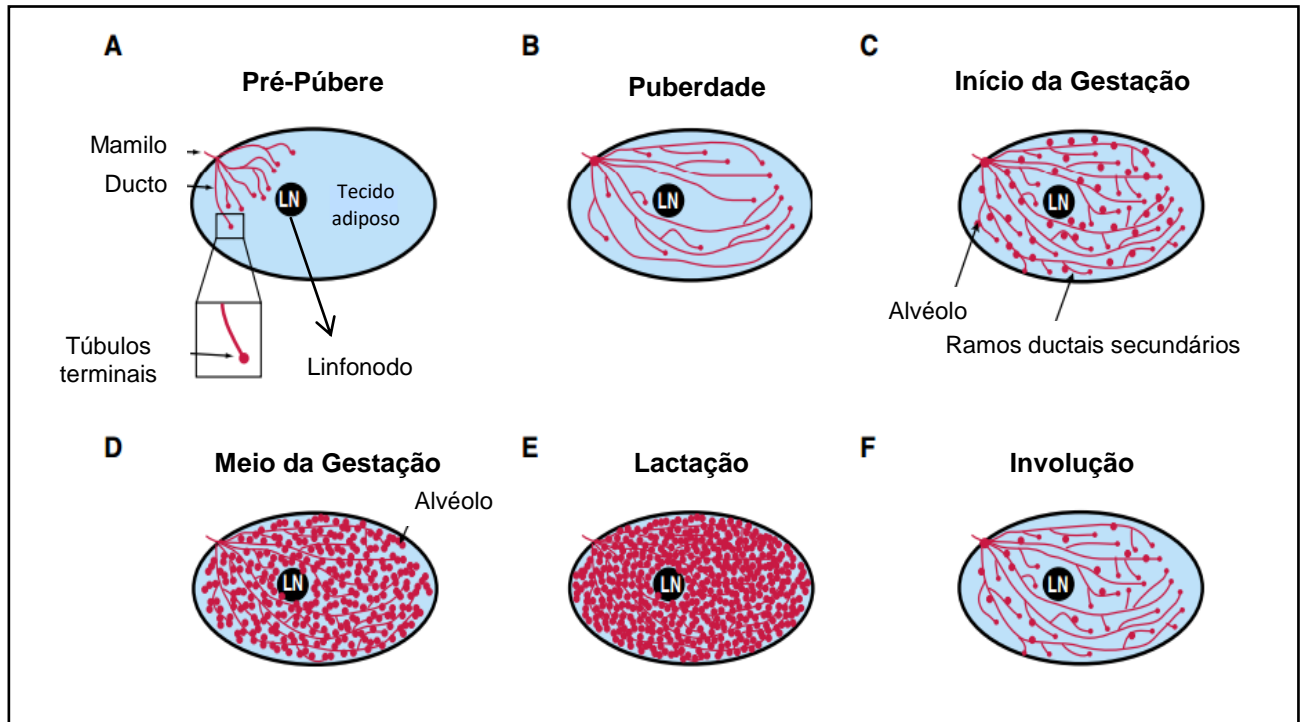


Figura 1: Representação esquemática das fases do desenvolvimento da glândula mamária do rato. Observa-se, na fase pré - púbere (A), um rudimentar sistema de ductos. Na puberdade (B), a ramificação da árvore ductal é estimulada pelo estrógeno. Nessa fase, ocorre o alongamento, ramificação e prolongamento dos túbulos terminais. Na gestação (C, D e F), as alterações morfológicas estão relacionadas à alveologênese, a qual é modulada pelos hormônios progesterona e prolactina. A progesterona estimula a formação e proliferação alveolar (aumentam em tamanho e número) e, em conjunto com a prolactina, promove a diferenciação alveolar para a síntese de leite durante o período da lactação. A involução (F) é caracterizada pela perda do epitélio alveolar (apoptose) secretor após o desmame, em especial pela diminuição dos níveis hormonais (prolactina) e aumento da atividade enzimática que acarreta na degradação da matriz extracelular. Adaptado de Watson & Khaled (2008).

2.2 O Câncer de Mama em Cadelas

2.2.1 Definição

O câncer é resultado do acúmulo de alterações genéticas e/ou epigenéticas em oncogenes ou genes supressores tumorais. Tais fenômenos promovem o desequilíbrio da homeostase celular e a aquisição de diferentes habilidades que sustentam a formação, a manutenção e progressão da doença (HANAHAN, WEINBERG, 2011).

2.2.2 Epidemiologia

O câncer de mama é a neoplasia mais comum em cadelas não castradas, ou castradas tardiamente (EGENVAL et al., 2010). Compreendem 52% de todos os neoplasmas que acometem tais pacientes (BRODY; GOLDSCHMIDT; ROSZEL, 1985; AL-DISSI et al, 2010), e, destes 41% a 53 % são malignos (LANA; RUTTEMAN; WITHROW, 2007; ALL-DISSI et al, 2010). Entretanto, pesquisas brasileiras mostram que os tumores malignos compreendem 60% a 82% dos diagnósticos histopatológicos das neoplasias mamárias (VARALLO et al., 2012; FELICIANO et al., 2012). Oliveira Filho et al. (2010) realizaram um estudo que contemplou 1.647 tumores mamários de cães e estabeleceram uma relação entre as formas benignas e malignas de 1: 2,75.

A apresentação clássica da enfermidade inclui fêmeas de meia-idade a idosas, entre sete a 12 anos de idade e com o envolvimento de mais de uma glândula (VARALLO et al., 2012). A afecção pode ocorrer em fêmeas caninas de qualquer raça. Entretanto, estudos mostram maior incidência em pacientes de porte pequeno: miniatura e *toy* (SLEECKX et al., 2011). As principais raças acometidas são Poodles, Pastores Alemães, Cocker Spaniels, bem como animais sem raça definida (DE NARDI et al., 2009).

2.2.3 Etiopatogenia

A. Fatores de Risco

Apesar da incidência da doença em cadelas sofrer variação em diferentes países e regiões, algumas características são compartilhadas nessas diferentes populações, dentre elas o status reprodutivo, a idade a raça (SORENMO et al., 2013).

A exposição hormonal é caracterizada como o principal evento para o desenvolvimento dos neoplasmas mamários em cadelas. Esse fato é comprovado pela baixa incidência da enfermidade em fêmeas castradas, bem como pela ineficiência do efeito preventivo da ovariectomia após o quarto ano de vida (SORENMO et al., 2013). O primeiro estudo que demonstrou os benefícios da esterilização precoce foi desenvolvido por Schneider et al. (1969). Os pesquisadores observaram que o efeito profilático do procedimento foi maior quando a castração foi realizada antes do primeiro cio, com risco de 0,5% para o surgimento da enfermidade, o qual aumenta para 8% entre o primeiro e o segundo cio e para 26% após o segundo.

Entretanto, é importante salientar que a gonadectomia em pacientes pré-púberes ou em cadelas com até 16 semanas de idade pode gerar alguns malefícios aos pacientes. Os efeitos da ausência do estrógeno e da progesterona podem repercutir no metabolismo e em vários sistemas do organismo. O ganho de peso é o efeito mais comumente observado. Desenvolvimento incompleto da vulva, incontinência urinária, retardo no fechamento das epífises ósseas e distúrbios musculares também foram relatados nesses pacientes (VOORWALDI et al., 2013).

Os hormônios ovarianos promovem alterações fisiológicas nas glândulas mamárias durante o ciclo estral e seus receptores estão presentes em tecidos normais e neoplásicos (GAMA; ALVES; SCHMITT, 2008). O efeito do estrógeno e da progesterona ocorre por meio da ativação dos receptores RE e RP, os quais estão localizados no citoplasma e no núcleo. Entretanto, foi descrito que outros fatores de crescimento possuem a capacidade de estimular a atividade intrínseca desses

receptores, o que demonstra a complexidade dessa via (ANNETE, 2016). Nas fêmeas caninas, os RE estão em maior quantidade nos tumores benignos e a expressão dos RP diminui progressivamente a partir de lesões hiperplásicas/displásicas, tumores benignos e malignos (CHANG et al., 2009). Assim, a diminuição da expressão de RE e RP estão correlacionadas com prognósticos piores (DE NARDI et al., 2009).

Os distúrbios endócrinos verificados em pacientes com irregularidade no ciclo estral, cistos foliculares ovarianos, corpo lúteo persistente, hiperplasia endometrial e gravidez psicológica, não foram associados ao maior risco de desenvolvimento de tumor de mama, como demonstrado por BRODEY et al. (1966) e FERGUSON (1985)

B. Transição Epitélio- Mesenquimal (EMT), Progressão Tumoral e Metástase

Para entender a transição epitélio-mesenquimal é necessário compreender as características básicas de um tecido epitelial. Neste, as células formam camadas uniformes, ou apenas uma monocamada, e estão intimamente ligadas umas às outras por estruturas especializadas localizadas nas membranas. As junções celulares e as adesões entre as células epiteliais são as responsáveis pela coesão e união celular e, dentre outras funções, evitam a motilidade. Além disso, essa coesão contribui para a manutenção da homeostasia e da morfologia do tecido. Por conta disso, o epitélio apresenta polaridade. Isso significa que as superfícies basal e apical são diferentes, aderindo a diferentes substratos ou apresentando diferentes funções. Abaixo das camadas de células epiteliais encontra-se a membrana basal que separa células epiteliais das subcamadas das células mesenquimais (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1997).

A matriz extracelular (MEC) está presente nos tecidos epiteliais, porém em pouca quantidade. Além de ser uma rede para a estabilização da estrutura física dos constituintes celulares, favorece o início dos processos biomecânicos e bioquímicos requeridos para a morfogênese, diferenciação e homeostase tissular. Outra importante função desempenhada pela MEC são as interações célula-célula e

célula-matriz, responsáveis pela integridade tissular. Possui uma estrutura complexa formada por proteínas secretadas e glicoconjugados, os quais originam uma rede molecular capaz de regular as funções celulares, como a diferenciação e a expressão de genes específicos para cada tecido (FRANTZ et al., 2010, de SOUZA & PINHAL, 2010). Nesse contexto, a dinâmica entre a MEC e as células é decisiva para determinar os comportamentos celulares, tais como morte, diferenciação e motilidade. Estes fenômenos têm relação e importância em diversos mecanismos, dentre os quais pode-se citar a inflamação, a resposta imune, a transformação celular e a metástase (de SOUZA & PINHAL, 2010).

Diante do exposto, o ácido hialurônico (AH) é o maior componente da matriz extracelular. Suas principais funções estão relacionadas à manutenção da hidratação dos tecidos e à regulação da adesão, migração e proliferação celular (JIN-XIANG et al., 2011). A degradação do AH é feita pela enzima hialuronidase (AHase), uma glicoproteína que atua sobre a MEC, alterando a sua composição e estrutura. A AHase tipo 1, codificada pelo gene HYAL-1, é a principal enzima desta classe. Nível aumentado dessa hialuronidase pode ser empregado como marcador bioquímico para a detecção de tumores de alto grau em câncer de bexiga e para a recorrência em câncer de próstata (POSEY et al., 2003; EKICI et al., 2004).

O gene (HYAL-1) codifica a hialuronidase lisossomal, uma enzima capaz de degradar o ácido hialurônico (AH), o principal componente da MEC. Dessa forma, essa proteína enzimática atua no microambiente tumoral e pode influenciar na transição epitélio-mesenquimal nos processos neoplásicos (CHANMEE et al., 2016). É importante salientar que as funções biofísicas do AH variam conforme o seu tamanho molecular. Moléculas de baixo peso molecular (PM) induzem a inflamação, a angiogênese, a linfangiogênese e a expressão de metaloproteinases, fatores importantes para a iniciação e progressão tumoral. Daí a importância do catabolismo do AH nos diferentes tipos de câncer, a qual é mediada principalmente pelas hialuronidases, gerando HA de baixo PM. Já as moléculas de alto PM possuem ação anti-angiogênica e imunossupressora (WU et al., 2015; CHANMEE et al., 2016).

A transição epitélio-mesenquimal (EMT) é um processo biológico que induz modificações bioquímicas, moleculares e morfológicas nas células epiteliais, as quais passam a adquirir um fenótipo mesenquimal. Durante esse processo, em

virtude da perda das características epiteliais inerentes, bem como da polaridade celular, observa-se o aumento da capacidade de migração, invasão, além de maior resistência a apoptose (KALLURI & WEINBERG, 2009; NIETO & CANO, 2012).

A importância da EMT durante a progressão de um tumor está relacionada ao ganho da capacidade das células neoplásicas epiteliais de infiltrar os tecidos adjacentes e disseminar metástases para locais distantes. O processo metastático é complexo e não está totalmente esclarecido, mas para que ocorra é necessário que a célula neoplásica supere os sistemas de controle do organismo, modifique o comportamento e as características fenotípicas para, assim, conseguir se adaptar a novos ambientes e, conseqüentemente, colonizar outro sítio, conforme representado na figura 2 (NIETO et al., 2016).

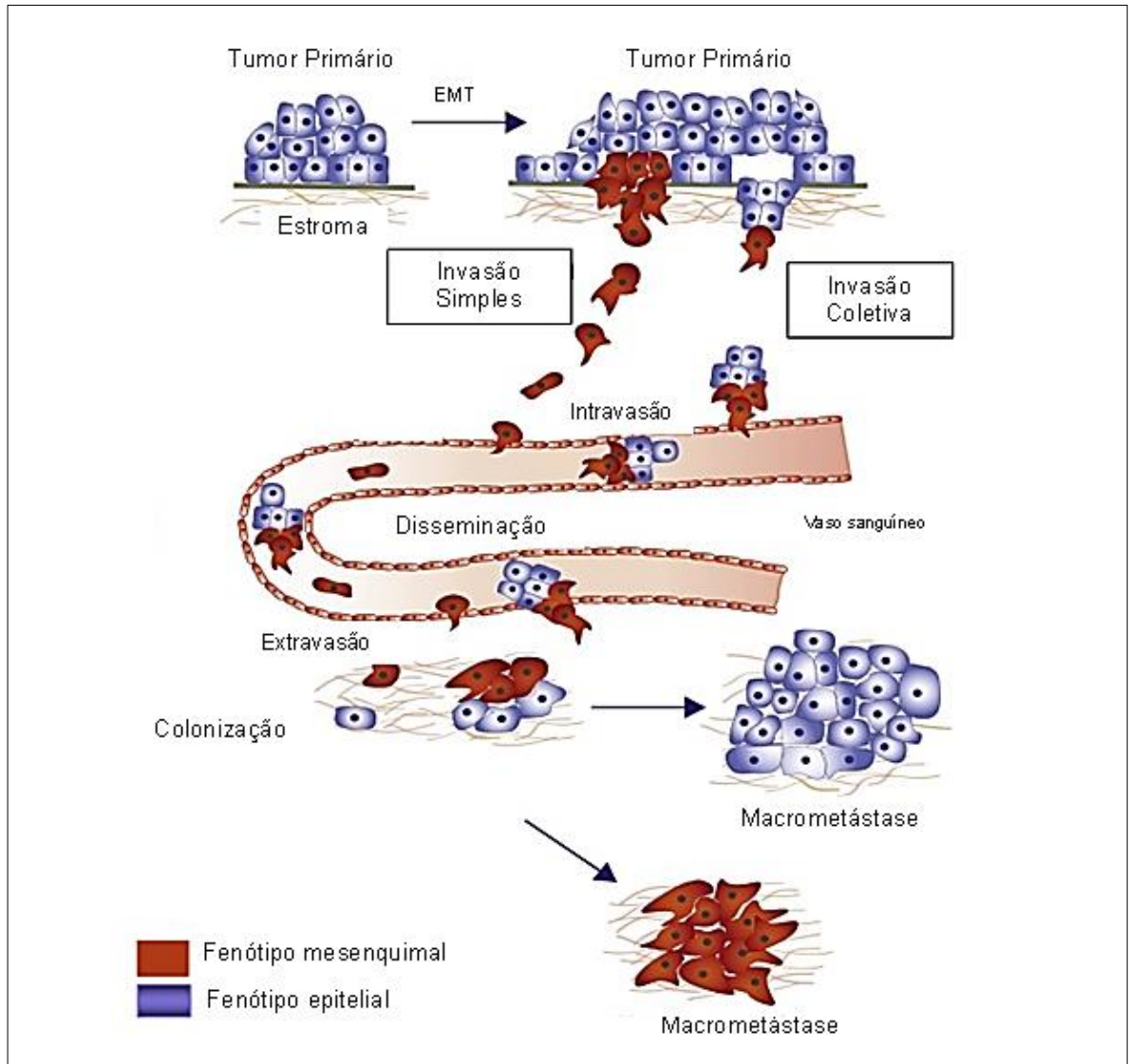


Figura 2: Representação esquemática das fases de disseminação metastática. As células neoplásicas epiteliais sofrem modificações bioquímicas, moleculares e morfológicas para adquirirem o fenótipo de células mesenquimais, o que caracteriza a transição epitélio-mesenquimal (EMT). Essas alterações reduzem a coesão entre os elementos celulares que constituem a lesão, bem como favorece a invasão aos tecidos adjacentes pela degradação da matriz extracelular. A disseminação vascular ocorre pela intravasão das células cancerígenas tanto pela forma simples quanto pela coletiva (agrupadas). A extravasão é caracterizada pela saída das células tumorais dos vasos. Nesse momento, ocorre a reorganização do estroma para a colonização do novo sítio (micrometástase) e posterior progressão da doença (macrometástases). Adaptado de Diepenbruck & Christofori (2015).

Distintos processos moleculares estão envolvidos no fenômeno da EMT. A ativação de fatores de transcrição, a expressão de proteínas de superfície celular específicas, a reorganização e expressão de proteínas do citoesqueleto, a produção de enzimas que degradam a matriz extracelular e as alterações na expressão de microRNAs específicos são acontecimentos relatados. Muitas moléculas que participam dessa alteração fenotípica podem ser usadas como marcadores em diferentes condições (KALLURI & WEINBERG, 2009).

C. Células-Tronco Tumorais

Classicamente, o processo de tumorigênese envolve a aquisição progressiva de múltiplas mutações que, governadas pela seleção natural, levam a expansão de subpopulações celulares mais agressivas, contribuindo para a progressão tumoral. Todavia, uma teoria mais recente, afirma que apenas um pequeno número de células que compõe a neoplasia é capaz de proliferar e formar novos tumores. As células com essas habilidades são denominadas células-tronco tumorais ou células iniciadoras (THIAGO, 2006).

De acordo com essa hipótese, um subconjunto definido de células tumorais tem a capacidade de conduzir o crescimento e a progressão do processo neoplásico. As células-tronco tumorais apresentam duas características fundamentais: a autorreplicação e a capacidade de se diferenciar em células maduras. A autorreplicação é caracterizada pela multiplicação celular, o que permite o aumento da massa neoplásica, bem como a gênese de novas células iniciadoras tumorais. Já o processo de diferenciação permite com que as células tronco-tumorais originem linhagens específicas de células maduras, o que contribui para a heterogeneidade tumoral (LOBO et al., 2007).

Devido às células-tronco tumorais não poderem ser isoladas e caracterizadas como uma célula simples, marcadores específicos de superfície de membrana citoplasmática foram detectados em neoplasmas mamários humanos, com marcação positiva para CD44 e negativa ou baixa marcação para CD24. Linhagens celulares, derivadas de neoplasmas mamários caninos, que apresentam capacidade

de autorrenovação (CD44+/CD24-) expressaram altos níveis de aldeído desidrogenase-1 (ALDH-1) (MICHISHITA et al., 2012) e a expressão deste marcador em neoplasmas mamários foi relacionada com um mau prognóstico (GINESTIER et al., 2007).

A molécula de adesão CD44 é uma proteína de massa molecular de 85 e 90 kDa que é expressa por uma variedade de células do tecido linfático, cerebral, hepático, dos vasos sanguíneos e de células inflamatórias (ALLDINGER et al., 1999). Além disso, os tumores histiocíticos, incluindo histiocitoma cutâneo canino e a histiocitose maligna, expressam CD44 (MOORE et al., 1996). No melanoma maligno canino foi observada uma expressão mais intensa do CD44 em comparação com a contraparte benigna deste tumor (SERRA et al., 2004).

O CD24 é uma molécula de adesão tipo mucina identificada como um ligante alternativo da P-selectina, presente em receptores de plaquetas ativadas e de células endoteliais cuja expressão pode aumentar a capacidade de células de câncer de causar metástase (SIMONETTI et al., 2012). As células que foram fortemente positivas para CD44 e negativas para CD24 (CD44+/CD24-/low) tiveram características metastáticas em tumor de mama (PHUC et al., 2011). Sugere-se que as células-tumorais CD44+/CD24- podem ter comportamento clínico reservado. Em contraste, outros estudos não revelaram uma associação significativa de CD44 + /CD24- com um potencial de progresso ou de reincidência (BERNARDI et al., 2012).

Magalhães et al. (2013) também avaliaram 130 amostras de neoplasias mamárias de cadelas para a detecção de células-tronco tumorais. Detectaram o fenótipo CD24⁻/CD44⁺ em 40 neoplasias, o qual foi associado a um prognóstico mais reservado, pois estava correlacionado aos graus histológicos II e III de malignidade do tumor.

Magalhães et al. (2014) observaram que as porções epiteliais e mesenquimais dos carcinossarcomas apresentavam semelhanças nas imunomarcações para os anticorpos CD44, CD24 e Oct-4 para as células-tronco tumorais. A porção mesenquimal dos carcinomas em tumores mistos não apresentou marcação, provavelmente por serem células bem diferenciadas. As células epiteliais dos tumores não diferiram significativamente quanto à imunomarcação para as células progenitoras tumorais

2.2.4 Potenciais Marcadores para o Câncer de Mama em Cadelas

A desregulação do eixo GH/IGF-1 tem sido considerada como a principal causa da carcinogênese mamária em mulheres. Em cadelas, também há evidências do envolvimento de fatores de crescimento e hormônios esteroidais no processo de tumorigênese mamária. Entretanto, a etiologia não está esclarecida (KLOPFLEISCH et al., 2011a; SORENMO et al., 2013).

Muitos marcadores imuno-histoquímicos foram propostos e hoje já está estabelecido um painel para utilização na rotina clínica de mulheres com câncer de mama. Este painel compreende os receptores hormonais de estrógeno e progesterona, o oncogene HER-2/neu, o marcador de proliferação celular Ki-67 e o supressor tumoral p53 (ZUCCARI et al., 2008).

Os marcadores mais utilizados são o receptor de estrógeno (RE) e receptor de progesterona (RP). Tanto o RE e como o RP são fatores de transcrição ligantes ativos que pertencem à família de receptores hormonais nucleares (DUFFY et al., 2005).

A partir destes marcadores foi observado que a associação entre eles tem um interessante valor prognóstico em mulheres. Pacientes com tumores triplo-negativos (RE⁻, RP⁻ e HER2⁻) apresentaram incidência maior de recorrência ou de metástases à distância associada em comparação com os tumores não triplo negativos (IDOWU et al., 2012).

Na medicina veterinária, os marcadores utilizados não estão padronizados e os resultados publicados são discrepantes (PEÑA et al., 2014). Gama et al. (2008) avaliaram um painel imuno-histoquímico com seis marcadores (RE, RP, HER2, CK5, p63 e P-caderina) para carcinomas mamários caninos. Verificaram que a expressão positiva dos receptores hormonais nas células neoplásicas estava correlacionada com prognóstico melhor. Todavia, a ausência da marcação destes receptores e a superexpressão do HER2 garantiam maior agressividade à neoplasia. Mas, Sassi et al. (2010) não observaram diferenças no prognóstico da doença após a averiguação do painel imuno-histoquímico baseado nos marcadores RE, RP, ERBB2, CK 5/6 e

CK14 em neoplasias mamárias de cadelas, que corroboram a necessidade de maiores estudos nessa temática.

2.2.4.1. Receptores Hormonais

A presença de receptores hormonais no câncer de mama de cadelas inferem o controle e a dependência dos hormônios ovarianos no desenvolvimento, manutenção e evolução da doença. O estrógeno e progesterona promovem alterações fisiológicas nas glândulas mamárias durante o ciclo estral e seus receptores estão presentes em tecidos normais e neoplásicos (GAMA; ALVES; SCHMITT, 2008).

Dessa forma, desde a puberdade, o estrogênio e a progesterona estimulam as células mamárias normais, com o intuito de progredir com o desenvolvimento da glândula (fase púbere) e, posteriormente, prepará-la para a lactação, quando termina o completo desenvolvimento mamário. Entretanto, na ausência de gestação, essas influências hormonais nas células epiteliais e mioepiteliais diminuem de forma drástica, o que permite a reorganização tecidual (MACIAS & HINCH, 2012). Os estímulos cíclicos e crônicos, durante os ciclos estrais das cadelas, podem interferir nesse processo, desregulando os mecanismos finos de proliferação e involução das células, favorecendo as mutações e, finalmente, o desenvolvimento do câncer de mama.

O estrogênio atravessa a membrana celular e nuclear por difusão passiva, sem a intervenção de canais ou proteínas-transmembrana. Ao chegar ao núcleo, liga-se ao receptor de estrogênio, formando um complexo que ativa sequências específicas de genes que, por sua vez, controlam o crescimento e a diferenciação celular. Desta forma, é responsável pela proliferação de células epiteliais durante o pico estrogênico do ciclo menstrual, e, indiretamente, pela sua posterior morte no final do ciclo (EISENBERG et al., 2001). A expressão do receptor de progesterona (RP), mediada pelo receptor de estrogênio, é geralmente verificada juntamente com a expressão de RE, e a determinação imuno-histoquímica da expressão de RP foi validada, demonstrando que o padrão de expressão do RP está associado com a tempo livre de doença e a sobrevida global (BARDOU et al., 2003). Nas fêmeas

caninas, observa-se que a presença de RE é significativamente mais elevada em tumores benignos e a expressão do RP tende a diminuir progressivamente a partir de lesões hiperplásicas/displásicas, tumores benignos e malignos (CHANG et al., 2009). Assim, a diminuição da expressão de RE e RP tem relação com um pior prognóstico (DE NARDI et al., 2009).

A. Receptor de Estrógeno (RE)

Os receptores de estrogênio (ER) pertencem à superfamília dos receptores nucleares de hormônios esteroides. Atuam como fatores de transcrição dependentes das moléculas que a eles se ligam (ligantes) e regulam a proliferação celular. As funções biológicas do estrogênio são mediadas por dois tipos de receptores, o alfa (RE α) e o beta (RE β). O modo de ação de cada um depende da quantidade e do nível de expressão encontrados nos tecidos (LEE et al., 2012).

Os RE são descritos como um dos mais importantes agentes que estimulam a proliferação das células epiteliais da glândula mamária. No câncer, a interação entre o estrogênio e o receptor estimulam a liberação de fatores de crescimento pelas células neoplásicas, o que leva ao aumento da proliferação celular (KLOPFLEISCH et al., 2011a; SORENMO et al., 2013).

B. Receptor de Progesterona (RP)

Os efeitos fisiológicos da progesterona também são mediados pela interação com receptores nucleares de hormônios esteroides, os RP. Nos humanos, foram identificadas duas isoformas originais de RP: a isoforma A e a isoforma B. O RPA é descrito como repressor dominante do PRB, já este foi apontado como facilitador da proliferação e diferenciação do epitélio de tecidos dependentes de tal hormônio. A expressão do receptor de progesterona é geralmente relacionada com a expressão do RE (LI et al., 2003; CALDERÓN & DIAZ- YAMAL, 2008; LIU et al., 2016).

2.2.4.2. Fator de crescimento epidérmico humano 2 – HER2 ou erB2

O fator de crescimento epidérmico (EGF) foi uma das primeiras moléculas a ser descoberta na década de 1960. É um polipetídeo capaz de estimular o crescimento e a diferenciação de células epidérmicas e mesodérmicas. Estudos posteriores identificaram os receptores de tirosina-quinase, uma glicoproteína localizada nas membranas celulares, dentre os quais se pode destacar o fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2 ou erB2) (APPERT-COLLIN et al., 2015).

O proto-oncogene C-erbB-2 ou também chamado HER-2/neu, tem sido amplamente estudado (VAN DE VIJVER et al., 2000). Expresso em cerca de 10 a 20% dos casos de carcinomas de mama em mulheres, o C-erbB-2 tem correlação com menor sobrevida, especialmente em pacientes com metástases axilares. De um modo geral, assume-se que pacientes com expressão de C-erbB-2, especialmente no grupo com metástases em linfonodos, têm um prognóstico pior (EISENBERG et al., 2001).

No câncer de mama, alguns subtipos podem apresentar disfunções desses receptores. O aumento da expressão do HER2 em tumores específicos (HER2⁺) está associado à maior taxa de crescimento e proliferação das células neoplásicas, bem como ao desenvolvimento de metástases à distância e, conseqüentemente, a menor sobrevida das pacientes. O que se verifica é a permanência constante do sinal que estimula a mitose, mediado pelo recrutamento das vias PI3K/Akt e AMPK (MÉNARD et al., 2003, APPERT-COLLIN, et al., 2015).

Além de determinar o prognóstico mais acurado da doença, outra vantagem relevante para a determinação desse subtipo é a possibilidade da terapia-alvo. Quanto ao tratamento personalizado, o uso de trastuzumabe (Herceptin) é um exemplo de sucesso da terapia-alvo com anticorpos monoclonais anti-HER2 em mulheres, controlando a progressão da doença.

Nesse contexto, em virtude do caráter preditivo e prognóstico do HER2, estudos relacionados à expressão desse marcador foram desenvolvidos para as cadelas. Entretanto, os resultados são controversos em virtude da falta de padronização dos ensaios. Frente a isso, na tentativa de minimizar esse viés, um

consenso foi publicado para ajudar os pesquisadores e, assim obter resultados mais consistentes (PEÑA et al., 2014). O consenso descreve algumas diretrizes para padronizar as avaliações do RE, RP e HER2 por imuno-histoquímica e, assim, facilitar a compreensão do papel real desses marcadores no prognóstico de neoplasias mamárias caninas. Nesse documento, o marcador HER2 deve ser considerado positivo quando houver forte marcação da membrana citoplasmática (3+), e os resultados para o RE e RP devem ser conferidos pela pontuação Allred.

2.2.4.3 Moléculas de Adesão Celular (CAMs) e Junções Celulares (JCs)

Como já esclarecido, as principais características do tecido epitelial é a polaridade, a imobilidade dos componentes celulares e a forte adesão entre as células e/ou à matriz extracelular (MEC) (GUMBINER, 1996).

As CAMs são responsáveis pela coesão entre as células epiteliais e este contato é estabilizado por junções celulares especializadas. Além disso, a regulação do transporte de solutos, íons e água, em especial no espaço paracelular (espaço delimitado entre duas células adjacentes) é feita pelas JC. As JC podem ser estruturas simétricas ou assimétricas (SUMIGRAY & LECHER, 2015). Aqui, o interesse especial é voltado para primeira. Elas são constituídas por três classes, a junção de oclusão, a junção de ancoragem ou de adesão e as junções comunicantes (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1993).

Muitas moléculas associadas a esse processo de adesão celular estão sendo usadas como potenciais biomarcadores para diferentes tipos de câncer, as quais foram pormenorizadas nas seções seguintes.

A Junções Aderentes ou de Ancoragem: E-caderina

As caderinas compreendem uma grande família de glicoproteínas transmembrânicas cálcio-dependentes responsáveis pela adesão célula-célula e pela morfogênese tecidual. Pelo menos cinco subfamílias foram relatadas: as

caderinas clássicas do tipo I, as do tipo II, as desmossômicas (desmocolinas e desmogleínas) e as protocaderinas (van ROY & BERX, 2008).

A E-caderina é uma caderina encontrada nas superfícies celulares laterais e é responsável pela manutenção da das camadas epiteliais. Possui uma estrutura composta por domínio extracelular, um transmembrana e um citoplasmático. A porção extracelular liga-se à outra E-caderina da célula adjacente, mantendo a adesividade célula-célula e impedindo a desconexão da célula do epitélio.

O domínio citoplasmático das caderinas está ligado à actina por meio de proteínas intermediárias conhecidas coletivamente como complexo das cateninas. Esse complexo inclui as cateninas α , β e γ e proteínas de ligação à actina e desempenha três funções distintas associadas à função das caderinas: as caderinas medeiam a ligação direta entre aos filamentos de actina; interagem com moléculas reguladoras do citoesqueleto de actina e controlam o caráter adesivo do domínio extracelular das caderinas, conforme representado na figura 3 (van ROY & BERX, 2008).

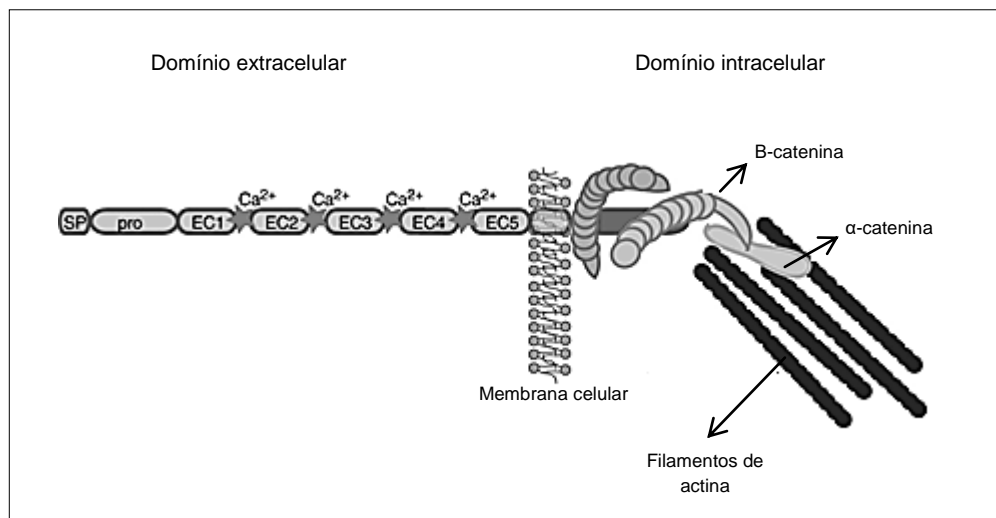


Figura 3: Representação esquemática da estrutura proteica das caderinas. O domínio extracelular é constituído por cinco porções homólogas (EC1-EC5) ligadas por pontes mediadas por cálcio (Ca^{2+}). O domínio intracelular constitui a porção carboxi terminal da proteína, a qual, junto com as cateninas, formam o complexo caderina-catenina. Adaptado de Wheelock et al. (2008).

Diante disso, a E-caderina exerce função sobre o controle da proliferação celular. A influência dessa proteína no mecanismo de multiplicação pode ser exercida pela capacidade desta proteína em regular a sinalização da via Wnt canônica por meio de sua interação com a beta-catenina (STOCKINGER et al., 2001).

Em tumores mamários caninos parece existir uma significativa correlação entre a perda de expressão das E-caderinas e outros indicadores conhecidos de prognóstico ruim, tais como tamanho do tumor, ulceração, tipo histológico, tipo de crescimento, metástase em linfonodos e necrose, indicando que a perda da expressão das E-caderinas pode ter um valor prognóstico em neoplasias mamárias caninas (MATOS et al., 2006).

Gama et al. (2007) averiguaram a expressão da E-caderina, pela técnica da imuno-histoquímica, em neoplasias mamárias caninas. Os pesquisadores verificaram que a redução da expressão dessa proteína estava associada à neoplasmas com alto grau histológico e metástase. Também houve correlação com recidivas mais precoces do tumor e a menor taxa de sobrevivência global das pacientes.

Rodo e Malicka (2008) também investigaram a imunoexpressão da E-caderina em câncer de mama de cadelas. Constataram que a maior intensidade da marcação dessa proteína ocorria em neoplasias benignas. Não verificaram diferenças na expressão do grupo carcinoma quando associado aos diferentes graus histológicos.

B. Junções Ocludentes: Claudinas

O nome claudina é originado da palavra latina *claudere*, cujo significado é “fechar”. A família das claudinas, membro do complexo juncional das ocludinas, compreende 24 moléculas identificadas como proteínas integrais de membrana nas *tight junction* de células epiteliais e endoteliais. As *tight junction* se localizam na região superior lateral do complexo juncional apical do epitélio e modulam o fluxo paracelular, atuam como uma barreira semipermeável que regula a passagem de solutos, mantendo o gradiente de concentração entre a região apical e basolateral, a

polaridade, estrutura e a função celular. É composta por uma rede de filamentos complexa, que pode ser extremamente variável em número e complexidade, dependendo do tipo de célula (LAL-NAG & MORIN, 2009).

Dois subgrupos de membros da família claudina foram reconhecidos a partir das análises filogenéticas das proteínas de ratos e de humanos: o clássico e o não clássico. Aquele exibe uma homologia mais evidente e incluem a claudinas 1-10, 14, 15, 17 e 19. As não clássicas exibem maior variedade na sequência dos aminoácidos e são representadas pelas claudinas 11-13, 16, 18 e 20-24 (KRAUSE et al., 2008; LAL-NAG & MORIN, 2009). Essas proteínas possuem quatro domínios transmembrana, dois *loops* extracelulares e caudas intracelulares amino e carboxi-terminal, conforme mostra a figura 4.

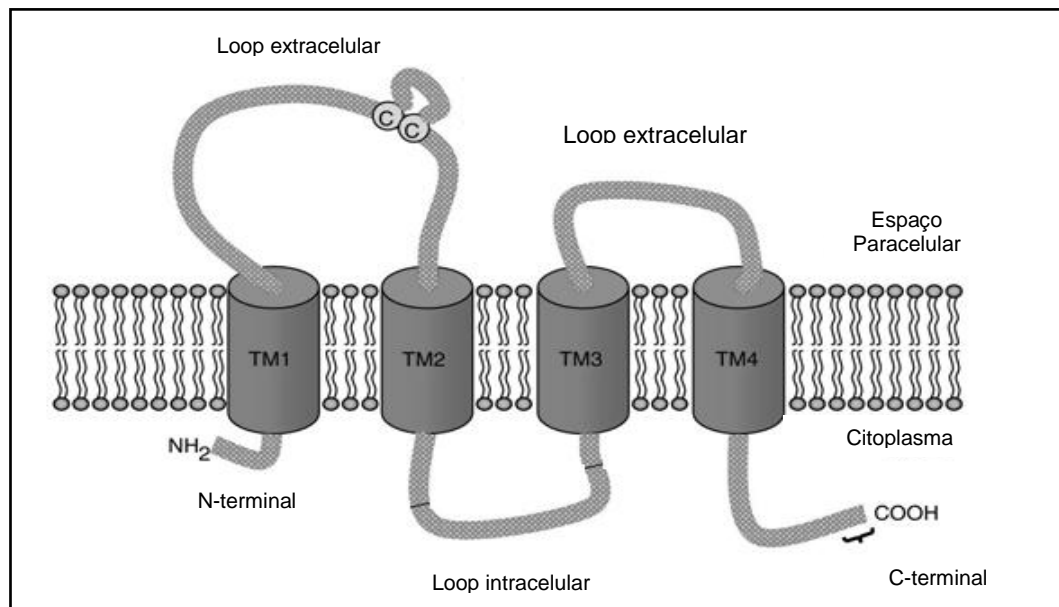


Figura 4: Esquema ilustrativo da estrutura das claudinas. Verifica-se os quatro domínios transmembrana (TM1, TM2, TM3 E TM4), os loops extracelulares, o loop intracelular e as caudas amino (NH₂) e carboxi (COOH) no citoplasma. Adaptado de LAL-NAG & MORIN (2009).

O papel das claudinas na formação das moléculas juncionais tem sugerido a hipótese que a perda da expressão pode reduzir a adesão celular e conseqüentemente, aumentar o potencial da invasão e motilidade das células

tumorais, associando as claudinas ao processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT) (HENESSY et al., 2009).

O padrão de expressão dessas claudinas é variável entre os diferentes tipos de tecidos, conforme demonstra a tabela 1, razão pela qual o uso dessas moléculas como biomarcadores para o câncer tem sido estudado (SINGH & DHAWAN, 2015), pois falhas nos componentes das *tight junctions* foram associadas ao desenvolvimento de câncer. A perda da arquitetura polarizada das células, o fornecimento desregulado de nutrientes e o aumento da motilidade das células tumorais que apresentaram expressões anormais de algumas claudinas, favorecem a progressão da doença (OUBAN & AHMED, 2010).

Tabela 1: Distribuição e função das claudinas 1, 3, 4 e 7 nos tecidos. Modificado de Krause et al. (2008).

Claudina	Expressão tecidual	Função Paracelular
1	Típica de epitélio ocludente Próstata de rato Epitélio do ovário humano Ouvido interno Endotélio dos capilares cerebrais Epitélio do plexo coroide de ratos	Barreira epidérmica
3	Próstata de rato Vesícula biliar humana Segmentos do néfron Epitélio intestinal e hepático	<i>Tight junction</i> do endotélio
4	Próstata de rato Vesícula biliar humana	Reduz permeabilidade celular de cátions
7	Próstata de rato Duodeno, jejuno e íleo Tonsilas palatinas humanas Segmentos do néfron	Diminui a permeabilidade paracelular do Cl ⁻ e aumenta a do Na ⁺ . Barreira paracelular do Cl ⁻ , canal para Na ⁺ .

Claudinas 3 e 4 são expressas na membrana das células epiteliais lobulares e ductais da glândula mamária normal canina (JAKAB et al., 2008a). As claudinas 1, 2, 3, 4, 5, e 7 são comumente expressas na glândula mamária normal dos cães, indicando que a perda ou diminuição da expressão de claudinas 1, 2, 5, e 7 podem

levar ao descolamento celular e invasão das células neoplásicas (KLOPFLEISCH et al., 2011a). Os resultados obtidos por Jakab et al. (2008) sugerem que a perda de expressão de claudina-7 pode levar a perda de contato das células vizinhas e consequente invasão em tumores mamários caninos.

Acredita-se que a diminuição da expressão das proteínas responsáveis pelas *tight junctions* provocaria uma perda de adesão entre as células, capacidade de invasão e perda da diferenciação em células tumorais. Porém, o mecanismo que relaciona superexpressão das claudinas ao câncer ainda não está bem esclarecido. Considera-se que a super-regulação possa desestruturar o tecido, comprometendo a função das “*tight junctions*” e favorecendo o aparecimento da neoplasia (SINGH et al., 2010).

Diante do exposto, estudos já comprovaram alterações no perfil de expressão dessas proteínas em diversos tipos de neoplasias. A expressão diminuída das claudinas 1 e 7 e a expressão aumentada das 3 e 4 foram observadas em câncer de mama de mulheres (OUBAN & AHMED, 2010).

Jakab et al. (2008) avaliaram a expressão das claudinas 1, 2, 3, 4, 5 e 7 em lesões hiperplásicas e neoplásicas da glândula mamária de cães. Sugeriram que a perda ou diminuição da expressão de claudinas 1, 2, 5 e 7 podem incitar o desprendimento e invasão das células neoplásicas da mama.

2.2.5 Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo das neoplasias mamárias em cadelas é fundamentado pela caracterização da paciente (raça, idade, status reprodutivo), pela história pregressa e pelos achados do exame físico. Já o definitivo é estabelecido pelos exames citológico, histopatológico e, atualmente, pelos moleculares (SORENMO, 2003; CASSALI et al., 2011; KLOPFLEISCH et al., 2011a).

2.2.5.1 Classificação Histopatológica

A primeira classificação internacional desenvolvida para a avaliação de tumores e displasias da glândula mamária de cadelas e gatas foi publicada em 1974 por Hampe & Misdorp e foi baseada, em grande parte, na descrição da morfologia celular. Esse documento possui relevância científica, pois se tornou a base para as posteriores classificações das neoplasias malignas caninas. A tabela 2 mostra a variedade de classificações desenvolvidas para o diagnóstico histopatológico das neoplasias mamárias de cadelas.

Tabela 2: Classificações histopatológicas publicadas para o diagnóstico de neoplasias mamárias em cadelas.

Autores	Periódico/Livro	Ano
HAMPE & MISDORP	Bulletin of the World Health Organization	1974
MONLUX et al.	The Veterinary Pathology	1977
MISDORP et al.	Armed Force Institute of Pathology and World Health Organization	1999
GOLDSCHMIDT et al.	The Veterinary Pathology	2011
CASSALI et al.	Brazilian Journal of Veterinary Pathology	2011

A classificação internacional histopatológica para tumores mamários caninos e felinos (WHO Classification), publicada em 1999 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), é a mais utilizada para o diagnóstico dessas lesões nesta espécie. A tabela 3 mostra as possibilidades diagnósticas propostas nesse documento.

Tabela 3: Classificação Internacional Histopatológica para Neoplasias Mamárias de Cadelas – Classificação da OMS (MISDORP et al., 1999).

1. Tumores Malignos
1.1 Carcinoma não invasivos (<i>in situ</i>)
1.2 Carcinoma complexo
1.3 Carcinoma simples
1.3.1 Carcinoma túbulo-papilífero
1.3.2 Carcinoma sólido
1.3.1 Carcinoma anaplásico
1.4 Tipos especiais de carcinoma
1.4.1 Carcinoma de células fusiformes
1.4.2 Carcinoma de células escamosas
1.4.3 Carcinoma mucinoso
1.4.3 Carcinoma rico em lipídeos
1.5 Sarcoma
1.5.1 Fibrossarcoma
1.5.2 Osteossarcoma
1.5.3 Outros sarcomas
1.6 Carcinossarcoma
1.7 Carcinoma ou sarcoma em tumores benignos
2. Tumores Benignos
2.1 Adenoma
2.1.1 Adenoma simples
2.1.2 Adenoma complexo
2.1.3 Adenoma basaloide
2.2 Fibroadenoma
2.2.1 Fibroadenoma com baixa celularidade
2.2.2 Fibroadenoma com alta celularidade
2.3 Tumor misto benigno
2.4 Papiloma ductal
3. Tumores sem classificação
4. Hiperplasias mamárias e displasias
4.1 Hiperplasia ductal
4.2 Hiperplasia lobular
4.2.1 Hiperplasia epitelial
4.2.1 Adenose
4.3 Cistos
4.4 Ectasia ductal
4.5 Ginecomastia

A avaliação anatomo-morfológica das lesões mamárias é importante, entretanto, a diversidade de classificações histopatológicas existentes na literatura reflete a grande subjetividade e falta de consenso entre os patologistas para a

determinação precisa do diagnóstico, bem como do prognóstico (ZUCCARI et al., 2006).

Nesse contexto, a reprodutibilidade da classificação e da graduação histológica do câncer de mama entre patologistas tem sido uma vertente de discussão. Longacre et al. (2006) inferiram que as dificuldades na reprodutibilidade dos diagnósticos anatomo-morfológicos das lesões mamárias de mulheres estão relacionadas às dificuldades de aplicação dos critérios de avaliação estabelecidos, bem como a variação entre os patologistas no uso e interpretação desses critérios e, o mais importante, na natureza heterogênea dos casos.

Um estudo foi desenvolvido para avaliar a concordância entre os diagnósticos histopatológicos conferidos por diferentes patologistas para a classificação do câncer de mama de mulheres. Nessa comparação, não foi observada 100% de concordância entre o laudo original e o pós-revisão das lesões. A maior concordância diagnóstica foi observada nos casos de carcinoma invasivo (81%) e as maiores discordâncias nos casos de carcinoma ductal *in situ* com microinvasão (74%), carcinoma/neoplasia lobular *in situ* (70%) e hiperplasias epiteliais atípicas (61%) (SALLES et al., 2008).

Boisen et al. (2000) verificaram a reprodutibilidade do sistema de graduação histológica para câncer de mama invasivo entre diferentes laboratórios de patologia. Em 31% dos casos o mesmo grau histológico foi obtido para todos os laboratórios o que indicou reprodutibilidade moderada.

Outro aspecto importante que deve ser considerado é a falha desse exame em justificar possíveis diferenças na evolução do câncer em pacientes com o mesmo estadiamento, subtipo e graduação histológica. Isso acontece pelo fato das classificações existentes e em vigor, em especial na medicina veterinária, considerarem apenas o valor descritivo da morfologia das células. Essa limitação diminui novas possibilidades de modalidades terapêuticas, o que pode repercutir na sobrevida global dos pacientes (ZUCCARI et al., 2008).

2.2.5.2 Classificação Fenotípica

Conforme já salientado, a heterogeneidade do câncer mamário é um importante desafio enfrentado pelos patologistas e oncologistas, pois as classificações e graduações histopatológicas são incapazes de prever a evolução da doença e a resposta ao tratamento, em especial nos tumores com os mesmos subtipos histológicos, estadios e graduação (PUSZTAI et al., 2006; CINTRA et al., 2012).

Uma das técnicas mais utilizadas e há mais tempo executada para a determinação molecular do câncer de mama é a imuno-histoquímica (IHQ). O uso dos imunomarcadores prognósticos e preditivos RE, RP e HER2 para classificação fenotípica de câncer de mama em mulheres já está bem definido. O perfil da expressão proteica obtido por essa técnica é valorizado na rotina oncológica, pois além de estabelecer os diferentes perfis já caracterizados, é a técnica de menor custo para tal objetivo.

Na pesquisa, a união da IHQ com o emprego do arranjo em matriz de amostras teciduais, ou *tissue microarray* (TMA), tem facilitado a investigação das alterações moleculares nas doenças neoplásicas. O TMA permite a avaliação molecular em larga escala de diferentes amostras de tecidos ao mesmo tempo, de forma rápida e com menor custo. Outra vantagem associada a esse método é a uniformidade dos ensaios, visto que as amostras analisadas estão sendo submetidas às mesmas condições (KALLIONIEMI et al., 2001, VIEIRA et al., 2007; JAWAR, 2009).

No processo de confecção do TMA, é construído um bloco de parafina com fragmentos cilíndricos de amostras normais ou neoplásicas obtidos de dezenas ou centenas de blocos originais (ANDRADE et al., 2007).

Sarli et al. (2015) realizaram um estudo para a detecção dos perfis fenotípicos em tumores mamários de cães e gatos por IHQ, comparando a técnica do TMA aos cortes completos de cada amostra. Concluíram que o TMA foi capaz de preservar o perfil molecular dos cânceres estudados, sendo uma ferramenta útil e barata para a triagem dos neoplasmas nessas espécies.

Diante do exposto, a classificação prognóstica atual para mulheres portadoras de câncer de mama considera, além dos subtipos histológicos, os subtipos moleculares (PEROU, 2011), caracterizados nos seguintes fenótipos:

- Luminal A : RE+ e/ou RP+, HER2-;
- Luminal B: RE+ e/ou RP+, HER2+;
- Basal like: RE- e/ou RP-, HER2-, citoqueratina 5/6⁺ e/ou HER1⁺;
- HER2 superexpresso: RE- e/ou RP-, HER2+.

Esses subtipos moleculares apresentam comportamentos distintos relacionados com a sobrevivência, prognóstico e resposta à terapêutica específica. O subtipo luminal A tem baixa taxa de proliferação e são acompanhados de um bom prognóstico. Os luminais B têm alta taxa de proliferação e um prognóstico mais pobre que o luminal A. Portanto, o padrão de detecção do HER2 e dos receptores hormonais, RE e RP, são fatores prognósticos e preditivos que foram incorporados à rotina clínica e permitem que se estabeleça um tratamento individualizado (HSIAO et al., 2010). A imunexpressão do RE e RP, por exemplo, está associada ao melhor prognóstico da doença (DUFFY, O'DONOVAN E CROWN, 2011). O HER2 tem expressão alterada em aproximadamente 10-15 % dos casos. Essa alteração está diretamente associada com o pior prognóstico, resistência à quimioterapia e terapia hormonal e aumento da proliferação celular (JUKKOLA et al., 2001).

A análise da expressão genômica dos tumores, como o microarranjo de cDNA, ou cDNA *microarray*, é uma ferramenta diagnóstica importante para a identificação de novos e melhores marcadores clínicos, pois auxilia a determinar os padrões moleculares das neoplasias (VIEIRA et al., 2007; PEROU et al., 2011). Na pesquisa oncológica, os microarranjos podem ser usados para inúmeras propostas, sendo que uma das principais aplicações é a identificação de genes que podem estar associados ao desenvolvimento de um tipo de câncer específico (COLOMBO & RAHAL, 2010).

Com o advento de técnicas que viabilizam o mapeamento das expressões genéticas de tecidos, como o microarranjo, foi possível a detecção de diferentes perfis de neoplasias da glândula mamária em mulheres. Os estudos pioneiros foram realizados pelos grupos de Perou et al. (1999; 2000) e Sorlie et al. (2001; 2003), os quais mostraram que os carcinomas mamários de mulheres poderiam ser

classificados em subtipos específicos segundo o perfil de expressão gênica. Após uma década, estudos recentes confirmaram a existência de dez fenótipos diferentes para a doença. O que se pretende com o avanço da biologia molecular nesse âmbito é, sobretudo, a obtenção de modelos de expressões gênicas que concedam informações preditivas mais seguras, eficazes e personalizadas para tratamento do câncer de mama (DOWNSON et al., 2013).

A tecnologia do microarranjo consiste na utilização de uma matriz sólida onde as sondas, que constituem as amostras de DNA, foram imobilizadas em quantidades e posições definidas. A partir disso, permite-se a hibridização dessas sondas com um *pool* de mRNAs extraídos de amostras biológicas, previamente marcados com fluoróforos. Também existe no mercado outro tipo de microarranjo, os de oligonucleotídeos. Estes seguem os mesmos princípios dos microarranjo de cDNA, embora alguns não necessitem de hibridação competitiva com uma amostra de referência (tecido normal) e o nível de expressão é baseado em um modelo algorítmico, ao invés de uma razão direta entre as amostras de tumor e normal (GUINCALINI & TUFIK, 2007).

Estudos em oncologia veterinária, nessa temática, emergem há pouco tempo. Klopfleisch et al. (2011b) avaliou o perfil de expressão gênica do câncer de mama metastático canino. Quando comparado com mamas normais, verificaram 1312 genes diferencialmente expressos no câncer de mama metastático. Um número significativo de genes envolvidos com a divisão celular e com a invasão da matrix extracelular estavam superexpressos, dentre eles: MMP, SERPINE1, TIMP3. Muitos outros, pouco expressos, associavam-se ao mecanismo de diferenciação epitelial (EGF, EGFR, MAP2K6, SATAT5), adesão celular (CLDN5, CTNNAL1, MUC1, PECAM1) e angiogênese (ANGPT 2, ANGPTL1-4, FIGF, TIE 1).

Pawłowski et al. (2013a) afirmaram que a classificação histopatológica e molecular de neoplasmas mamários de cadelas não são semelhantes e que, por isso, devem ser usadas de forma complementar. O grupo verificou que o método de pontuação da neoplasia em graus (I, II e III) não permite estabelecer o verdadeiro prognóstico da doença, visto que ao avaliarem a expressão gênica dos tumores segundo esse método, os resultados obtidos não foram uniformes. Ou seja, o perfil obtido variou entre as amostras com mesmo escore.

Além da capacidade de averiguar as assinaturas genéticas dos diferentes tipos de câncer de mama, o microarranjo também permite a avaliação de genes candidatos à marcadores para a doença. Pawłowski et al. (2013b) analisaram a expressão gênica de carcinomas mamários caninos classificados em diferentes graus de malignidade (I, II e III). A partir dos dados obtidos, selecionaram cinco genes (*sehr1*, *zfp37*, *mipep*, *relaxina* e *magi3*) capazes de predizerem a agressividade da neoplasia. Os autores concluíram que o aumento da expressão desses genes está associado a maior malignidade e que, dessa forma, podem ser utilizados como marcadores para o prognóstico do câncer de mama em cães.

2.2.6. Estadiamento

O estadiamento é fundamental para o manejo adequado do câncer de mama em cadelas. Além de avaliar a extensão da doença no organismo do hospedeiro, auxilia na seleção da terapêutica, na previsão das complicações, na avaliação dos resultados do tratamento instituído e na inferência de um prognóstico (BETZ et al., 2012).

Em animais, o sistema TNM (tumor, linfonodo e metástase) proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o câncer de mama de cadelas caracteriza cinco estágios, os quais estão descritos na tabela 4. É importante salientar que esse sistema de estadiamento pode ser aplicado para cães portadores de neoplasmas epiteliais (não inflamatórios) e não para sarcomas (SORENMO et al., 2011).

Tabela 4: Classificação TNM para neoplasias mamárias de cadelas.

Estágio	T	N	M
I	1	0	0
II	2	0	0
III	3	0	0
IV	*qqT	1	0
V	qqT	qqN	1

T: tumor primário (T1: < 3 cm de diâmetro, T2: 3-5 cm de diâmetro, T3: > 5 cm de diâmetro); **N: condição do linfonodo regional** (N0: sem metástase, N1: com metástase); **M: metástase à distância** (M0: ausente, M1 : presente). *qq= qualquer.
 Fonte: DE NARDI et al. (2009).

2.2.7. Tratamento

A conduta terapêutica de eleição para as neoplasias mamárias em cadelas é a ressecção cirúrgica, especialmente para pacientes que não apresentam metástases à distância (LANA et al., 2007). A ressecção dos tumores permite o diagnóstico histopatológico e, em alguns casos, pode ser curativa, quando as margens cirúrgicas não estão comprometidas e não há evidências de focos neoplásicos secundários (HEDLUND, 2005). Na tentativa de definir a melhor opção cirúrgica, MacEwen et al. (1995) avaliaram a taxa de recorrência tumoral e o tempo livre de doença em cadelas submetidas à diferentes tipos de mastectomias (regional e radical). Os autores não observaram diferença significativa em relação às variáveis testadas nos grupos avaliados. Todavia, em contraste com tais resultados, um estudo prospectivo com 99 pacientes mostrou que 58% das cadelas desenvolveram um novo tumor nas glândulas mamárias remanescentes da cadeia ipsilateral após a mastectomia regional (STRATMANN et al., 2008).

A quimioterapia antineoplásica é indicada quando há invasão das células neoplásicas em vasos linfáticos e/ou sanguíneos, metástases nos linfonodos

regionais e em tumores com prognósticos desfavoráveis (DE NARDI et al., 2009). É amplamente utilizada como terapia adjuvante para o controle da forma microscópica da doença quando presente (SORENMO et al., 2011). Entretanto, há informações limitadas sobre a eficácia dessa modalidade na literatura veterinária (CASSALI et al., 2011). Além disso, pacientes com metástases à distância podem se beneficiar com o uso da quimioterapia, apesar de ser considerada uma medida paliativa, ao proporcionar o aumento da sobrevida (SLEECKX et al., 2011).

2.2.8 Prognóstico

Fatores prognósticos são características clínicas, patológicas e/ou biológicas específicas dos neoplasmas e seus hospedeiros que permitem a previsão da evolução clínica da doença, da sobrevida dos pacientes e da conduta terapêutica personalizada (ABREU & KOIFMAN, 2002; CASSALI et al., 2013).

Na literatura, os fatores prognósticos mais utilizados para ajudar a determinar o curso de evolução do câncer de mama em cadelas baseiam-se nos achados clínicos e histopatológicos. Dessa forma, o sistema de classificação TNM é de fundamental importância, pois envolve a caracterização clínica da enfermidade quanto ao tamanho do tumor, ao status do linfonodo sentinela e à presença de metástase à distância. A associação dessas informações determinam cinco estágios que podem estar relacionados a prognósticos distintos. De forma geral, tumores grandes (com mensurações superiores a cinco centímetros) e a presença de metástases estão relacionados a um prognóstico reservado (SORENMO et al., 2011; CASSALI et al., 2011).

Segundo Cassali et al. (2013) a classificação histopatológica é a melhor ferramenta para determinar o comportamento biológico das lesões mamárias, pois a avaliação da arquitetura tumoral, da morfologia celular e dos graus histológicos (I, II e III) auxiliam na determinação da agressividade do câncer de mama e, a partir dos achados, possibilita na inferência de um prognóstico.

Em virtude da heterogeneidade tumoral e do amplo espectro de raças que podem ser acometidas pelo câncer de mama (miniaturas a gigantes), os parâmetros

acima citados, em especial o tamanho do tumor e a classificação histológica, geram muitas especulações e falta de consenso, sobretudo em pacientes com mesmo estadiamento da doença. Diante disso, as avaliações moleculares tentam driblar esse viés e, assim, garantir uma previsão mais acurada dos prognósticos da doença. Dentre os marcadores mais usados, pode-se citar o RE e o RP, usados para verificar a diferenciação celular, logo neoplasmas que expressam os receptores hormonais apresentam prognóstico favorável; o Ki67, um marcador de proliferação celular; ciclooxigenase-2 (COX-2), uma enzima relacionada à progressão neoplásica, e E-caderina, um marcador da EMT (SORENMO et al., 2013; CASSALI et al., 2013).

3. Objetivos

3.1 Geral

O estudo pretendeu definir uma classificação fenotípica para o câncer de mama de cadelas com marcadores imuno-histoquímicos a partir do perfil estabelecido para a doença em mulheres, associando-a a novos marcadores. Além disso, realizar um estudo para a determinação da expressão gênica dos fenótipos obtidos na classificação fenotípica, bem como da expressão gênica global dos carcinomas mamários de cadelas em busca de marcadores diagnósticos e prognósticos.

3.2 Específicos

- 1- Verificar por imuno-histoquímica a expressão dos marcadores tumorais celulares RE, RP, HER2 e E-caderina, claudina 1, claudina 3, claudina 4 e claudina 7, CD24 e CD44 em células neoplásicas de mamas caninas.
- 2- Classificar o câncer de mama canino em luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e triplo negativo e avaliar a progressão da doença nesses fenótipos para a determinação do prognóstico.
- 3- Identificar genes diferencialmente expressos entre os subtipos fenotípicos moleculares do câncer de mama canino (luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e triplo negativo) pela técnica de microarranjo.
- 4- Verificar o perfil global da expressão gênica dos carcinomas mamários de cadelas pela técnica de microarranjo.
- 5- Indicar novos genes como potenciais marcadores diagnóstico e prognósticos para o câncer de mama em cadelas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi dividido em duas etapas e estão representadas na figura 5.

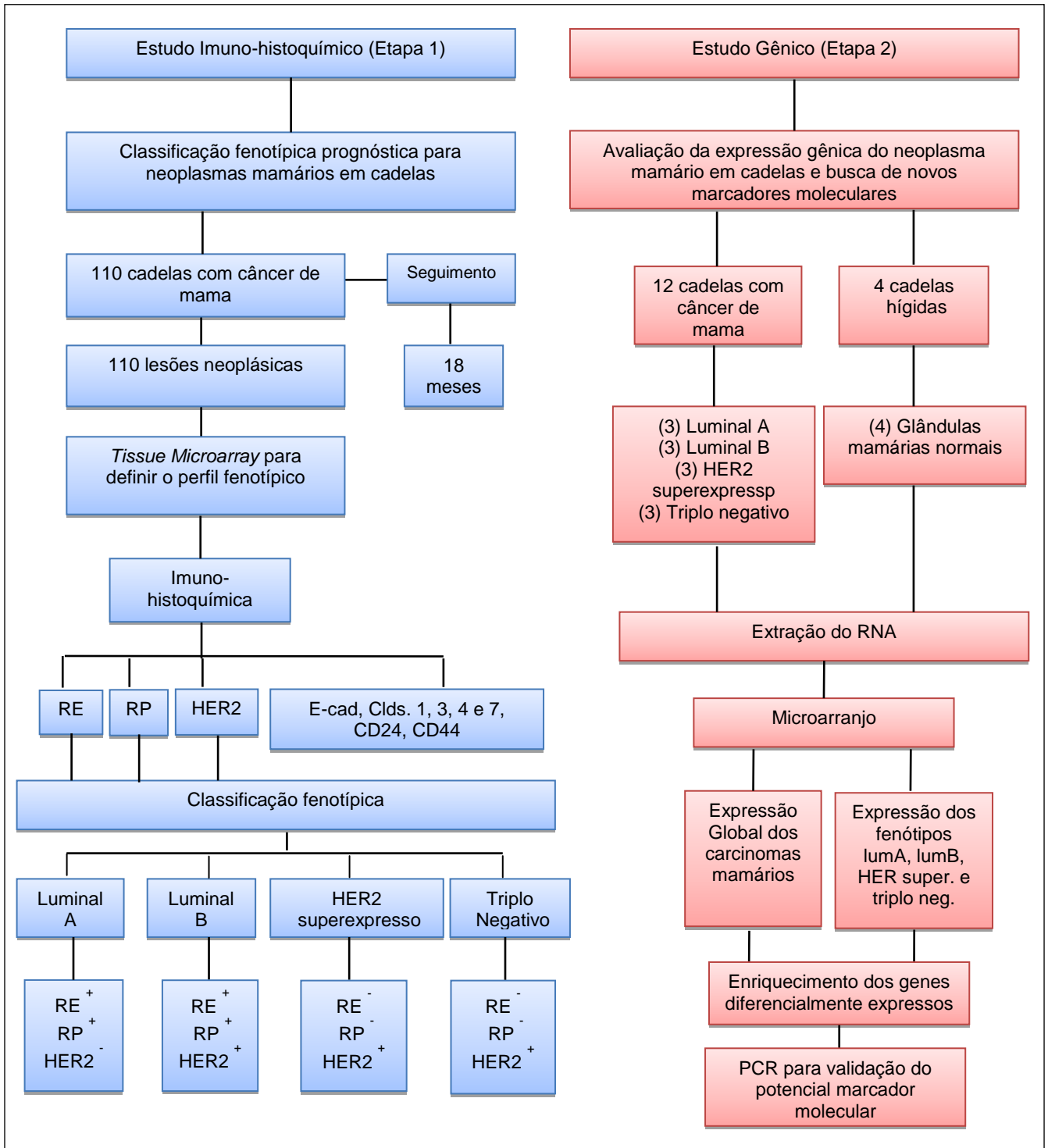


Figura 5: Fluxograma das atividades experimentais desenvolvidas no estudo.

4.2 Etapa 1

4.2.1 Grupo Experimental 1

As amostras foram colhidas de 110 cadelas adultas, de diferentes raças e idades, acometidas por câncer de mama e atendidas no setor de Obstetrícia e Reprodução do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, SP, Brasil, bem como em clínicas veterinárias parceiras da cidade de São José do Rio Preto, SP, Brasil. Nas pacientes portadoras de múltiplas lesões, foi selecionado o tumor com o subtipo histológico mais agressivo (carcinossarcomas, carcinomas anaplásicos, carcinomas micropapilares), seguidos dos carcinomas simples (sólido, tubular, papilar), carcinomas complexos e carcinomas mistos. Além do subtipo histológico, outros critérios foram relevantes para determinar a malignidade dos espécimes, entre eles: pleomorfismo celular e nuclear, índice mitótico, presença de áreas de necrose nos tumores, invasão peritumoral e linfática. O diagnóstico do câncer de mama foi obtido pelos achados clínicos, sobretudo pela análise histopatológica das lesões, as quais foram classificadas segundo Cassali et al. (2011) e nos graus de malignidade I, II e III.

As pacientes foram submetidas à mastectomia radical unilateral e, naquelas com nódulos em ambas as cadeias mamárias, o procedimento cirúrgico foi realizado em momentos diferentes. Os fragmentos tumorais foram colhidos e imediatamente fixados em formol a 10%, após 48 horas em álcool 70% e, na sequência, processados até à inclusão em parafina.

As cadelas foram estadiadas segundo o sistema de classificação TNM proposto pela OMS e acompanhadas durante 18 meses para a avaliação da ocorrência de recidivas e metástases. Não foram incluídas no estudo pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante e/ou adjuvante. Para a caracterização do perfil epidemiológico do grupo experimental, foram avaliadas as raças e as idades das portadoras da doença.

4.2.2 Tissue Microarray - TMA

A área com maior critério de malignidade das amostras incluídas no bloco doador foi selecionada para compor o TMA. Essa região foi delimitada por um patologista veterinário. As biopsias dos blocos doadores foram efetuadas com agulhas de 1,2 mm de diâmetro, nas áreas previamente marcadas, e os fragmentos cilíndricos foram depositados no bloco de parafina receptor. A figura 6 demonstra a técnica de TMA aplicada no estudo.

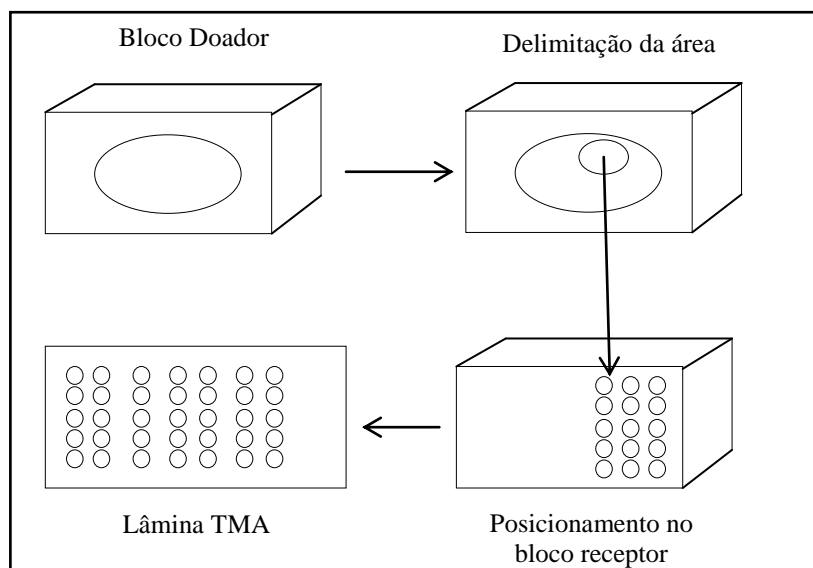


Figura 6: Esquema da técnica TMA. Após prévia revisão das lâminas originais e seleção das áreas de interesse para o estudo, faz-se a demarcação nos blocos de parafina arquivados (bloco doador). Em seguida, um cilindro de tecido é retirado do bloco doador com o auxílio de uma agulha acoplada a um equipamento de precisão. Após, esse fragmento cilíndrico é introduzido em um novo bloco (bloco receptor). Os cilindros de várias amostras são sucessivamente adicionados no bloco receptor e a posição de cada caso é identificada em uma planilha. Adaptado de JAWAR, 2009.

4.2.3 Imuno-histoquímica – IHC

Para avaliar a expressão proteica dos marcadores de ER, PR, HER2 e E-caderina, claudinas (1, 3, 4, 7), CD24 e CD44 nas amostras de neoplasias mamárias de cadelas foi realizada a técnica de imuno-histoquímica. A imunorreatividade dos anticorpos anti-ER, anti-PR e anti-HER2 foram asseguradas pela técnica de Western Blotting. As lâminas foram incubadas por 30 minutos com peróxido de hidrogênio a 3%, lavadas com PBS* (3x 5') e novamente incubadas por 30 minutos na panela a vapor (Arno®) com tampão citrato (pH = 6,0). Após estabilizar a temperatura de 30°C, adicionou-se a solução de bloqueio para proteínas inespecíficas (Biocare®) por 5 minutos e os anticorpos primários de cada proteína foram incubados a 4°C, *overnight* durante 15 horas (Tabela 5). Na sequência, as lâminas foram lavadas em tampão PBS (3x 5') e incubadas com o anticorpo secundário por 20 minutos e com o anticorpo terciário por 10 minutos (kit STARR TREK Universal HRP Detection - Medical BioCare). A revelação foi realizada com substrato cromogênico (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride – DAB) (Medical BioCare) e a contra coloração com Hematoxilina de Harris por 40 segundos. A montagem das lâminas foi realizada em meio Entellan (Merck®). Todas as baterias de lâminas foram acompanhadas de um controle positivo para o anticorpo testado e um controle negativo, o qual foi feito pela exclusão do anticorpo primário.

Tabela 5. Anticorpos primários utilizados na técnica de imuno-histoquímica e suas respectivas especificações.

Anticorpo	Marca	Clone	Diluição	Marcação
E-caderina	BD	36/Ecad	1:2000	Membrana plasmática
RE	Santa Cruz	1D5	1:150	Nuclear e citoplasmática
RP	Abcam	SP42	1:400	Nuclear e citoplasmática
HER2/neu	Santa Cruz	C18	1:800	Membrana plasmática
Claudina 1	Zymed	-	1:50	Membrana plasmática
Claudina 3	Abcam	-	1:500	Membrana plasmática
Claudina 4	Abcam	-	1:700	Membrana plasmática
Claudina 7	Abcam	-	1:600	Membrana plasmática
CD24	Milipore	SN3	1:250	Membrana plasmática
CD44	Calbiochem	A020	1:250	Membrana plasmática

4.2.4 Análise e Interpretação da Imuno-histoquímica

A avaliação da expressão proteica obtida pela técnica de IHC foi embasada no método semi-quantitativo. Para tanto, foram selecionados quatro campos aleatórios de cada amostra, situados na lâmina TMA, para o arquivo fotográfico. As lâminas foram previamente escaneadas pelo equipamento *Pannoramic Digital Slide Scanner* (3DHISTECH®). As imagens foram obtidas em aumento de 40 X pelo software *Pannoramic Viewer* (3DHISTECH®).

Para os receptores de estrógeno e progesterona foi utilizado o índice de pontuação proposto por Allred et al. (1998). A pontuação final foi calculada conforme a quantidade de células marcadas e a intensidade de coloração. As pontuações variam entre 0 a 1 (negativo) ou 2 a 8 (positivo). O resultado final é conferido pela soma entre a percentagem (quantidade) de células marcadas (0 = ausência de marcação, 1 = marcação <1% das células, 2 = 1% a 10% , 3 = 10% a 33%, 4 = 33% a 66%, e 5 = 66% a 100%) e a intensidade de marcação (ausente = 0, fraco = 1, moderado = 2, e forte = 3)

Já para o marcador HER-2/neu foi utilizado o método semi-quantitativo descrito por Koeppen et al. (2001). A pontuação final da expressão também foi baseada na quantidade de células marcadas e na intensidade da marcação. Os critérios utilizados para a pontuação foram: 0 = nenhuma marcação; + 1 = fraco (marcação incompleta das membranas citoplasmáticas), + 2 = moderada (marcação completa das membranas citoplasmáticas em pelo menos 10% de células tumorais) e + 3 = forte (marcação completa das membranas citoplasmáticas em pelo menos 10% das células tumorais). Os resultados obtidos entre 0 ou 1+ foram consideradas negativos, enquanto que as pontuações + 2 ou + 3 foram consideradas positivas.

A expressão de E-caderina foi realizada utilizando a escala IRS modificada de acordo com Remmele e Stegner (1987). O método semi-quantitativo considera tanto a proporção de células marcadas quanto a intensidade da coloração. O resultado final é obtido por meio da multiplicação entre a quantidade e a intensidade. Assim, a pontuação final pode variar de 0 a 12 pontos, nas quais: (-) = zero pontos, ausência

de reação; (+) = 1-2 pontos, reação positiva fraca; (++) = 3-4 pontos, reação positiva moderada; (+++) = 6 -12 pontos, reação positiva forte.

A expressão das claudinas 1, 3, 4 e 7 considerou a quantidade de células marcadas e a intensidade da coloração conforme Hsuesh et al. (2010). A graduação usada para determinar a intensidade da marcação foi (0) ausente, (1+) fraco, (2+) moderado e (3+) forte. A percentagem de células marcadas foi: (1) menos que 10%, (2+) positividade entre 10% a 50% e (3+) mais que 50%. A pontuação final foi dada pela multiplicação entre os dois escores, a qual varia entre 0 a 9.

A expressão dos marcadores CD24 e CD44 foi avaliada conforme o método descrito por Magalhães et al. (2013). Para a quantidade de células imunomarcadas foram aleatoriamente selecionados quatro campos por corte e foi contado um total de 100 células entre as marcadas e as não marcadas. Os resultados foram expressos em porcentagem de células marcadas.

4.2.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa computacional *Graphpad Prisma 5* (San Diego, CA, USA).

Para a determinação da sobrevida dos subfenótipos luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e triplo negativo foi utilizado o teste de Kaplan Meier. Para a avaliação da imunexpressão da E-caderina nos grupos fenotípicos foi realizado o teste Qui-quadrado em tabela de contigência. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os dados obtidos pela avaliação da expressão das claudinas 1, 3, 4 e 7 nos subfenótipos, bem como os escores de pontuação foram analisados pelo teste ANOVA two-way, seguido pelo teste de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

A determinação da ocorrência das células–tronco tumorais foi realizada pela análise estatística descritiva.

4.3 Etapa 2

4.3.1 Grupo Experimental 2

Para o estudo gênico, foram obtidas outras 12 pacientes caninas fêmeas, adultas, de diferentes raças, e idades, acometidas por neoplasma mamário e atendidas em clínicas veterinárias parceiras situadas na cidade de São José do Rio Preto, SP. A partir destas, foram colhidas, então, mais 12 lesões neoplásicas malignas, as quais foram previamente classificadas por imuno-histoquímica, em luminal A (n=3), luminal B (n=3), HER2 superexpresso (n=3) e triplo negativo (n=3).

As pacientes foram submetidas à mastectomia radical unilateral e, naquelas com nódulos em ambas as cadeias mamárias, o procedimento cirúrgico foi realizado em momentos diferentes. Os fragmentos tumorais foram colhidos e imediatamente fixados em formol a 10%, após 48 horas em álcool 70% e, na sequência, processados até à inclusão em parafina. As amostras de tecido fresco foram preservadas em solução estabilizadora de RNA (RNAlater®) e armazenada a -80 °C para análise molecular. Além disso, foram colhidas quatro amostras de glândulas mamárias normais de cadelas que foram submetidas à ovariectomia eletiva para comporem o grupo controle.

4.3.2 Extração do RNA total das amostras e avaliação da integridade

Para a extração e purificação do RNA total das amostras neoplásicas e normais foi utilizado o RNeasy Mini Kit® (QIAGEN). Um total de 30 mg do tecido foi macerado em 600µL de solução tampão RLT em gelo seco. O lisado obtido foi transferido para um microtubo de 1,5 mL. A amostra foi centrifugada por três minutos em velocidade máxima e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL. Em seguida, foram adicionados 350 µL de etanol 70%, homogeneizando a solução por pipetagem. Foram transferidos 700 µL da amostra para a coluna Rneasy Mini Spin, a qual foi acoplada em um microtubo coletor de 2 mL, e centrifugada por 15 segundos a 10.000 rpm. Foi descartado o conteúdo do tubo coletor e a coluna foi

transferida para um novo microtubo coletor de 2 ml. Em seguida, foi adicionado 700 μ L da solução tampão RW1 e centrifugada por 15 segundos a 10.000 rpm. Novamente, foi descartado o conteúdo do tubo coletor, que foi reutilizado para o próximo passo. Após, foi adicionado 500 μ L de solução tampão RPE na coluna e centrifugada por 15 segundos a 10.000 rpm. Novamente, foi descartado o conteúdo do tubo coletor, que foi reutilizado para o próximo passo. Foi adicionado mais 500 μ L de solução tampão RPE e centrifugada por 2 minutos a 10.000 rpm para secar a membrana de gel sílica. A coluna Rneasy Spin foi transferida para um novo microtubo convencional de 2,0 mL e foi submetida à centrifugação a toda velocidade por um minuto. A coluna foi transferida novamente para um microtubo coletor de 1,5 ml e adicionou-se 30 μ L de água livre de RNase diretamente na membrana para a eluição do RNA. A coluna foi submetida à centrifugação durante um minuto a 10.000 rpm. O RNA extraído e purificado foi estocado a -80°C .

A quantidade e a qualidade do RNA extraído foram avaliadas utilizando-se o equipamento Agilent 2100 Bioanalyser com Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), conforme instruções do fabricante. O protocolo usado para o ensaio está descrito no **APÊNDICE 1**. A quantidade foi expressa em $\text{pg}/\mu\text{L}$ e a qualidade, pelo número de integridade do RNA (NIR). Os números obtidos no teste designam a integridade do RNA (NIR) das amostras foram considerados adequados quando maior que cinco.

4.3.3 Microarranjo

Os ensaios de microarranjos foram realizados com o kit comercial Affymetrix® Canine Gene 1.0 ST Array, GeneChip® WT PLUS Reagent Kit, GeneChip® Hibridização Lave e Stain Kit® e digitalizados pelo equipamento Affymetrix GeneChip 3000 de acordo com as recomendações do fabricante.

De forma resumida, o RNA total inicial de cada amostra foi transcrito em cDNA de cadeia simples e, em seguida, convertido em cDNA de cadeia dupla. Este foi submetido à transcrição *in vitro* para produção de cRNA antisense não marcado e, em seguida, à amplificação. Após a purificação, foi iniciado o segundo ciclo, o

qual sintetizou o cDNA sense por transcrição reversa a partir do cRNA não marcado. Nessa fase, o segundo ciclo, foi incorporado ao cDNA de cadeia simples dUTP. Em seguida, foi purificado e fragmentado com uracil-DNA glicolase (UDG) e apurínica/apirimidina endonuclease 1 (APE 1) nos locais previamente identificados pela dUTP. Os fragmentos foram marcados com deoxinucleotideo transferase (TdT), os quais se associaram por ligação covalente à biotina. Em seguida, as amostras foram hibridizadas com os chips (lâminas do microarray), lavadas, coradas e digitalizadas.

O protocolo detalhado utilizado para a execução da técnica está descrito no **APÊNDICE 2**. Para o ensaio, foram utilizados 100 ng de RNA inicial total extraído de neoplasias mamárias de cadelas.

4.3.4 Técnica de PCR quantitativa (qPCR)

A técnica de PCR quantitativa (qPCR) foi realizada de acordo com Moschetta et al. (2015). A curva padrão foi calculada e as análises para a expressão diferencial do gene HYAL-1 e dos genes controles endógenos RPS19 e RPL8, os quais foram padronizados previamente por Moschetta et al. (2015), foram realizadas em triplicatas utilizando o sistema StepOnePlus (Applied Biosystems) e o Master mix TaqMan Universal Master (Applied Biosystems) conforme as recomendações do fabricante. O mix de cada gene foi preparado adicionando-se 10 µL de Master Mix, 1 µL de TaqMan Gene Expression e 8 µL de água DEPC. Em seguida, 19 µL da solução final foram pipetadas em cada poço de uma placa de 96 poços e adicionou-se 1 µL das amostras de cDNA (100 ng/mL) nos poços, homogeneizando a solução. A placa foi coberta com um adesivo próprio e centrifugada para concentrar o conteúdo no fundo do poço e eliminar as bolhas de ar. O protocolo de amplificação usado no estudo foi: 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 seg e 60°C durante 1 min. A expressão do gene de interesse foi calculada pelo método de quantificação em relação à média dos genes controles endógeno ($\Delta\Delta Ct$).

4.3.5 Análise Estatística do Microarranjo

Com a finalidade de identificar os genes diferencialmente expressos, os dados de expressão das amostras carcinoma e normais foram comparadas entre si. A comparação foi feita também para carcinomas com um grupo heterogêneo e também individualizando os quatro fenótipos. O p-valor foi calculado com a estatística-T moderada e ajustado com o método "Benjamini and Hochberg" para controle de taxa de falsa descoberta. Genes cujo p-valor ajustado foi $\leq 0,05$ foram considerados diferencialmente expressos, mas somente aqueles genes cujo log Fold Change foi ≤ -1 ou ≥ 1 .

4.3.6 Análises de Enriquecimento do Microarranjo

As análises de enriquecimento foram realizadas no programa Web-based Gene Set Analyses Toolkit (WebGestalt) na interface Web e obtidas a partir do banco de dados provenientes da *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG). O p-valor foi calculado com a estatística hipergeométrica e ajustado com o método "Benjamini and Hochberg" para controle de taxa de falsa descoberta. Análises cujo p-valor ajustado foi $\leq 0,05$ foram consideradas significativas.

4.3.7 Análise da expressão do gene HYAL-1 por PCR para validação

O valor da expressão relativa do gene de interesse foi determinado com auxílio do software DataAssist v3.0, pelo método de quantificação em relação à média dos genes normalizadores utilizados como controle endógeno ($\Delta\Delta Ct$) (LIVAK e SCHMITTGEN, 2008.) O resultado foi apresentado em escala logarítmica de base 10 (Log_{10}).

5. RESULTADOS

5.1 Etapa 1

5.1.1 Características Clínicas, Patológicas e Moleculares

A maioria (34,5%) das cadelas diagnosticadas com neoplasia mamária era sem raça definida (SRD). Seguida das raças Poodles (16,1%); Cocker Spaniel e Daschund (8,2%); Boxer e Pinscher miniatura (5,4%), Labrador e York Shire (2,7%); Pitbull, Pastor Alemão, Fox Paulistinha, Maltês, Beagle e Rottweiler (1,8%); Husky Siberiano, Lhasa Apso, Shih Tzu, Akita, Basset Hound e Weimaraner (1%). Todas as pacientes eram idosas (acima de sete anos de idade).

A partir desses animais, foram obtidos 107 carcinomas mamários de cadelas e três carcinossarcomas. Além da classificação histopatológica, as neoplasias também foram classificadas segundo o perfil fenotípico proposto pelo referido estudo em luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e triplo negativo. A tabela 6 mostra a associação entre as classificações.

Tabela 6: Distribuição da classificação fenotípica nos tipos histológicos de tumores mamários caninos.

Neoplasias Mamárias Malignas	Lum. A	Lum. B	HER2 Super.	Triplo Neg.
Carcinomas				
Carcinoma in situ			1	
Carcinoma mamário complexo	12	15	3	5
Carcinoma mamário em tumor misto	9	6		4
Carcinoma mamário indiferenciado			2	
Carcinoma mamário papilar	8	7	1	
Carcinoma mamário sólido	3	6	1	2
Carcinoma mamário tubular	8	4	2	4
Carcinoma mamário inflamatório		1		
Tipos Especiais de Carcinomas				
Carcinoma mamário micropapilar	1	1		
Carcinoma mamário de células escamosas				1
Sarcomas				
Carcinossarcoma	1	1		1

Dessa forma, observou-se que os neoplasmas do grupo luminal foram os mais frequentes (75,5%). O luminal A constitui a maioria das lesões (38,2%), seguido pelo luminal B (37,3%). Já as neoplasias caracterizadas como HER2 superexpresso e triplo negativo foram menos frequentes, sendo que aquela representou 9,1% e esta 15,5%. O padrão de marcação de cada subtipo fenotípico, segundo os anticorpos utilizados (RE, RP e HER2) foram caracterizados na figura 7.

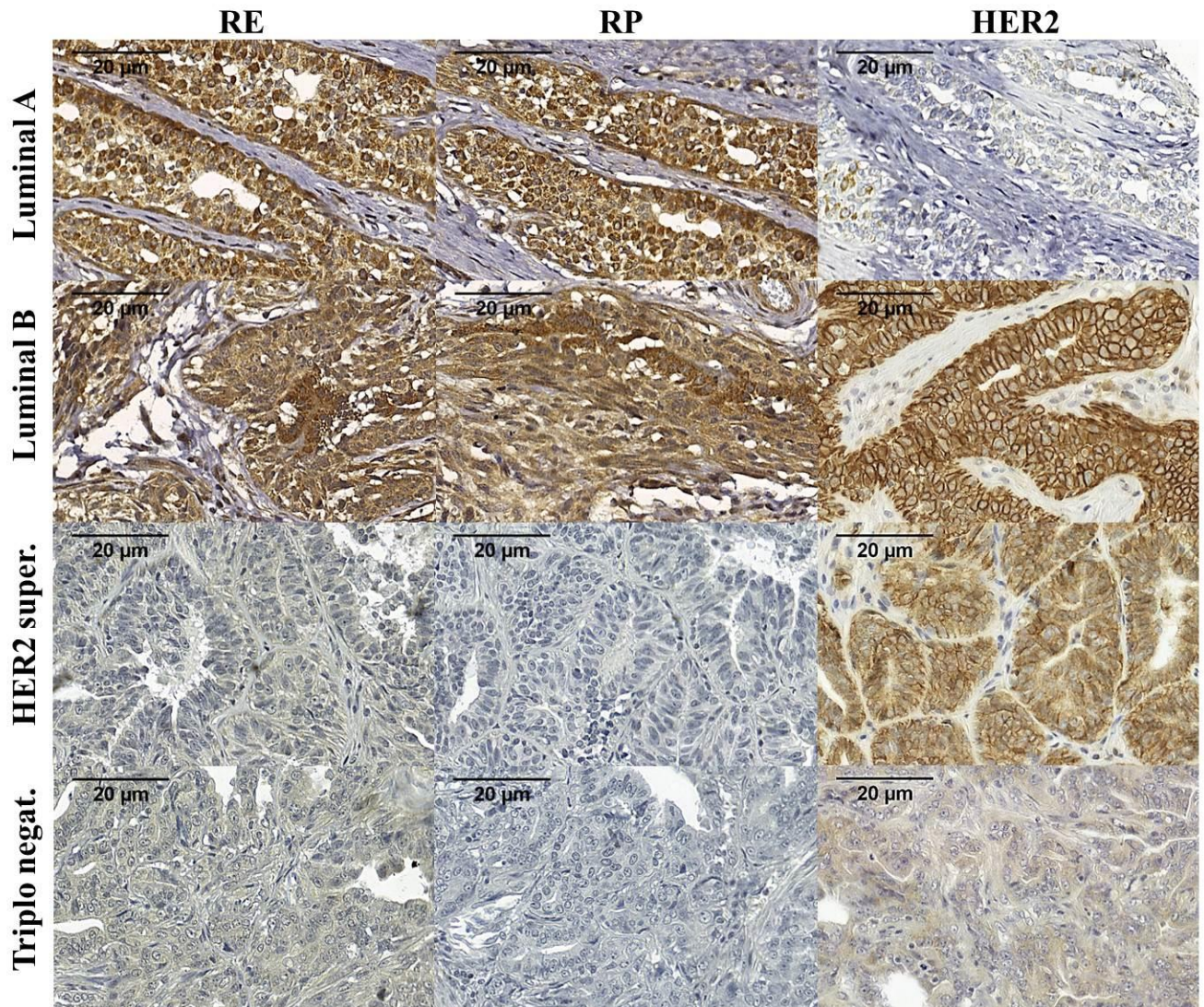


Figura 7. Fotomicrografia dos perfis fenotípicos classificados por marcadores imunohistoquímicos (RE, RP e HER2) em tumores mamários caninos (40x). O padrão de imunomarcagem considerado para o RE e para o RP foi citoplasmático e nuclear. A expressão dessas proteínas foi considerada positiva quando o escore abrangia o intervalo de 2 a 8 pontos. Já o padrão de marcação considerado para o HER2 foi a membrana citoplasmática. A expressão positiva do HER2 foi caracterizada pelos escores 2+ e 3+. O fenótipo luminal A foi classificado por RE+ (escore 8) e/ou RP+ (escore 8) e HER2-. O fenótipo luminal B foi classificado pelo RE+ (escore 8) e/ou RP+ (escore 8) e HER2+ (escore 3+). O HER2 fenótipo superexpresso foi classificado por RE-, RP- e HER2+ (escore 2+). O fenótipo triplo negativo foi classificado por RE-, RP- e HER2-. Cromógeno DAB. Barra de escala = 20 μm. LIMC, São José do Rio Preto, 2016.

5.1.2 Determinação dos prognósticos dos fenótipos

5.1.2.1 Relação dos fenótipos com as características clínico-patológicas

No fenótipo luminal A, observou-se que 14,3% das pacientes apresentaram complicações relacionadas ao câncer, dentre elas: recidiva ou metástase (cutânea ou pulmonar) durante o seguimento de 18 meses. Além disso, nesse grupo, constatou-se que o estadiamento da doença (TNM), na maior parte das cadelas, foi classificado nos estadios I e II (Figura 8A). Já no grupo luminal B, recidivas e metástases (pulmonar e hepática) foram verificadas em 22% das pacientes. Viu-se também que os estadios iniciais da doença (I e II) foram mais frequentes quando comparados com os mais avançados - III, IV e V (Figura 8B).

Em relação às neoplasias caracterizadas como HER2 superexpresso, 80% das pacientes apresentaram metástase cutânea e/ou pulmonar durante o *follow-up*. Além disso, observou-se que em 60% das cadelas apresentaram os estadios III, IV ou V segundo a classificação TNM para a doença (Figura 8C). No fenótipo triplo negativo, 76,4% dos animais apresentaram metástase hepática e/ou pulmonar durante o seguimento. E, quanto ao TNM, em 53% das pacientes, o estadiamento da enfermidade foi determinado nos estágios III, IV e V (Figura 8D).

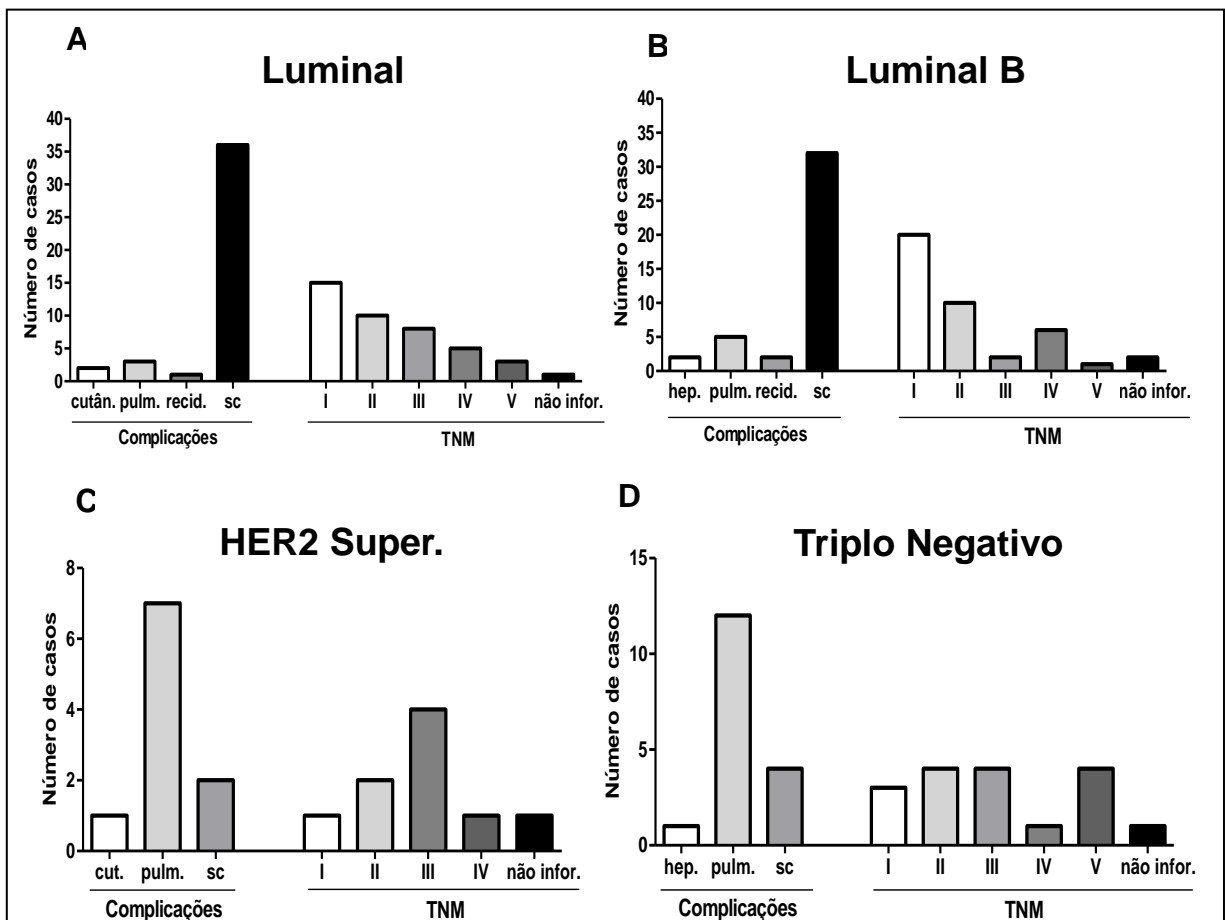


Figura 8: Distribuição das características clinicopatológicas recidiva (recid.), metástase cutânea (cutân.), metástase pulmonar, metástase hepática (hep) e os estádios (I, II, III, IV e V) nos fenótipos luminal A (A), luminal B (B), HER2 superexpresso (C) e triplo negativo (D). As cadelas que não apresentaram complicações relacionadas ao câncer de mama estão representadas pela coluna sc (sem complicações).

5.1.2.2 Fenótipos e sobrevida

Nas neoplasias classificadas de luminal A, constatou-se óbito em três pacientes (7,14%) devido à metástase pulmonar. As demais cadelas (92,8%) permaneceram vivas e sem complicações durante os 18 meses de acompanhamento. Já no luminal B, oito cães (19,5%) morreram em consequência do desenvolvimento de metástases à distância (pulmonar e/ou hepática). Em duas

pacientes (4,8%) houve recidiva doença na cicatriz cirúrgica. Nas demais cadelas desse grupo (75,6%), não se evidenciaram complicações relacionadas ao câncer durante os 18 meses de acompanhamento.

Para os tumores HER2 superexpressos, o tempo médio de sobrevida foi de 167 dias. Sete cães (70%) morreram devido à metástase pulmonar e, para os outros três, não foram detectadas complicações secundárias relacionadas ao câncer mamário. No fenótipo triplo negativo, a sobrevida média foi 274 dias. Três cães (17,6%) não mostraram evidência de complicação da doença e 14 (82,3%) vieram a óbito devido à metástase pulmonar e/ou metástase hepática. A curva de sobrevida de cada fenótipo está representada na figura 9 e a taxa de óbitos na figura 10.

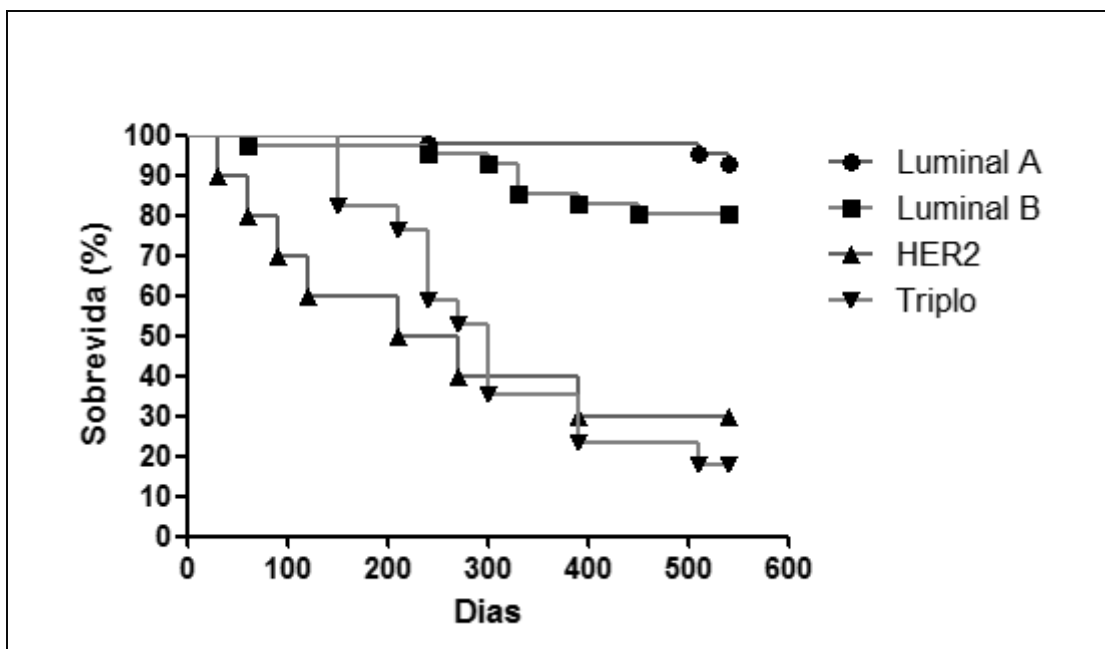


Figura 9: Curva de Kaplan-Meier para determinação da sobrevida dos fenótipos luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e triplo negativo em neoplasias mamárias de cadelas.

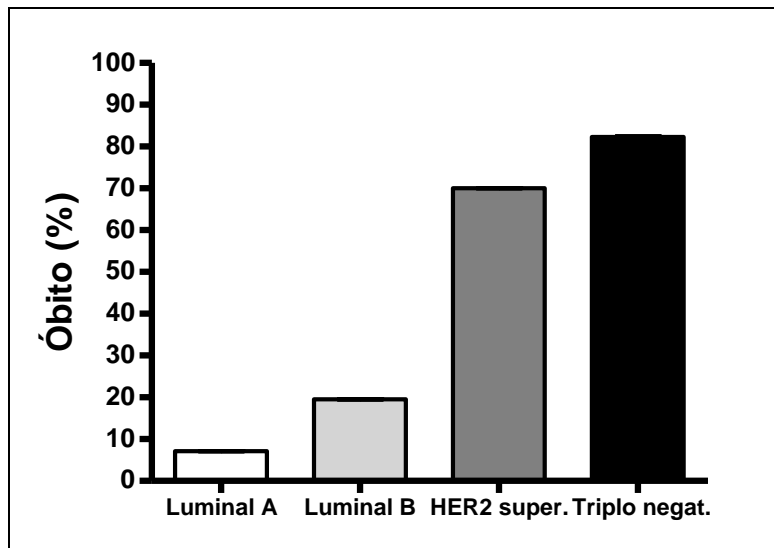


Figura 10: Porcentagem de óbitos das cadelas portadoras de câncer de mama segundo a classificação fenotípica em luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e triplo negativo.

5.1.2.3 Expressão da E-caderina nas neoplasias mamárias de cadelas

A expressão positiva do marcador molecular E-caderina foi observada em 76,4% (n = 84) das neoplasias avaliadas, ao passo que a ausência de marcação foi verificada em 5,24% (n = 21) das amostras. Também foi averiguada a intensidade de marcação exibida nas reações de cada espécime. Diante disso, verificou-se que 15 amostras apresentaram a pontuação uma cruz (+), 52 apresentaram a pontuação duas cruzes (++) e 17 apresentaram a pontuação três cruzes (+++).

O padrão de expressão da E-caderina foi comparado com os grupos fenotípicos avaliados. Observou-se diferença estatística significativa ($p = 0,032$) entre a intensidade de expressão nos quatro perfis (luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e triplo negativo). A figura 11 demonstra a relação entre a intensidade de marcação da E-caderina e os subfenótipos propostos pelo referido estudo. Evidenciou-se que no grupo luminal (A e B) a expressão forte e moderada

foram mais frequentes. Em contrapartida, nos cânceres HER2 superexpresso e triplo negativo, a ausência de marcação foi predominante.

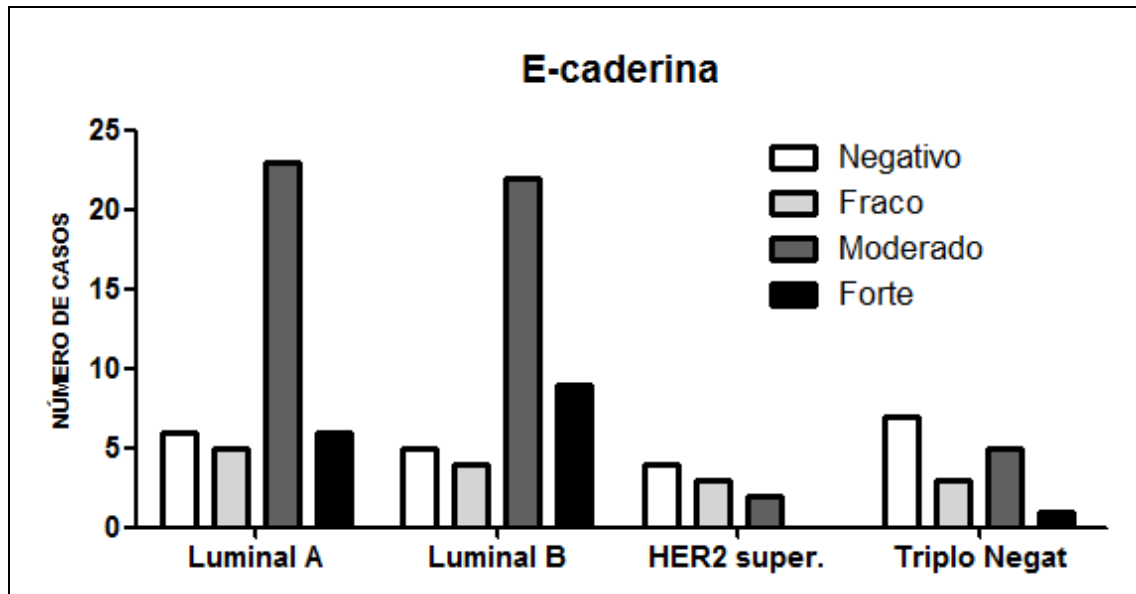


Figura 11: Intensidade da imunopositividade da E-caderina nos fenótipos luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e triplo negativo dos neoplasmas mamários de cadelas. Teste estatístico Chi quadrado ($\chi^2=18,29$; $p=0,032$).

A figura 12 mostra o padrão de marcação da E-caderina nos tecidos neoplásicos e as intensidades de expressão (1+, 2+ e 3+).

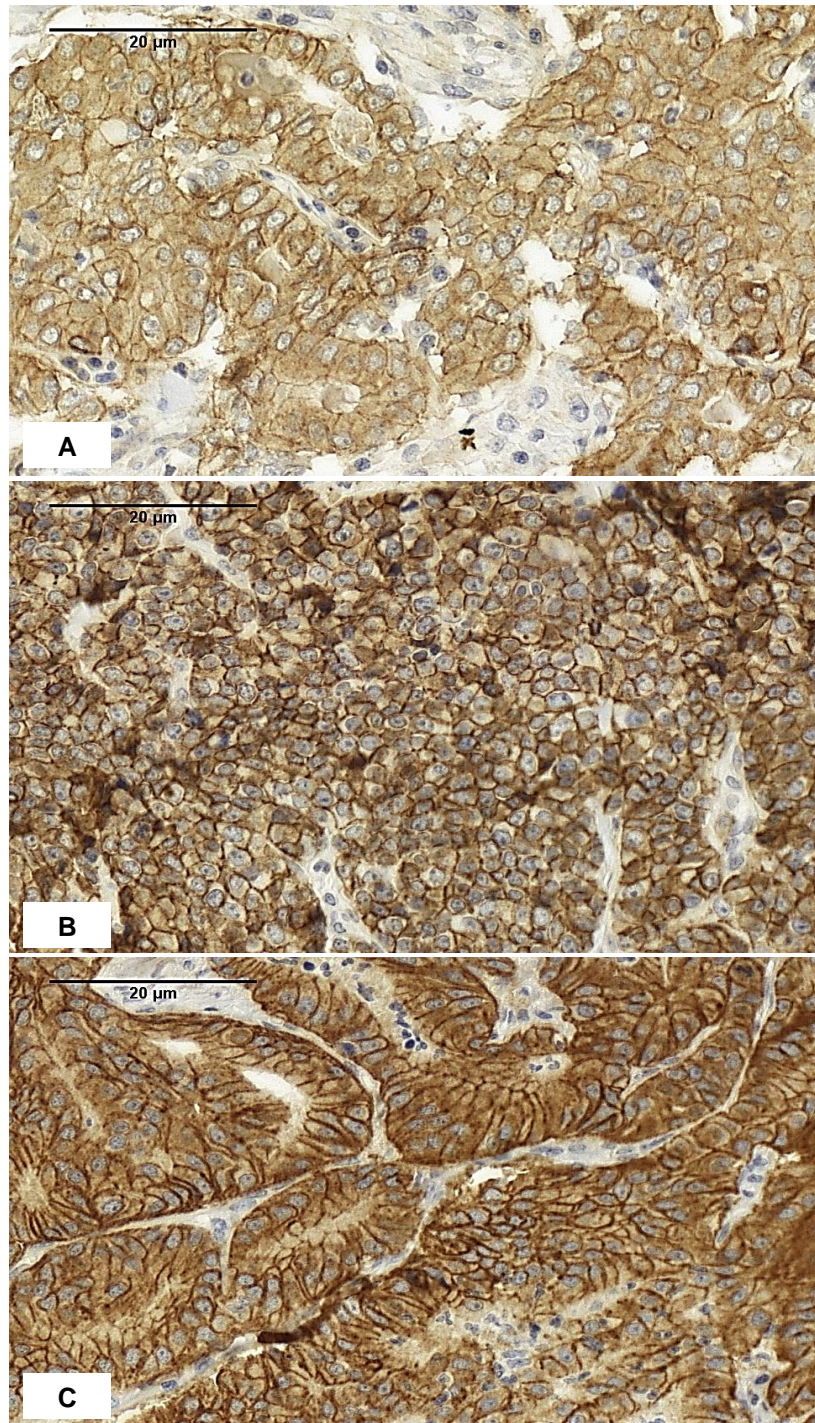


Figura 12: Fotomicrografia da imunopressão da proteína E-caderina em tumores mamários caninos (40x). Em A, verifica-se a intensidade de marcação (1+), em B (2+) e em C (3+). Cromógeno DAB. Barra de escala = 20 µm. LIMC, São José do Rio Preto, 2016.

5.1.2.4 Expressão das claudinas 1, 3, 4 e 7 nas neoplasias mamárias de cadelas

As expressões das claudinas 1, 3, 4 e 7 foram avaliadas nas 110 amostras de neoplasias mamárias das cadelas e estão representadas na figura 13. Observou-se marcação positiva nas membranas celulares da maioria dos neoplasmas das claudinas 1, 3 e 4. Mas, a expressão negativa da claudina 7 foi mais frequente.

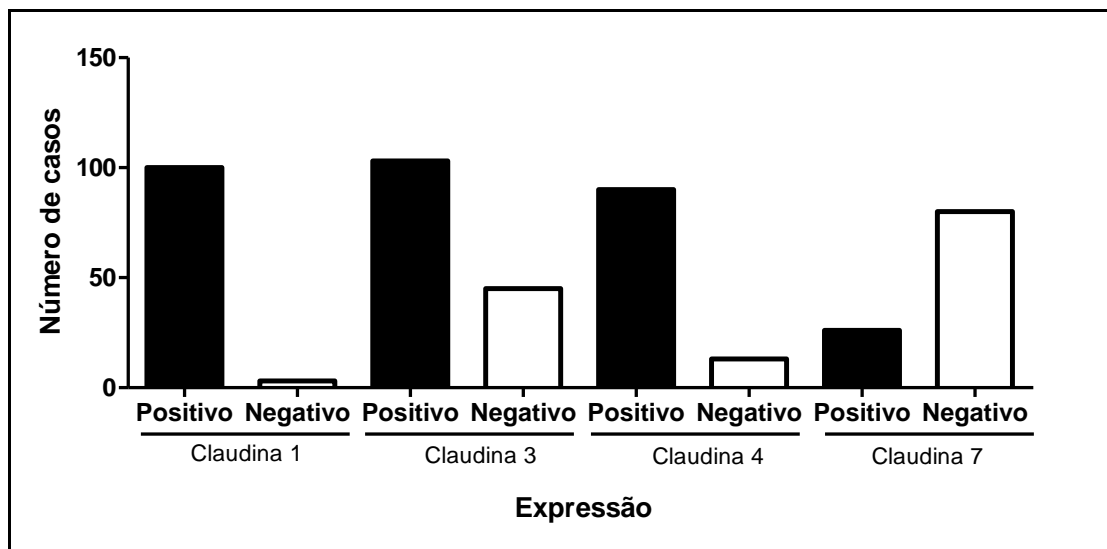


Figura 13: Padrão da marcação (positiva e negativa) das claudinas 1, 3, 4 e 7 nas neoplasias mamárias de cadelas.

Em relação ao escore final da expressão desses marcadores, as claudinas 3 e 7 apresentaram pontuação zero (0) na maioria das neoplasias avaliadas, respectivamente 41% e 73%. Nas claudinas 1 e 4, a pontuação seis (6) foi a mais frequente, 28% e 41%. A figura 14 mostra os escores das claudinas obtidos nas amostras cancerosas do referido estudo.

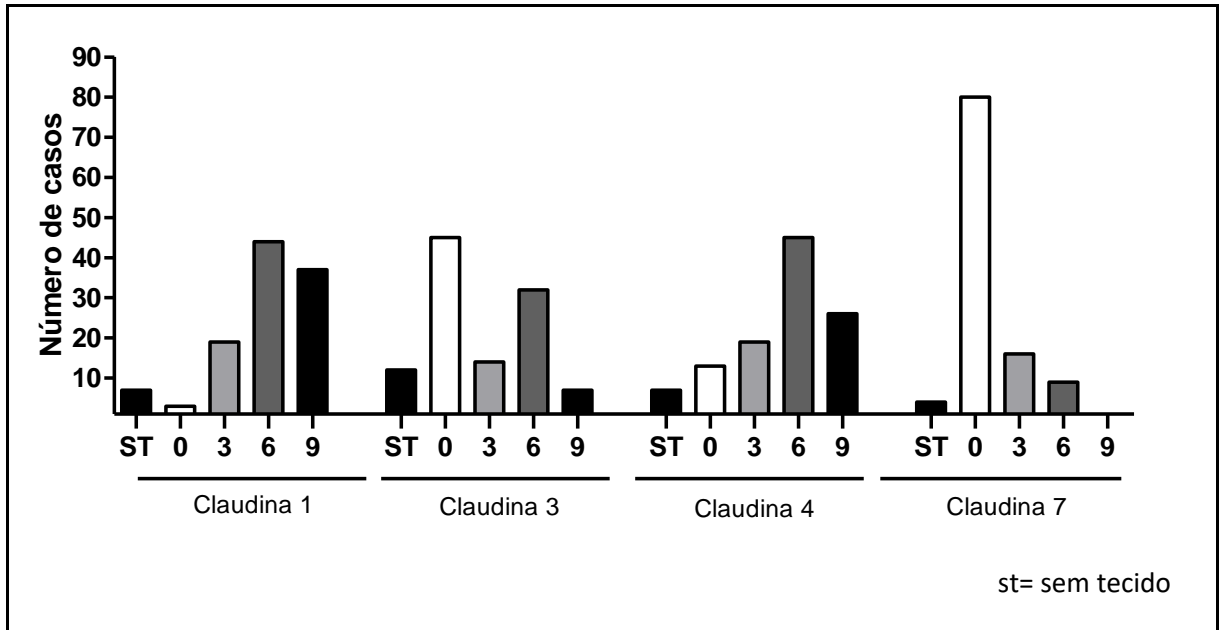


Figura 14: Pontuações (escores) das expressões das claudinas 1, 3, 4 e 7 obtidas após a avaliação da intensidade de marcação e quantidade de células marcadas nas amostras caninas de tumor de mama.

Não houve diferença estatística entre a intensidade de marcação das claudinas 1, 3, 4 e 7 entre os fenótipos luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e triplo negativo pelo teste estatístico two-Way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni ($p > 0,05$).

A figura 15 mostra o padrão de marcação das claudinas 1, 3, 4 e 7 nas neoplasias mamária de cadelas.

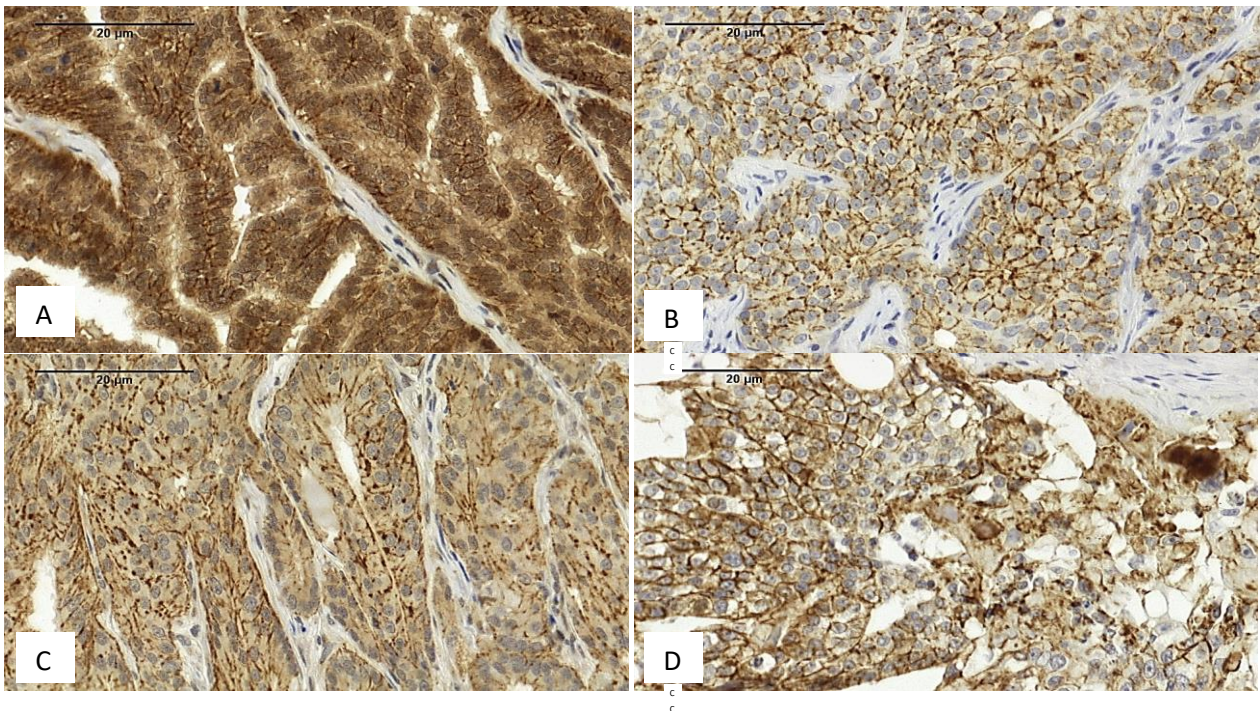


Figura 15: Fotomicrografia da imunoposição das claudinas 1 (A), 3 (B), 4 (C) e 7 (D) em neoplasias mamária de cadelas (40x). Cromógeno DAB. Barra de escala = 20 µm. LIMC, São José do Rio Preto, 2016.

5.1.3 Células-tronco tumorais (CD44+/CD24-)

O fenótipo de células-tronco tumorais foi encontrado em apenas em quatro (4/70) amostras, representando 5,7%. Duas neoplasias do tipo luminal A e duas luminal B foram as que apresentaram a imunoposição (CD44+/CD24-), conforme verificado na figura 16. Uma cadela classificada com câncer luminal B e com presença de CD44+/CD24- apresentou sobrevida global de 240 dias em decorrência de metástase hepática. Nas demais pacientes não foram observadas complicações da doença.

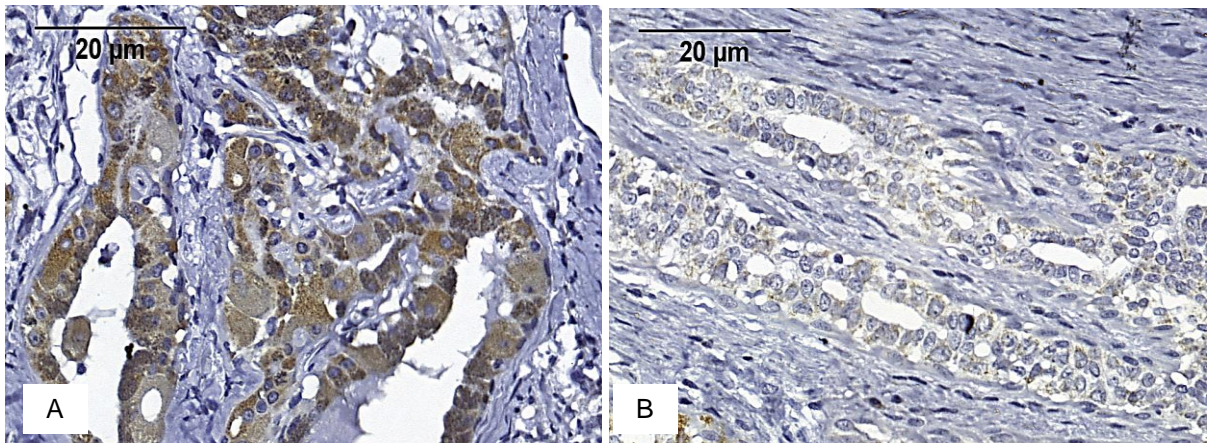


Figura 16: Fotomicrografia da imunoexpressão das proteínas CD44+ (A) e CD24- (B), caracterizando o fenótipo de célula-tronco tumoral em neoplasia mamária canina (40x). Cromógeno DAB. Barra de escala = 20 µm. LIMC, São José do Rio Preto, 2016.

Verificou-se que os graus histológicos II e III estavam associados à ocorrência do fenótipo de células-tronco tumorais, respectivamente (1/4) e (2/4).

5.2 Etapa 2

5.2.1 Características Clínicas, Patológicas e Moleculares

O grupo experimental do estudo gênico foi constituído por 12 cadelas portadoras de carcinomas mamários. Todas eram idosas (acima de sete anos de idade). A tabela 7 reúne as características clínicas, patológicas e moleculares das cadelas que compreenderam o ensaio de expressão gênica pela técnica do microarranjo.

Tabela 7: Características clínicas, patológicas e moleculares das cadelas que constituíram a parcela experimental do estudo gênico.

Fenótipo	TNM	Carcinoma	Recidiva	Metástase	Sobrevida (dias)
Lum A					
Paciente 1	I	Tubular	Não	Não	Viva
Paciente 2	I	Sólido	Não	Não	Viva
Paciente 3	I	Tubular	Não	Não	Viva
Lum B					
Paciente 4	III	Em tumor misto	Sim	Não	Viva
Paciente 5	I	Sólido	Não	Não	Viva
Paciente 6	I	Em tumor misto	Sim	Não	Viva
HER2 super					
Paciente 7	IV	Indiferenciado	Não	Linf/Pulm*	90
Paciente 8	III	Tubular	Não	Pulm/Cutân**	120
Paciente 9	III	Em tumor misto	Não	Pulmonar	210
Triplo neg					
Paciente 10	IV	Sólido	Não	Linf/Pulm	150
Paciente 11	III	Tubular	Não	Pulmonar	240
Paciente 12	III	Sólido	Não	Pulmonar	300

*Linf/Pulm: linfonodo/pulmonar

**Pulm/Cutân: pulmonar/cutânea

5.2.2 Expressão gênica global das neoplasias mamárias de cadelas

A comparação entre a expressão gênica dos fenótipos dos cânceres de mama (luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e triplo negativo) não revelou

variação estatística significativa no referido estudo. Entretanto, observou-se diferença de expressão entre o grupo carcinoma quando comparado com a expressão gênica das amostras normais. A quantidade de genes diferencialmente expressos foi representada na tabela 8.

Tabela 8. Quantidade de genes diferencialmente expressos no grupo carcinoma em relação às amostras. Foram considerados os FC dos genes ≤ -1 e ≥ 1 .

Grupo	Genes +	Genes -
Carcinoma	878	821

A figura 17 representa a dispersão dos genes diferencialmente expressos no carcinoma mamário de cadelas.

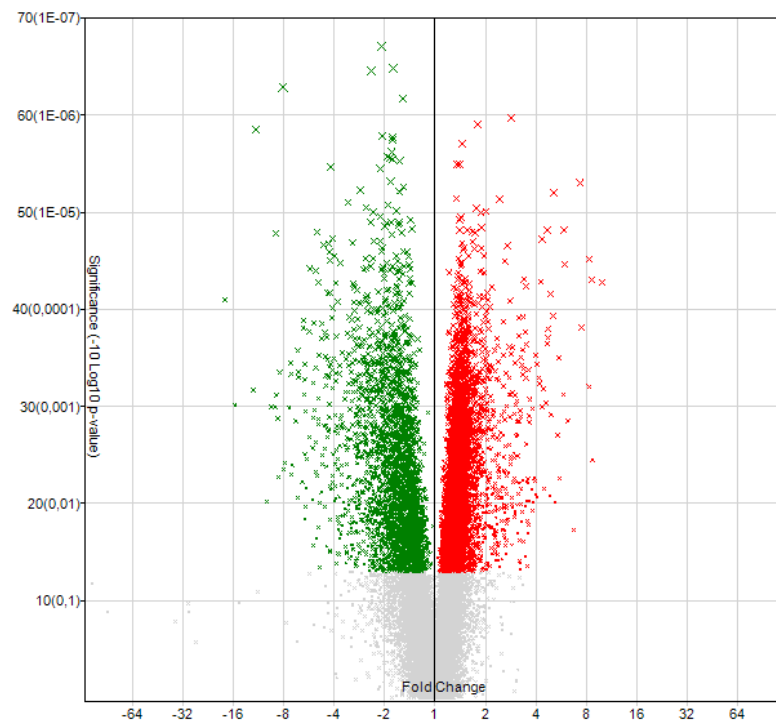


Figura 17: Dispersão dos genes diferencialmente expressos nos carcinomas mamários ($-1 \leq \log_{2}FC \leq 1$) em relação às amostras mamárias normais de cadelas. Caracterizado no eixo x tem-se o valor de p ($-10\log_{10}$) e no eixo y o Fold Change (FC) de cada gene. Os dados representados em vermelho referem-se aos genes regulados positivamente nas amostras neoplásicas, já o verde aos genes regulados negativamente.

5.2.3 Enriquecimento do Microarranjo

5.2.3.1 Genes Regulados Positivamente

A- Função Molecular dos Genes

As funções moleculares dos genes superexpressos nos carcinomas mamários em cadelas estão representadas na figura 18.

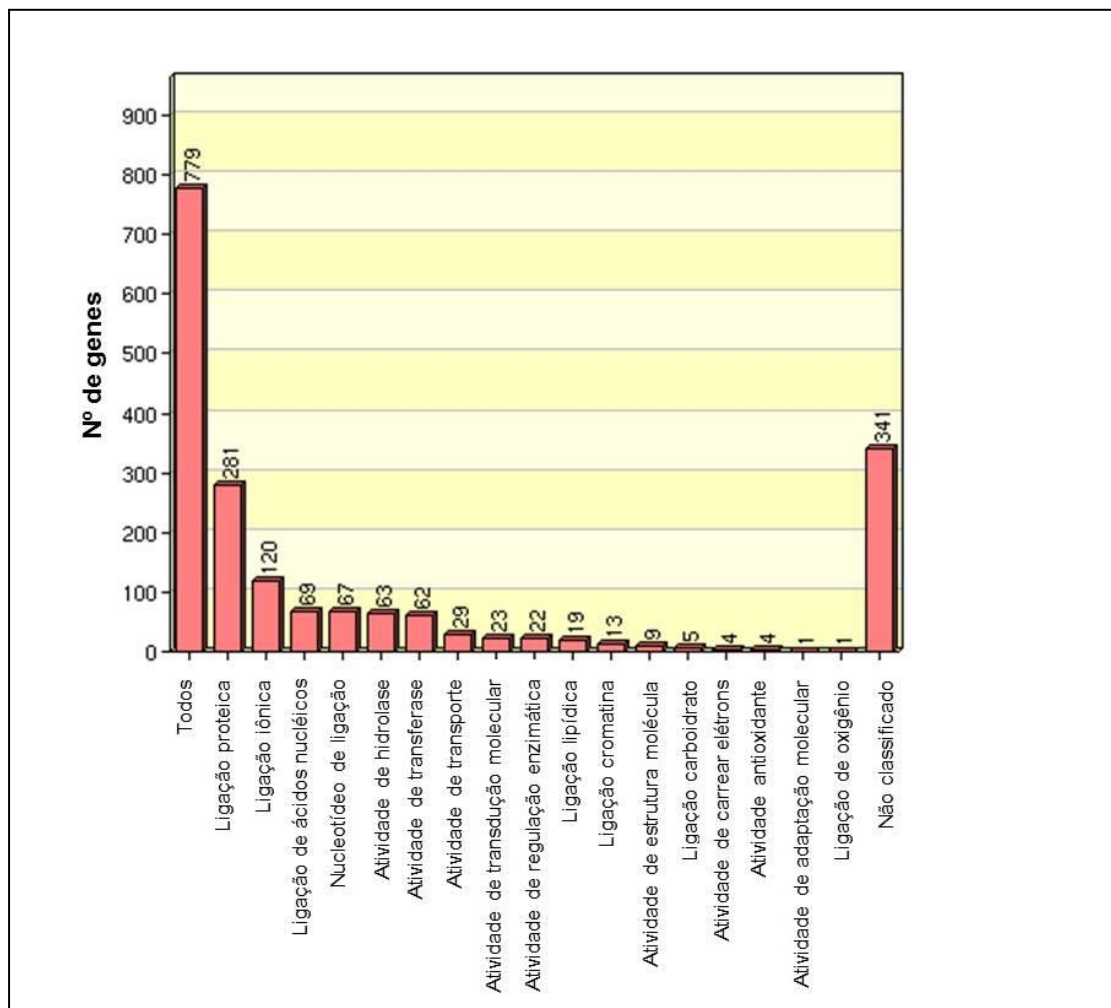


Figura 18: Funções moleculares dos genes regulados positivamente no carcinoma mamário canino.

B- Função Biológica dos Genes

A função biológica dos genes regulados positivamente está representada na figura 19.

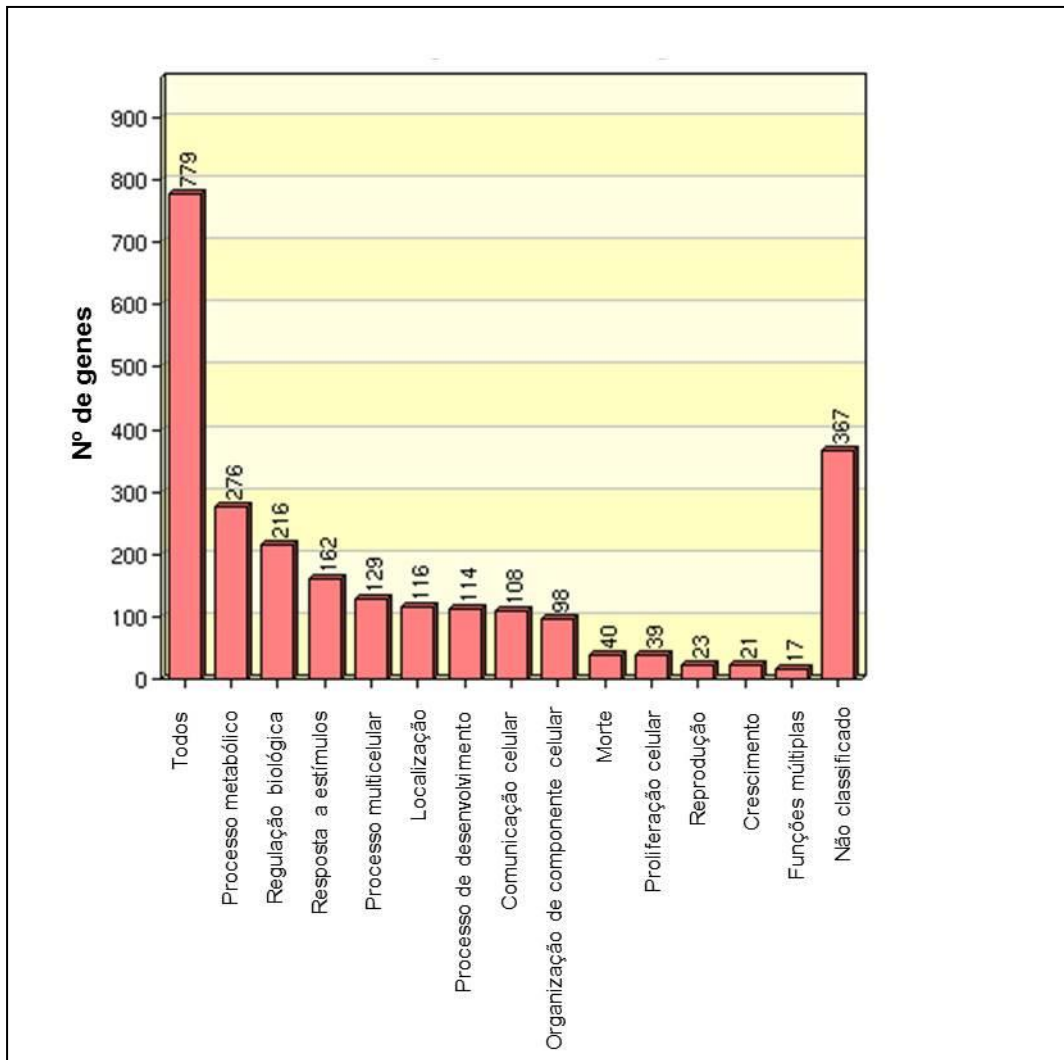


Figura 19: Categoria dos processos biológicos dos genes positivamente regulados no carcinoma mamário canino.

C- Vias Metabólicas

Na coleção de genes superexpressos obtida no referido estudo foi possível identificar apenas uma via de sinalização relacionada ao processo carcinogênico. Trata-se da via de sinalização metabólica (p ajustado= 0,0000125).

5.2.3.2 Genes Regulados Negativamente

A- Função Molecular dos Genes

As funções moleculares dos genes regulados negativamente nos carcinomas mamários de cadelas estão representadas na figura 20.

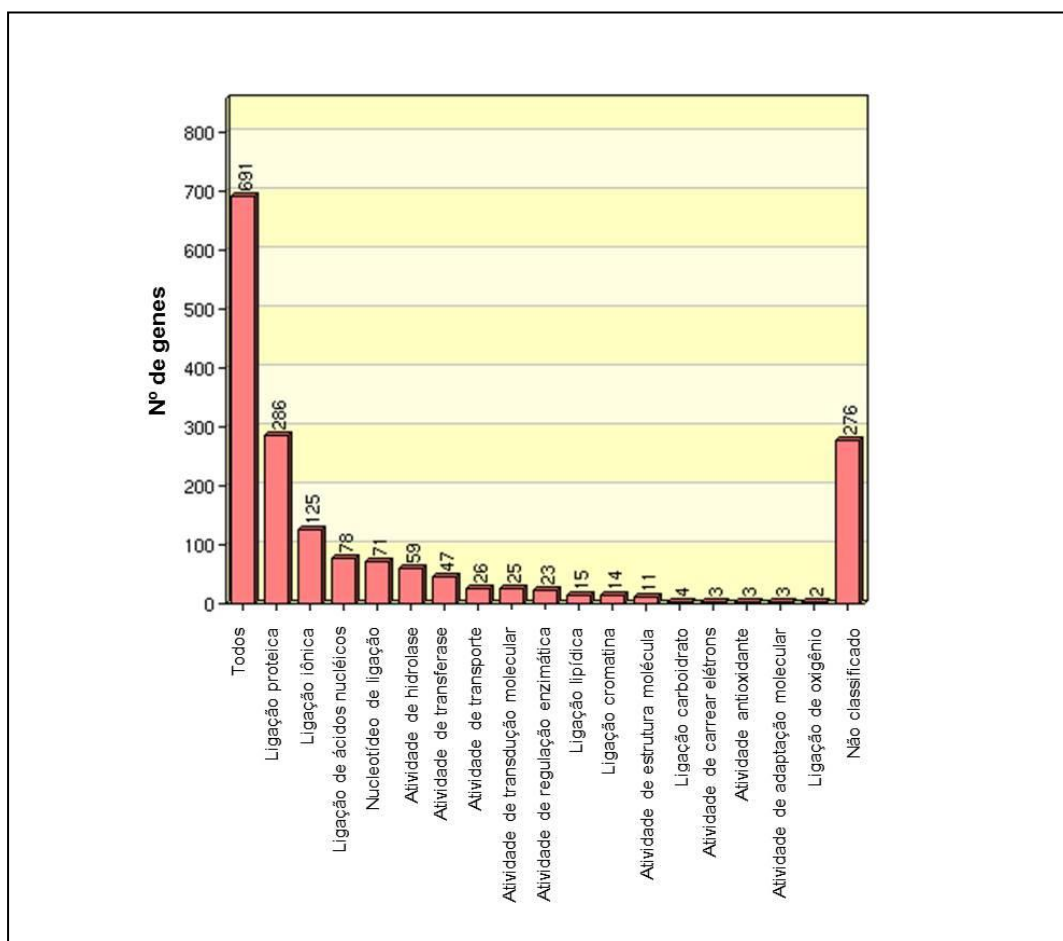


Figura 20: Funções moleculares dos genes regulados negativamente no carcinoma mamário canino.

B- Funções Biológicas dos Genes

As funções biológicas dos genes regulados negativamente no carcinoma mamário de cadelas estão representadas na figura 21.

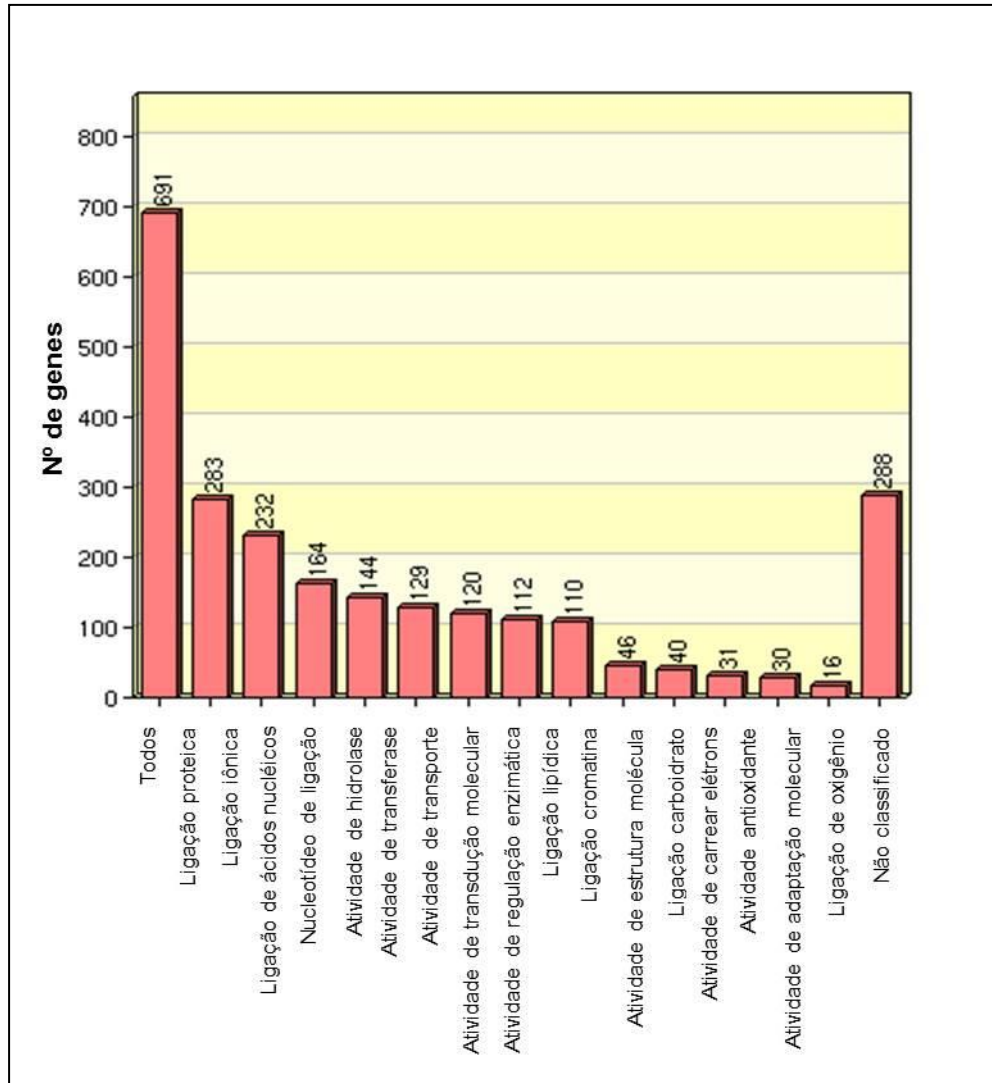


Figura 21: Funções biológicas dos genes regulados negativamente no carcinoma mamário canino.

C- Vias metabólicas

Na coleção de genes regulados negativamente obtidos foi possível identificar quatro vias de sinalização relacionadas ao desenvolvimento de câncer: a via metabólica, MAPK, PPAR, Reparo de Nucleotídeo.

5.2.4 Novo marcador para o Câncer de Mama de Cadelas

5.2.4.1 Validação do HYAL-1

A expressão gênica do gene HYAL-1 para validação como um marcador para o câncer de mama em cadelas também foi analisada por PCR em Tempo Real. Para esta análise, o valor da expressão relativa (RQ) para o grupo controle foi estabelecido como 0 (zero) e todos os resultados foram demonstrados como escala de log₁₀. Esse ensaio permitiu verificar que o gene HYAL-1 está superexpresso em carcinoma mamários de cadelas (figura 22).

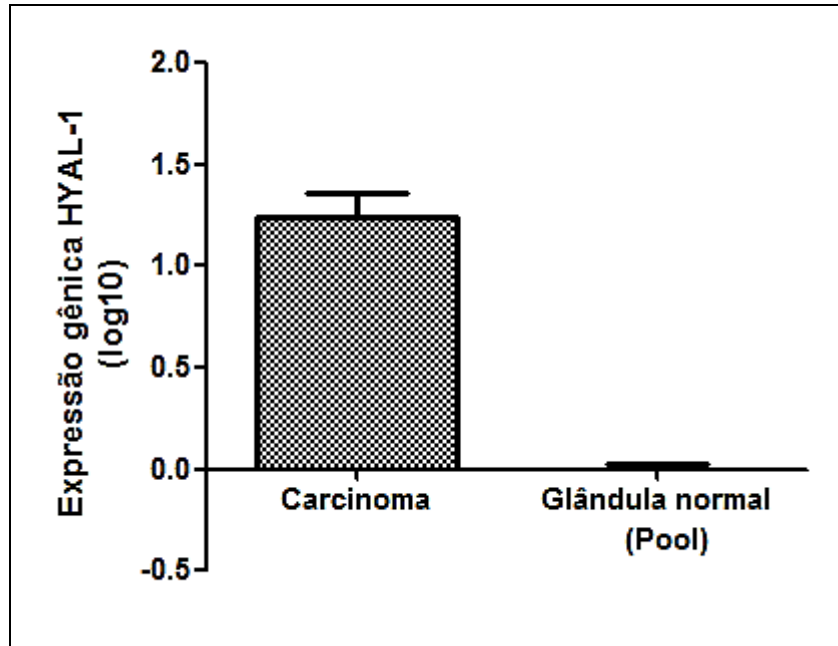


Figura 22: Análise da expressão gênica por PCR do gene HYAL-1 em tecido tumoral mamário de cadelas. Valor de p significativo no teste t (\pm S.E.M. ** $p = 0.0061$ comparado ao grupo glândula mama).

Também foi evidenciado que a expressão desse gene era maior em cadela com câncer que teve recidiva. Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos caracterizados na figura 23.

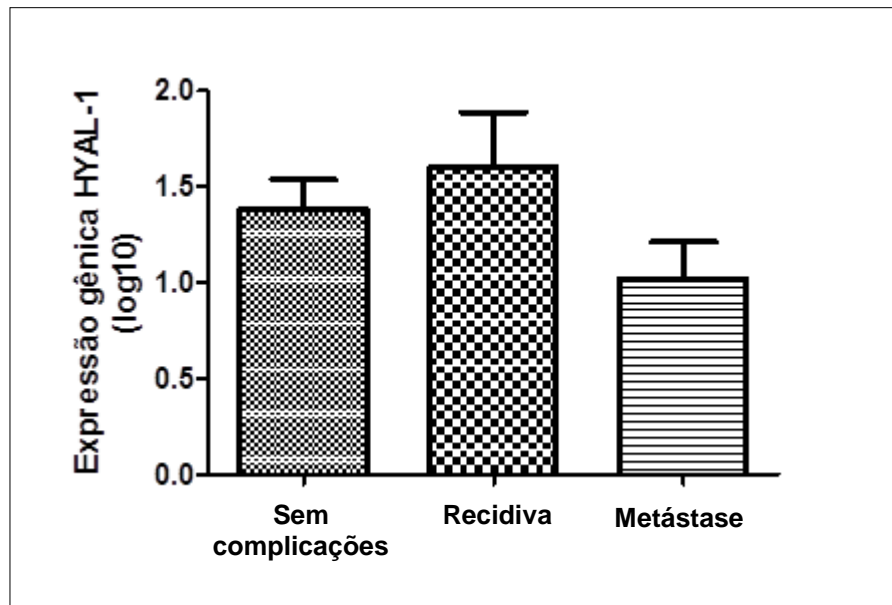


Figura 23: Análise da expressão gênica por PCR do gene HYAL-1 em tecido tumoral mamário de cadelas agrupadas segundo o tipo de evolução da enfermidade. Valor de p significativo no teste t (\pm S.E.M. $p > 0.05$)

6. DISCUSSÃO

Estudos têm demonstrado que a neoplasia mamária de cadelas é uma doença heterogênea e complexa (GAMA et al., 2005; PEÑA et al., 2014; IM et al., 2014). Diante disso, a classificação histopatológica das lesões mamárias, a qual se fundamenta na avaliação anatomo-morfológica das células que constituem a glândula, não é capaz de determinar o prognóstico da doença de forma precisa e confiável. Essa desvantagem é nítida quando o oncologista se depara com pacientes diagnosticados com o mesmo subtipo histológico e estadiamento, porém com progressão e evolução da enfermidade de formas distintas (SIDRANSKY, 2002; LONNING, 2003; ZUCCARI et al., 2006).

Nesse âmbito, o presente estudo constatou que o uso do exame histopatológico como ferramenta única para a determinação do diagnóstico e do prognóstico do câncer de mama das cadelas não foi suficiente, pois foi constatado que um mesmo subtipo histopatológico pôde apresentar diferentes fenótipos e, como consequência, evoluções distintas. Dessa forma, sugere-se que a avaliação anatomo-morfológica das lesões neoplásicas não seja realizada como único método diagnóstico. Na Medicina Veterinária, há poucos artigos que exploram a classificação de grupos moleculares com marcadores imuno-histoquímicos nas neoplasias mamárias de cadelas (GAMA et al., 2005; SASSI et al., 2010), o que, de fato, enfatiza a necessidade de estudos acerca da temática. Além disso, verifica-se grande discrepância entre os artigos publicados, os quais são embasados em uma variedade de marcadores e diferentes técnicas de execução (PEÑA et al., 2014).

Assim, alicerçados nos resultados obtidos nesse projeto, foi possível estabelecer uma classificação fenotípica baseada em quatro marcadores imuno-histoquímicos (RE, RP, HER2 e E-caderina) para a definição de quatro grupos fenotípicos: luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e triplo negativo. A utilização desses marcadores mostrou ser muito eficiente na definição dos perfis fenotípicos das neoplasias mamárias em cadelas por assegurar uma correlação prognóstica confiável. Isso se mostra um ponto forte do trabalho, visto que as classificações

fenotípicas publicadas na literatura utilizam mais marcadores para definirem um painel (GAMA et al., 2005; SASSI et al., 2010; IM et al., 2014).

Diante do exposto, verificamos que a maioria dos neoplasmas caninos foram classificados como luminal A e luminal B. Estes subfenótipos apresentaram prognóstico favorável, visto que as taxas de recidivas e metástases foram menores. Esses grupos são caracterizados pela expressão positiva de ER e PR. Está estabelecido na literatura que a expressão elevada desses receptores ocorre nas mamas normais e nas neoplasias mamárias benignas (LANA et al., 2007). Todavia, o câncer de mama também pode exibir expressão positiva desses receptores. Assim, os neoplasmas RE e RP positivos possuem prognóstico melhor, pois as células tumorais que constituem a lesão são mais similares às células normais da glândula mamária. Já a marcação negativa desses receptores está relacionada a tumores mamários com características de malignidade mais acentuadas (de LAS MULAS et al., 2005; MAINET et al., 2014, PEÑA et al., 2014, KIM et al., 2014).

A expressão da proteína HER2 também mostrou ser um marcador prognóstico eficiente. Foi observado maior número de óbitos no grupo Luminal B quando comparado ao luminal A. Infere-se que tal achado esteja envolvido com a expressão do HER2 no luminal B. Já o fenótipo HER2 superexpresso, ao ser definido pela ausência dos receptores RE e RP, bem como pela expressão positiva do HER2, revelou o pior prognóstico entre os demais. A expressão da proteína HER2 em neoplasias mamárias de cadelas foi averiguada por Dutra et al. (2004) e demonstraram que a superexpressão estava associada com neoplasmas mais agressivos. Os nossos resultados corroboram os achados desses pesquisadores. Entretanto, Campos et al. (2015) não observaram características prognósticas com esse marcador.

O câncer triplo negativo é caracterizado pela ausência de expressão dos receptores RE, RP e HER2. Essa peculiaridade os torna bastante agressivos, conforme constatado no estudo. As cadelas classificadas com esse fenótipo apresentaram a maior taxa de óbito, as quais foram decorrentes de metástases. Kim et al. (2013) também relataram que esse grupo apresentou menor tempo de sobrevida e prognóstico desfavorável nas cadelas portadoras de neoplasmas mamários triplo-negativos.

Outras classificações moleculares baseadas em marcadores imuno-histoquímicos para neoplasias mamárias de cadelas foram desenvolvidas e avaliadas em três estudos. Gama et al. (2008) estudaram um painel baseado em cinco marcadores (RE, RP, HER2, CK5, p63 e P-caderina) e determinaram quatro fenótipos: Luminal A, Luminal B, HER2 superexpresso, basal-like. Assim como foi constatado no nosso estudo, tais pesquisadores observaram diferença significativa entre os grupos quanto ao prognóstico e à sobrevida, exceto no basal-like. Sassi et al. (2010), por sua vez, propuseram cinco marcadores imuno-histoquímicos para classificarem os neoplasmas em Luminal A, Luminal B, HER2 superexpresso, basal *like* e normal *like*. Entretanto, foram identificados apenas os subtipos Luminal A, Luminal B e basal *like*. E, em contraste com os resultados obtidos no nosso estudo, não foram observadas diferenças no tempo de sobrevida entre os fenótipos. Im et al. (2014) utilizaram seis anticorpos (ER, HER2, CK14, P63, SMA e Vimentina) para definirem cinco grupos: Luminal A, Luminal B, HER2 superexpresso, basal *like* e normal *like*. Esses pesquisadores concluíram que a baixa expressão de RE e a superexpressão de HER2 em câncer de mama de cadelas foram associadas a pior prognóstico. Os resultados aqui obtidos corroboram que a ausência de expressão do RE e a positividade para o HER2 conferem um prognóstico desfavorável.

A E-caderina é uma molécula de adesão encontrada nos tecidos epiteliais e a sua expressão nos tecidos mamários neoplásicos está intimamente relacionada com o comportamento biológico e o prognóstico do câncer (GAMA et al., 2008; GAMA et al., 2012). Conforme já descrito, durante o fenômeno da transição epiteliomesenquimal, as células epiteliais assumem o fenótipo de células mesenquimais. Com isso, adquirem a capacidade de locomoção e invasão no estroma circundante, o que favorece a progressão da doença e a formação de metástases à distância (GHELDOLF & BERX, 2013) Portanto, a expressão reduzida ou ausente desse marcador confere agressividade ao câncer de mama (SARLI et al., 2004). Além disso, autores citam a E-caderina como um agente de supressão tumoral, pois a presença da proteína na membrana citoplasmática das células epiteliais neoplásicas não desestabiliza o complexo das cateninas, sobretudo a β -catenina, o que favorece o controle da proliferação celular pela via canônica do Wnt (JEANES et al., 2008; HEUBERGER et al., 2010). Dessa forma, a adição da E-caderina no painel sugerido

pelo grupo de pesquisa em questão assegurou a classificação frente ao perfil epitelial das células neoplásicas. A associação desse marcador possibilitou avaliar os comportamentos diferentes entre neoplasmas caracterizados no mesmo subtipo fenotípico. Foi possível verificar que, nas pacientes com complicações das doenças (recidiva e/ou metástase) nos grupos luminal A e luminal B, a expressão da E-caderina estava diminuída ou ausente, o que permitiu explicar o prognóstico reservado nessas cadelas. Diante do exposto, verificou-se que a ausência ou a baixa expressão de E-caderina se associou a fenótipos mais agressivos e metastáticos (HER2 superexpresso e triplo negativo). Isso nos faz concluir que tal marcador auxilia na compreensão do desenvolvimento, bem como na determinação da evolução da doença. Dessa forma, carcinomas pouco diferenciados, invasivos e metastáticos apresentam perda da expressão da E-caderina, o que sugere um importante fenômeno denominado de transformação maligna. Além disso, a perda de expressão de E-caderina em câncer de mama de cadelas foi correlacionada com menor sobrevida e tempo livre de doença mais curto (KLOPFLEISCH et al., 2011a). Matos et al. (2007) e Yoshida et al. (2014) também conseguiram demonstrar que a redução da expressão da E-caderina estava associada a neoplasias mais invasivas e metastáticas. O que se assemelha aos achados do referido estudo, uma vez que o câncer triplo negativo e HER2 superexpresso apresentaram perda da expressão desse marcador epitelial.

As claudinas são os principais constituintes das *tight junctions* e estão presentes nos tecidos epiteliais e endoteliais. Além de promoverem a adesão entre as células e controlar a permeabilidade paracelular, esse grupo de proteínas atuam em diversos mecanismos de sinalização celular, entre eles a proliferação, diferenciação e apoptose (OSANAI et al., 2016). Estudos recentes demonstram que a desregulação da expressão das claudinas favorece a carcinogênese e a progressão da enfermidade (GÜNZEL & FROMM, 2012). No câncer de mama em mulheres, foi relatada a diminuição da expressão da claudina 1 na doença invasiva e da claudina 7 no carcinoma ductal invasivo, assim como superexpressão das claudinas 3 e 4 (SOINI, 2005; SINGH et al., 2010; KWON, 2013). Todavia, os resultados obtidos neste estudo não foram esclarecedores. O padrão de expressão foi bastante uniforme entre os fenótipos luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e

triplo negativo, fato que não mostrou as claudinas como um bom marcador para o câncer de mama nesse estudo. Jakab et al. (2008) também obtiveram resultados confusos quanto à expressão das claudinas em neoplasmas mamários de cadelas. Ele mostraram que a expressão forte das claudinas 1, 3, 4, 5, e 7 ocorreu na lesões hiperplásicas de mama, bem como nos tumores benignos. A marcação acentuada das claudinas 3 e 4 foi observada nos carcinomas não-infiltrativos e em todos os graus histológicos (I, II e III) de carcinomas infiltrativos. A redução da expressão das claudinas 5 e 7 foi observada tanto em carcinomas não-infiltrativos como nos infiltrativos. Mesmo assim, os pesquisadores concluíram que a perda ou a diminuição da expressão das claudinas 1, 2, 5 e 7 podem levar à desorientação celular e à invasão do câncer de mama canino.

Algumas especulações sobre os resultados obtidos quanto à imunoexpressão das claudinas 1, 3, 4 e 7 no referido trabalho podem repercutir na escolha da técnica de TMA para a avaliação da expressão dos marcadores. Essa ferramenta permite a análise de inúmeros espécimes de forma simultânea, por isso possui indicação para o estudo de perfis fenotípicos em câncer de mama em mulheres e em cadelas. No presente projeto, para assegurar a confiabilidade dos resultados, as áreas das amostras neoplásicas com maiores critérios de malignidade foram selecionadas para constituírem o bloco de TMA. Ou seja, o tumor não foi avaliado na totalidade, o que, para as claudinas, pode ter sido um fator complicador. Esse argumento gera dúvidas, pois nos marcadores RE, RP, HER2 e E-caderina os resultados foram coerentes e interessantes. Dessa forma, a explicação mais plausível para tais achados fundamenta-se na homologia entre os anticorpos primários e as proteínas (claudinas 1, 3, 4 e 7) caninas. Na literatura, até o momento, é possível encontrar apenas a sequência predicta desses receptores, ou seja, a sequência dos aminoácidos não está totalmente esclarecida. Como os anticorpos (anti-claudina 1, anti-claudina 3, anti-claudina 4 e anti-claudina 7) usados no estudo foram desenvolvidos para o uso imuno-histoquímico em humanos, a homologia entre eles e o cão não é de 100%. Por isso, os resultados se apresentaram de forma inusitada.

As células tronco tumorais ou células iniciadoras de tumor constituem uma pequena fração da massa tumoral e são importantes na iniciação e progressão da doença, porque promovem o crescimento (auto-renovação), heterogeneidade

(pluripotência), recidivas, metástases e resistência à quimioterapia antineoplásica (GONÇALVES et al., 2016). Em virtude dessas características, estas são consideradas marcadores prognósticos importantes para a enfermidade. No câncer de mama, um dos fenótipos das células tronco tumorais é caracterizado pelo perfil CD44⁺/CD24⁻. Magalhães et al. (2014) foram os pioneiros a investigar a detecção desse fenótipo com os marcadores imuno-histoquímicos CD44 e CD24 em tumores mamários de cadelas. Concluíram que cerca de 30% dos neoplasmas mamários apresentavam esse fenótipo essa técnica é eficiente e precisa para a avaliação da expressão dessas proteínas, e que a presença dessas células tronco tumorais estava relacionada a neoplasmas com os graus histológicos II e III ou à metástase em linfonodos. A IHC é uma ferramenta útil, prática e efetiva para a avaliação da imunexpressão dos marcadores CD24 e CD44 em câncer de mama canino. Além disso, apesar da presença do fenótipo CD44⁺/CD24⁻ ter sido encontrado em apenas quatro tumores, dentre os quais dois eram luminal B e dois luminal A, também se constatou que a maioria das lesões estava relacionada aos graus histológicos II e III. A baixa incidência desse fenótipo no presente estudo (5,8%) também pode ser explicada pelas restrições impostas pelo uso TMA. Na área de maior malignidade é possível ter ocorrido a completa organização estrutural dos componentes neoplásicos (células, estroma, microambiente). Portanto, na região selecionada, infere-se que a atividade do sistema imune tenha sofrido redução, ou interrupção. Daí a baixa incidência do fenótipo CD44⁺/CD24⁻. A homologia entre os anticorpos primários e os receptores CD24 e CD44 caninos também podem ter interferido nos resultados obtidos, conforme explicado anteriormente.

A análise da expressão genômica dos tumores, como o microarranjo de cDNA, é uma ferramenta diagnóstica importante para a identificação de novos marcadores clínicos, pois auxilia no entendimento dos padrões moleculares das neoplasias (VIEIRA et al., 2007; PEROU et al., 2011). Na pesquisa oncológica, os microarranjos podem ser usados para inúmeras propostas, sendo que uma das principais aplicações é a identificação de genes que podem estar associados ao desenvolvimento e à progressão de um tipo de câncer específico (COLOMBO & RAHAL, 2010). Além disso, o estudo da expressão gênica dos neoplasmas direciona para a medicina personalizada, a qual propicia um tratamento

individualizado e preciso conforme a assinatura genética do câncer (MORRIS, 2016). Diante do exposto, o presente ensaio vislumbra o início da medicina personalizada em cadelas com câncer mamário.

Os estudos de expressão gênica de neoplasmas desenvolvidos na espécie canina são recentes e incipientes. No levantamento bibliográfico, constataram-se poucos estudos com a técnica do microarranjo, o qual foi empregada para a avaliação de linfomas (FRANZ et al., 2013; RICHARDS et al., 2013; MUDALIAR et al., 2013), câncer de mama (RAO et al., 2009; WENSMAN et al., 2009; KLOPFLEISCH et al. 2010; KLOPFLEISCH et al., 2011b; PAWŁOWSKI ET AL., 2013a; PAWŁOWSKI et al., 2013b), sarcomas de tecidos moles (KLOPFLEISCH et al., 2013), osteossarcomas (PAOLONI et al., 2009; SELVARAJAH et al., 2009; SCOTT et al., 2011) e mastocitomas (GLANTIN et al., 2014).

O primeiro ensaio de expressão gênica com câncer de mama canino foi desenvolvido por Wensman et al. (2009). Os pesquisadores avaliaram a expressão gênica global de carcinomas simples, fibrossarcomas e osteossarcomas mamários. Verificaram que os carcinomas expressavam marcadores de adesão celular (citoqueratina, E-caderina e ocludina), e os outros dois grupos expressavam marcadores mesenquimais e genes controladores do desenvolvimento relacionados à formação óssea craniofacial (SIP1/ZEB2, MSX-2 e SatB-2).

Rao et al. (2009) também avaliaram a expressão dos genes em carcinomas mamários em cadelas. Verificaram que a maioria estava envolvida com motilidade, adesão celular, organização do citoesqueleto, proliferação e regulação do ciclo celular.

Klopfleisch et al. (2010) comparou a expressão gênica entre o câncer de mama metastático e o câncer de mama não metastático em cadelas e observaram 1011 genes diferencialmente expressos, dentre os quais 744 encontravam-se regulados positivamente e 267 regulados negativamente no grupo metastático. Por meio da análise de enriquecimento dos genes superexpressos no câncer disseminado, constataram que a maioria estava envolvido no ciclo celular. Os genes regulados negativamente faziam parte da diferenciação celular e de vias de sinalização de crescimento.

Em outro estudo desenvolvido por Klopffleisch et al. (2011b) foi avaliado o perfil de expressão gênica do câncer de mama metastático de cadelas. Quando comparado com amostras de mamas normais, verificaram 1312 genes diferencialmente expressos no câncer de mama metastático. Vários genes regulados positivamente estavam envolvidos com a divisão celular e com a invasão da matriz extracelular, dentre eles: MMP, SERPINE1, TIMP3. E muitos outros, negativamente regulados, associavam-se ao mecanismo de diferenciação epitelial (EGF, EGFR, MAP2K6, SATAT5), adesão celular (CLDN5, CTNNAL1, MUC1, PECAM1) e angiogênese (ANGPT 2, ANGPTL1-4, FIGF, TIE1).

Em nosso estudo, obtivemos 1699 genes diferencialmente expressos no câncer de mama em relação à glândula normal. Dentre esses, as funções biológicas mais relevantes ao processo de tumorigênese relacionadas aos genes superexpressos eram a adesão biológica (LAMA1, ITGA8, CD48, ARHGF3, SIPA1L1, F8, CD34, CUBN, ITGAE, SCARB2, NLGN4X, C8A); morte celular (ULBP1) e locomoção (KIF5A, PDGFD, SEMA6A, FYN, KIF5C, YES1). Os genes regulados negativamente também estavam associados à adesão celular (NRP1, SEZ6L, ADAMTS6, FGL2, ASGR2, CADM1, ANGPTL4, APOH, EGFLAM, LAMB1, JAG1), morte celular (CADM1), locomoção. Diante do exposto, nota-se que a expressão gênica do câncer de mama é diferente entre os estudos citados. Entende-se que tal diferença esteja relacionada à origem da população doente, isto é às regiões geográficas onde foram desenvolvidos os ensaios (Europa X Brasil), ao tipo de câncer (metastático e não metastático), bem como ao tempo de evolução da doença (ocorrência de transformações malignas).

Para reforçar o que foi já salientado, Pawłowski et al. (2013a) afirmaram que a classificação histopatológica e molecular dos neoplasmas mamários de cadelas devem ser usadas de forma complementar. O grupo verificou que o método de pontuação da neoplasia em graus histológicos (I, II e III) não permitiu estabelecer o verdadeiro prognóstico da doença, visto que a expressão gênica dos neoplasmas classificados com o mesmo score foi diferente, conforme observado nesse ensaio. Para sanar essa dificuldade e determinar outros marcadores prognósticos, em outro estudo, Pawłowski et al. (2013b) analisaram a expressão gênica de carcinomas mamários cadelas classificados em diferentes graus de malignidade (I,II e III) e

selecionaram cinco genes (SEHRL, ZFP37, MIPEP, RELAXINA E MAGI3) capazes de predizerem a agressividade da neoplasia. Eles concluíram que o aumento da expressão desses genes está associado a malignidade e que, dessa forma, devem ser usados como marcadores para o prognóstico do câncer de mama em cadelas.

O estudo gênico dos carcinomas mamários de cadelas pela técnica do microarranjo pelo nosso grupo de pesquisa permitiu a identificação do gene HYAL-1, o qual foi validado como um marcador para a doença nessa espécie. Tal descoberta é inédita na medicina veterinária, especialmente no câncer de mama de cadelas. No perfil de expressão dos subfenótipos luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e triplo negativo, constatou-se que a expressão desse gene foi mais significativa nos neoplasmas triplo negativos. Esse achado apontou o HYAL-1 como um potencial marcador de malignidade para a doença. Dessa forma, foi selecionado para a validação por PCR, o qual constatou a superexpressão no câncer de mama (marcador diagnóstico), bem como nos carcinomas recidivantes (marcador de recidiva).

Em cães, apenas um artigo na literatura faz alusão a esse gene no mastocitoma canino. Arendt et al. (2015) avaliaram os fatores genéticos predisponentes para o desenvolvimento do mastocitoma cutâneo em Golden Retrievers americanos e europeus. A associação entre as duas populações permitiu identificar dois loci significativamente diferentes. Na americana, os genes SPAM1, HYAL4 e HYALP1, e na europeia os HYAL1, HYAL2 e HYAL3, todos pertencentes à família das enzimas hialuronidases. Diante disso, os pesquisadores inferiram que o *turnover* do ácido hialurônico e mutações nesses genes incitam o desenvolvimento dos mastocitomas.

Os estudos em câncer de mama humano relacionados ao marcador HYAL-1 foram pouco explorados e existem poucos artigos publicados na literatura. Entretanto, os resultados são promissores e interessantes, os quais o atestam como um bom marcador para a doença. Os dados obtidos por Tan et al. (2011a) constataram que a regulação positiva do marcador HYAL-1 nos tumores mamários de mulheres está relacionada com características de malignidade. Além disso, demonstraram que o câncer de mama positivo para HYAL-1 tem grande potencial para o tratamento personalizado com fármacos capazes de antagonizar a atividade

dessa enzima. Para chegarem nessas conclusões, os pesquisadores forçaram a expressão do HYAL-1 em células de câncer de mama por meio da transfecção de plasmídeo e notaram crescimento celular, migração, invasão e angiogênese nos testes realizados *in vitro*. Já no estudo *in vivo* com modelo xenográfico de indução de câncer de mama com células previamente confeccionadas para expressarem o marcador, observaram crescimento acentuado do tumor e angiogênese. Em outro ensaio desenvolvido pela mesma equipe, Tan et al. (2011b) comprovaram mais uma vez que a superexpressão da HYAL-1 no câncer de mama em mulheres estava associada a um comportamento maligno e que, por isso, pode e deve ser utilizado como um marcador prognóstico e terapêutico para a enfermidade. No nosso estudo, foi possível verificar que a superexpressão do gene HYAL-1 ocorre no câncer de mama de cadelas, sendo possível inferir que pode ser usado como, além de um marcador para a doença, como um marcador de recidiva. Não foi possível determiná-lo como um marcador de prognóstico, pois o número amostral da população avaliada pode ter interferido nesse resultado.

Outro estudo verificou a possibilidade do HYAL-1 ser um marcador plasmático para o câncer de mama em mulheres. Wu et al. (2016) verificaram a atividade das enzimas hialuronidases no soro de mulheres com tumores mamários benignos e malignos. Em ambos os grupos a quantificação da atividade foi semelhante. Além disso, também não verificaram diferenças entre o câncer metastático e não metastático. Portanto, concluíram que essa modalidade diagnóstica não tem aplicabilidade para a determinação do comportamento e prognóstico para a moléstia em humanos.

Além do câncer de mama em mulheres, a superexpressão do marcador HYAL-1 foi observada em outros tipos de neoplasmas, dentre os quais se pode citar o câncer de próstata, o de ovário, o de bexiga e o de cólon. Em todos, a positividade desse marcador estava associada à invasão, ou à recidiva, ou à progressão da doença, fato que, mais uma vez, tais achados corroboram e associam esse gene à capacidade de atuar como marcadores dessas enfermidades (KOVAR et al., 2006; KRAMER et al., 2010; BOUGA et al., 2010; HUANG et al., 2016).

Como é possível perceber, ainda há muito o que evoluir com os estudos de expressão gênica nas neoplasias mamárias de cadelas. A expectativa é que a

avaliação da assinatura genética em larga escala favoreça o reconhecimento de novos marcadores, os quais possam ser inseridos à rotina clínica dos oncologistas veterinários para, assim, favorecer o desenvolvimento de uma medicina personalizada, com chances reais de alteração do curso da doença, com aumento do tempo livre de doença e sobrevida global das pacientes.

7. CONCLUSÕES

O presente estudo permite as seguintes conclusões:

- O painel imuno-histoquímico com os marcadores RE, RP, HER2 e E-caderina é confiável para a classificação fenotípica prognóstica (luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e triplo negativo) para neoplasmas mamários em cadelas;
- A avaliação dos padrões de marcação dos receptores RE, PR, HER2 e E-caderina no câncer mamário das cadelas pela técnica de IHQ afirma que essas proteínas podem ser utilizadas como marcadores fidedignos para a doença nessa espécie;
- A avaliação do padrão de expressão das claudinas 1, 3, 4 e 7 pela técnica de IHQ no câncer de mama de cadelas revela que essas proteínas não são bons marcadores para a doença no nesse estudo.
- A avaliação do padrão de expressão das proteínas CD24 e CD44 pela técnica de IHQ para a determinação das células-tronco tumorais (CD44⁺/CD24⁻) mostra a baixa incidência desse fenótipo na massa tumoral e que a presença está relacionada aos graus histológicos II e III;
- O perfil da expressão gênica global dos carcinomas mamários de cadelas mostra inúmeros genes regulados positiva e negativamente, os quais estão envolvidos em vias de sinalização que influenciam na carcinogênese mamária;
- Não há diferença significativa entre os perfis de expressão gênica dos subfenótipos luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e triplo negativo para neoplasmas mamários em cadelas;
- O estudo gênico possibilita a identificação de novos marcadores moleculares para a doença;
- O HYAL-1 é um marcador diagnóstico e de malignidade para o câncer de mama em cadelas.

8. REFERÊNCIAS

de ABREU, EVALDO; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminino. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.48, n. 1, p: 113-131, 2002.

AL-DISSI, A. N.; HAINES, D. M.; SINGH, B.; KIDNEY, B. A. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 in canine simple mammary gland adenocarcinomas. **The Canadian Veterinary Journal**, v.5, n.10, 2010.

AL-HAJJ, M; WICHA,M.S; BENITO-HERNANDEZ,A; MORRISON,S.J; CLARKE,M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, n.7, p.3983-3988, 2003.

APPERT-COLLIN, A.; HUBERT, P.; CRÉMEL, G.; BENNASROUNE, A. Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion. **Frontiers in Pharmacology**, v.6, n. 283, p.1-10, 2015.

ARENDDT, M.L.; MELIN, M.; TONOMURA. N.; KOLTOOKIAN, M.;COURTAY-CAHEN C.; FLINDALL, N.; BASS, J.; BOERKAMP, K.; MEGQUIR, K.; YOUELL, L.; MURPHY S.; MCCARTHY, C.; LONDON, C.; RUTTEMAN, G.R.; STARKEY, M.; LINDBLADTOH, K. Genome-Wide Association Study of Golden Retrievers Identifies Germ-Line Risk Factors Predisposing to Mast Cell Tumours. **Plos One**, v.11, n.11, e100564, 2015.

BARANWAL,S; ALAHARI,S.K. Molecular mechanisms controlling E-cadherin expression in breast cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.384, n.1, p.6-11, 2009.

BARDOU,V.J; ARPINO,G; ELLEDGE,R.M; OSBORNE,C.K; CLARK, G.M. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in 2 large breast cancer databases. **Journal of Clinical Oncology**, v.21, n.10, p.1973-1979, 2003.

BERNARDI, M.A; LOGULLO, F.A; PASINI,F.S; NONOGAKI,S; BLUMKE,C; SOARES,F.A; BRENTANI, M.M. Prognostic significance of CD24 and claudin-7 immunoexpression in ductal invasive breast cancer. **Oncology reports**, v.27, n.1, p.28-38,2012.

BETZ, D.; SCHOENROCK, D.; MISCHKEL, R.; BAUMGÄRTNER, W.; NOLTE, I. Postoperative treatment outcome in canine mammary tumors Multivariate analysis of the prognostic value of pre- and postoperatively available information. **Tierärztliche Praxis Kleintiere**, v.40, p. 235–242, 2012.

BOUGA, H.; TSOUROS, I.; BOUNIAS, D.; KYRIAKOPOULOU, D.; STAVROPOULOS, M.; PAPAGEORGAKOPOILOU, N.; THEOCHARIS, D. A.; VYNIOS, D. H. Involvement of hyaluronidases in colorectal cancer. **BMC Cancer**, v.10, p: 449, 2010.

BRODEY, R. S.; FIDLER, I. J.; HOWSON, B. A. The relationship of estrus irregularity, pseudopregnancy and pregnancy to the development of canine mammary neoplasms. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.149, p.1047-1049, 1966.

BRODY, R. S.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ROSZEL, J. Canine mammary gland neoplasia. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.19, p. 61–90, 1985.

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; DE NARDI, A. B.; FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A. C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, A. C.; DALECK, C. R.; SALGADO, B. S.; FERNANDES, C. G.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; AULER, P. A.; MAGALHÃES, G. M.; SILVA, J. O.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; OLIVEIRA, L. O.; MALM, C.; ZUCCARI, D. A. P. C.; TANAKA, N. M.; RIBEIRO, L. R.; CAMPOS, L. C.; SOUZA, C. M.; LEITE, J. S.; SOARES, L. M. C.; CAVALCANTO, M. F.; FONTELES, Z. G. C.; SCHUCH, I. D.; PANIAGO, J.; OLIVEIRA, T. S.; TERRA, E. M.; CASTANHEIRA, T. L. L.; FELIZ, A. O. C.; CARVALHO, G. D.; GUIM, T. N.; GUIM, T. N.; GARRIDO, E.; FERNANDES, S. C.; MAIA, F. C. L.; DAGLI, M. L. Z.; ROCHA, N. S.; FUKUMASU, H.; GRANDI, F.; MACHADO, J. P.; SILVA, S. M. M.; BEZERRIL, J. E.; FREHSE, M. S.; ALMEIDA, E. C. P.; CAMPOS, C. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.4, n.2, p. 153-180, 2011.

CHAN, K.K.; MATCHETT, K.B.; MCENHILL, P.M.; DAKIR, E.H.; MCMULLIN, M.F.; EL-TANANI, Y.; PATTERSON, L.; FAHEEM, A.; RUDLAND, P.; MCCARRON, P.A.; EL-TANANJ, M. Protein deregulation associated with breast cancer metastasis. **Cytokine & Growth Factors Review**, v. 26, p: 415-423, 2015.

CHANMEE, T.; ONTONG, P.; ITANO, N. Hyaluronan: a modulator of the tumor microenvironment. **Cancer letters**, v. 375, n.1, p:20-30, 2016

CINTRA, J.R.D.; TEIXEIRA, M.T.B.; DINIZ, R.W.; GONÇALVES-JUNIOR, H.; FLORENTINO, T.M.; DE FREITAS, G.F.; OLIVEIRA, L.R.M.; NEVES, M.Tdos. R.; PEREIRA, T.; GUERRA, M.R. Perfil imuno-histoquímico e variáveis clinicopatológicas no câncer de mama. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.58, n. 2, p. 178-187, 2012.

DIEPENBRUCK, M.; CHRISTOFORI, G. Epithelial–mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe? **Current Opinion in Cell Biology**, v. 43, p. 7-13, 2015.

DIESSLER, M.E.; CASTELLANO, M.C.; PORTIANSKY, E.L.; BURNS, S.; IDIART, J.R. Canine mammary carcinomas: influence of histological grade, vascular invasion, proliferation, microvessel density and VEGFR2 expression on lymph node status and survival time. **Veterinary and Comparative Oncology**, doi, 2016.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; ROCHA, N. S.; FERNANDES, S. C. Neoplasias mamárias. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. (Eds). **Oncologia em Cães e Gatos**. São Paulo: Rocca, 2009. cap 25, p. 372-383.

DUFFY, M.J. Predictive Markers in Breast and Other Cancers: A Review. **Clinical Chemistry**, v.51, n.3, p.494-503, 2005.

EGENVALL, A.; BONNETT, B. N.; OHAGEN.P.; OLSON, P.; HEDHAMMAR, A.; EULER, H. V. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 69, n.1-2, p. 109-127, 2009.

FELICIANO, M. A. R.; SILVA, A. S.; PEIXOTO, R. V. R.; GALERA, P. D.; VICENTE, W. R. R. Estudo clínico, histopatológico e imunoistoquímico de neoplasias mamárias em cadelas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n.5, p. 1094-1100, 2012.

FERGUSON, H. R. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinical of North America**, v.15, p.501-511, 1985.

FRANTZ, A. M.; SARVER, A. L.; ITO, D.; PHANG, T. L.; KARIMPOUR-FARD, A.; SCOTT, M.C.; VALLI, V. E.; LINDBLAD-THOH, K.; BURGESS, K. E.; HUSBANDS, B. D.; HENSON, M.S.; BORGATTI, A.; KISSEBERTH, W.C.; HUNTER, L.E.; BREEN, M.; O'BRIEN, T.D.; MODIANO, J.F. Molecular profiling reveal prognostically significant subtypes of canine lymphoma. **Veterinary Pathology**, v.50, n.4; p:693-703, 2013.

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

GAMA, A.; PAREDE, J.; GÄRTNER, F.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Expression of E-cadherin, P-cadherin and beta-catenin in canine mammary tumours in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. **Veterinary Journal**, v. 177, n.1, p: 45-53, 2008.

GAMA, A.; SCHMITT, F. Cadherin cell adhesion system in canine mammary cancer: a review. **Veterinary Medicine International**, 2012:357187, 8 pages, 2012.

GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. **Veterinary Pathology**, v.48, n.1, p: 117-131, 2011.

GHELDOF, A.; BERX, G. **Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v.116, p: 317-316.

GONÇALVES, N. N.; COLOMO, J.; LOPES, J. R.; GELALETI, G. B.; MOSCHETTA, M. G.; SONEHARA, N. M.; HÉLLMEN, E.; ZANON, C. F.; OLIANI, S. M.; XUCCARI, D. A. P. C. Effect of Melatonin in Epithelial Mesenchymal Transition Markers and Invasive Properties of Breast Cancer Stem Cells of Canine and Human Cell Lines. **Plos One**, v.11, n. 13, e0150407, 2016.

GUMBINER, M.B. Cell-adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **Cell**, v.84, n.3, p: 345-357, 1996.

HAAKENSEN, V.D; LIGJAERD, O.C; LUDERS, T; RIIS, M; PRAT, A; TROESTER, M.A; HOLMEN, M.M; FRANTZEN, J.O; ROMUNDSTAD, L; NAVJORD, D; BUKHOLM, I. K; JOHANNESSEN, T.B; PEROU, C.M; URSIN, G; KRISTENSEN, V.N; BORRESEN-DALE, A.L; HELLAND, A. Gene expression profiles of breast biopsies from healthy women identify a group with claudin-low features. **BMC Medical Genomic**, v.1, n.4, p.77, 2011.

HEDLUND, C.S. Cirurgias do sistema reprodutivo e genital. In: Fossum, T. W. (Ed). **Cirurgia de Pequenos Animais**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2005. p. 610- 672.

HENNESSY,B.T; ANGULO, A.M.G; HALE,K.S; GILCREASE,M.Z; KRISHNAMURTHY,S; LEE,J.S; FRIDLAND,J; SAHIN,A; AGARWAL,R; JOY,C; LIU,W; STIVERS,D; BAGGERLY,K; CAREY,M; LLUCH,A; MONTEAGUDO,C; HE,X; WEIGMAN,V; FAN,C; PALAZZO,J; HORTOBAGYI,G.N; NOLDEN,L.K; WANG,N.J; VALERO,V; GRAY,J.W; PEROU,C.M; MILLS,G.B. Characterization of a Naturally Occurring Breast Cancer Subset Enriched in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Stem Cell Characteristics. **Cancer Research**, v.69, n.10, p.4116-4124, 2009.

HEUBERGER, J.; BIRCHMEIER, W. Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. **Cold Spring Harbor Perspective Biology**, v.2, n.2, a002915, 2010.

HUANG, C.; LIU, H.; GONG, X.; WEN, B.; CHEN, D.; LIU, J.; HY, F. Analysis of different components in the peritumoral tissue microenvironment of colorectal cancer: A potential prospect in tumorigenesis. **Molecular Medicine Reports**, v.14, n.13, p: 2555-2565, 2016.

IDOWU, M. O; KMIECIAK, M; DUMUR, C; BURTON, R.S; GRIMES, M.M; POWERS, C.N; MANJILI, M.H. CD44+/CD24-/low cancer stem/progenitor cells are more abundant in triple-negative invasive breast carcinoma phenotype and are associated with poor outcome. **Human Pathology**, v.43, n.3, p.364-373, 2012.

JAKAB, CS.; HALÁSZ,J.; SZÁSZ,A. M.; KISS,A.; SCHAFF, ZS.; RUSVAI,M.; GÁLFI, P.; KULKA, J. Expression of Claudin-1, -2, -3, -4, -5 and -7 Proteins in Benign and Malignant Canine Mammary Gland Epithelial Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 139, p: 238-245, 2008.

JAVANMOGH DAM, S.; WEIHUA, Z.; HUNT, K.K.; KEYOMARSI, K. Estrogen receptor alpha is cell cycle-regulated and regulates the cell cycle in a ligand-dependent fashion. **Cell Cycle**, v.6, p. 1-12, 2016.

JAWHAR, N.M. Tissue microarray: a rapidly evolving diagnostic and research tool. **Annals of Saudi medicine**, v.29, n.2, p. 123-127, 2009.

JEANES, A.; GOTTARDI, C.J.; YAP, A.S. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? **Oncogene**, v.27, p.6920-6929, 2008.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Membrana plasmática: digestão intracelular. In: **Biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997; p.94- 100.

KALLURI, R.; WEIBERG, R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of Clinical Investigation**, v.119, p. 1420-1228.

KLOPFLEISCH, R. Personalised medicine in veterinary oncology: One to cure just one. **Veterinary Journal**, v. 205, n.2, p. 128-135, 2015.

KLOPFLEISCH, R.; LENZE, D.; HUMMEL, M.; GRUBER, A.D. Metastatic canine mammary carcinoma can be identified by a gene expression. Profile that partly overlaps with human breast cancer profiles. **Veterinary BMC Cancer**, v.10, p: 618, 2010.

KLOPFLEISCH, R.; LENZE, D.; HUMMEL, M.; GRUBER, A.D. The metastatic cascade is reflected in the transcriptome of metastatic canine mammary carcinomas. **Veterinary Journal**, v.190, n.2, p: 236-243, 2011.

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

KOVAR, J.L.; JOHNSON, W. M.; VOLCHECK, J. CHEN, M. A. Hyaluronidase expression indices prostate tumor metastasis in an orthotopic mouse model. **The American Journal of Pathology**, v. 169, n.4, p: 1415-1426, 2006.

KRAMER, M.W.; GOLSHANI, R.; MERSEBURGER, A. S.; KNAPP, J.; GARCIA, A.; JOERG HENNENLOTTER, J.; DUNCAN, R. C.; SOLOWAY M. S.; JORDA, M.; KUCZYK, ARNULF STENZL, M. A.; LOKESHWAR, V. B. HYAL-1 Hyaluronidase: A Potential Prognostic Indicator for Progression to Muscle Invasion and Recurrence in Bladder Cancer. **European Urology**, v. 57, n.1, p: 86-94, 2010.

KRAUSE, G.; WINKER, L.; MUELLER, S.L.; HASELOFF, R.F., PIONTEK, J.; BLASIG, I.E. Structure and function of claudins. **Biochimica et biophysica acta**, v.1778, n.3, p. 631-645, 2008.

LAL-NAG, M.; MORIN, P.J. The claudins. **Genome Biology**, v.10, p.235, 2009.

LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J. Tumors of the mammary gland. In: Withrow, S.J.; MacEwen, E.G.,(Ed). **Small Animal Clinical Oncology**. 4 ed. Missouri : WB Saunders, 2007. p. 619–633.

LOBO, N.A.; SHIMONO, Y.; QIAN, D.; CLARKE, M.F. The biology of cancer stem cells. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.23, p:675-699, 2007.

LONGACRE, T.A.; ENNIS, M.; QUENNEVILLE, L.A.; BANE, A.L.; BLEIWEISS, I.J.; CARTER, B.A.; CATELANO, E.; HENDRICKSON, M.R.; HIBSHOOSH, H.; LAYFIELD, L.J.; MEMEO, L.; WU H. O'MALLEY, F.P. Interobserver agreement and reproducibility in classification of invasive breast carcinoma: an NCI breast cancer family registry study. **Modern Pathology**, v.19, n. 2, p. 195-207, 2006.

LI, A.J.; BALDWIN, R.L.; KARLAN, B.Y. Estrogen and progesterone receptor subtype expression in normal and malignant ovarian epithelial cell cultures. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v.189, n. 1, p. 22-27, 2003.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T. D. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, v.3, p: 1101-1108, 2008.

LIU, M.; LI, Z.; YANG, J.; JIANG, Y.; CHEN, Z.; ALI, Z.; HE, N.; WANG, Z. Cell-specific biomarkers and targeted biopharmaceuticals for breast cancer treatment. **Cell Proliferation**, doi: 10.1111/cpr.12266., 2016.

MACIAS, H.; HINCH, L. Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. v.1, n.4, p. 533-557, 2012.

MAGALHÃES, G.M.; TERRA, E.M.; de OLIVEIRA VASCONCELOS, R.; de BARROS BANDARRA, M.; MOREIRA, P.R.; ROSOLEM, M.C.; ALESSI, A.C. Immunodetection of cells with a CD44+/CD24- phenotype in canine mammary neoplasms. **BMC Veterinary Research**, v.9, p. 205-211, 2013.

MAGALHÃES, G.M.; TERRA, E.M.; CALAZANS, S. G.; de OLIVEIRA VASCONCELOS, R.; ALESSI, A.C. Avaliação da imunomarcagem de células-tronco tumorais em carcinossarcomas mamários e carcinomas em tumores mistos em cadelas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.5, p: 455-461, 2014.

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

MATOS, A.J.F.; SANTOS, A.A. Advances in the understanding of the clinically relevant genetic pathways and molecular aspects of canine mammary tumours: Part 1. Proliferation, apoptosis and DNA repair. **The Veterinary Journal**, v. 205, n.2, p.136-143, 2015.

MÉNARD, S.; PUPA, S.M.; CAMPIGLIO, M.; TAGLIABUE, E. Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer. **Oncogene**, v.22, p. 6570-6578, 2003.

MONLUX, A.W.; ROSZEL, J.F.; MACVEAN, D.W.; PALMER. Classification of epithelial canine mammary tumours in a defined population. **Veterinary Pathology**, v. 14, p. 194-217, 1977.

MORRIS, J. S. Genomic and proteomic profiling for cancer diagnosis in dogs. **Veterinary Journal**, v. 215, p: 101-109, 2016.

MOSCHETTA, M.G.; MASCHIO, L.B.; JARDIM-PERASSI, B.V.; GELALETI, G.B.; LOPES, J.R.; LEONEL, C.; GONÇALVES, N.N.; FERREIRA, L.C.; MARTINS, G.R.; BORIN, T.F.; ZUCCARI, D.A. Prognostic value of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1 α in canine malignant mammary tumors. **Oncology Reports**, v.33, n.5, p.2345-2353, 2015.

MUDALIAR, M. A.; HAGGART, R. D.; MIELE, G.; SELLAR, G.; TAN, K. A.; GOODLAD, J. R.; MILNE, E.; VAIL, D. M.; KURZMAN, I.; CROWTHER, D.; ARGYLE, D. J. Comparative gene expression. Profiling identifies common molecular signatures on NF-kappaB activation in canine and human diffuse large B cell lymphoma. **Public Library of Science One**, v.8, n.9, p:e72591, 2013.

MYAL, Y; LEYGUE, E; BLANCHARD, A.A. Claudin 1 in Breast Tumorigenesis: Revelation of a Possible Novel "Claudin High" Subset of Breast Cancers. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2010, Article ID 956897, DOI 10.1155/2010/956897, 2010.

NIETO, A.M.; CANO, A. The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. **Seminars in Cancer Biology**, v.22, n. 5-6, p. 361-368, 2012.

NIETO, M.A.; HUANG, R.Y.; JACKSON, R.A.; THIERY, J.P. EMT:2016. **Cell**, v.166, n. 1, p: 21-45, 2016.

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

OUBAN, A.; AHMED, A.A. Claudins in human cancer: a review. **Histology and Hystopathology**, v. 25, n. 1, p. 83-90, 2010.

PAWLOSWSKI, K.M.; MACIEJEWSKI, H.; DOLKA, I.; MOL, J.A., MOTYL, T.; KRÓL, M. Gene expression profiles in canine mammary carcinomas of various grades of malignancy. **BMC Veterinary Research**, v.9, p:978, 2013a.

PAWLOSWSKI, K.M.; MACIEJEWSKI, H.; MAJCHRZAK, K.; DOLKA, I.; MOL, J.A., MOTYL, T.; KRÓL, M. Five markers useful for the distinction of canine mammary malignancy. **BMC Veterinary Research**, v.9, p:138, 2013b.

PEÑA, L.; GAMA, A.; GOLDSCHMIDT, M.H.; ABADIE, J.; BENAZZI, C.; CASTAGNARO, M.; DÍEZ, L.; GÄRTNER, F.; HELLMÉN, E.; KIUPEL, M.; MILLÁN,

Y.; MILLER, M.A.; NGUVEN, F.; POLI, A.; SALI, G.; ZAPPULI, V.; de las MULAS, J.M. Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2 and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v.52, n.1, p. 127-145, 2014.

PEROU, C.M.; BORRESEN-DALE, A. Systems Biology and Genomics of Breast Cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.1;3, n. 2, p. a003293, 2011.

PUSZTAIA, L.; MAZOUNIA, C.; ANDERSON, K.; WUC, U.; SYMMNANSC, W.F. Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. **The Oncologist**, v.11, n.8, p. 868-877, 2006.

RAO, N. A.; van WOLFEREN, M.E.; GRACANIN, A.; BHATTI, S. F.; KROL, M.; HOLSTEGE, F. C.; MOL, J.A. Gene expression profile of progesterin-induced canine mammary hyperplasia and spontaneous mammary tumors. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.60, p: 73-83, 2009.

REIMAN, J.M; KNUTSON, K.L; RADISKY, D.C. Immune promotion of epithelial mesenchymal transition and generation of breast cancer stem cells. **Cancer Research**, v.70, n.8, p.3005-3008, 2010.

RICARDO, S. VIEIRA, A.F., GERHARD, R., LEITÃO, D., PINTO, R., CAMESSELE-TEIJEIRO, J.F., MILANEZI, F., SCHMITT, F., PAREDES, J. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. **Clin Pathol**. v.64, p.937-946, 2011.

RICCI-VITIANI, L.; LOMBARDI, D.G.; PILOZZI, E.; BIFFONI, M.; TODARO, M.; PESCHLE, C.; DE MARIA, R. Identification and expansion of human colon cancer initiating cells. **Nature**, v.445, n.7123, p.111-115, 2007.

RICHARDS, K. L.; MOTSINGER-REIF, A. A.; CHEN, H. W.; FEDORIW, Y.; FAN, C.; NIELSEN, D. M.; SMALL, G. W.; THOMAS, R.; SMITH, C.; DAVE, S. S.; PEROU, C.M.; BREEN, M.; BORST, L.B.; SUTER, S.E. Gene profiling of canine B-cell lymphoma reveals germinal center and postgerminal center subtypes with different survival times, modeling human DLBCL. **Cancer Research**, v.73, n.16, p: 5029-5030, 2013.

RODO, A.; MALICKA, E. E-cadherin immunohistochemical expression in mammary gland neoplasms in bitches. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v.11, n.1, p. 47-54, 2008.

ROSSETTI, C.; REIS, Bda. C.; DELGADO, Pde. O.; AZZALIS, L.A.; JUNQUEIRA, V.B.; FEDER, D.; FONSECA, F. Adhesion molecules in breast carcinoma: a challenge to the pathologist. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 61, n. 1, p. 81-85, 2015.

SALLES, M.A.; SANCHES, F.S.F.; PEREZ, A.A.; GOBBI, H. Importância da segunda opinião em patologia cirúrgica mamária e suas implicações terapêuticas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.30, n.12, p. 602-608, 2008.

SANTOS, A.A.; MATOS, A.J.F. Advances in the understanding of the clinically relevant genetic pathways and molecular aspects of canine mammary tumours. Part 2: Invasion, angiogenesis, metastasis and therapy. **The Veterinary Journal**, v. 205, n. 2, p. 144-153, 2015.

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

SASSI, F.; BENAZZI, C.; CASTELLANI, G.; SARLO, G. Molecular-based tumor subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. **BMC Veterinary Research**, v. 6, p. 5, 2010.

SCHNEIDER, R.; DORN, C.R.; TAYLOR, D.O. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *Journal of the National Cancer Institute*, v.43, n.6.; p.1249-1261, 1969.

SCHETTINI, F.; BUONO, G.; CARDALESI, C.; DESIDERI, I.; DE PLACIDO, S.; DEL MASTRO, L. Hormone Receptor/Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-positive breast cancer: Where we are now and where we are going. **Cancer Treatment Reviews**, v.46, p.20-26, 2016.

SHAMIR, E.R.; EWALD, A.J. Adhesion in mammary development: novel roles for E-cadherin in individual and collective cell migration. **Current Topics in Developmental Biology**, v.112, p. 354-376, 2015.

SILVIER, I. A. The anatomy of mammary gland of the dog and cat. **Journal of Small Animal Practice**, v.6, p.689-696, 1966.

SINGER, J.; WEICHELBAUMER, M.; STOCKNER, T.; MECHTCHERIAKOVA, D.; SOBANOV, Y.; BAJNA, E.; WRBA, F.; HORVAT, R.; THALHAMMER, J. G.; WILLMANN, M.; JENSEN-JAROLIM, E. Comparative oncology: ErbB-1 and ErbB-2 homologues in canine cancer are susceptible to cetuximab and trastuzumab targeting. **Molecular Immunology**. v. 50, p.200-209, 2012.

SINGH, A.B.; DHAWAN, P. Claudins and cancer: fall of the soldiers entrusted to protect the gate and keep the barrier intact. **Seminars in cell & developmental biology**, v.42, p.58-65, 2015.

SORENMO, K. U.; KRISTIANSEN, V. M.; COFONE, M. A.; SHOFER, F. S.; BREEN, A. M.; LANGELAND, M.; MONGIL, C. M.; GRONDAHL, A. M.; TEIGE, J.; GOLDSCHMIDT, M. H. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, n. 3, p. 162–172, 2009.

SORENMO, K. U.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M. H.; Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 48, n.1, p. 85-97, 2011.

SORENMO, K.U.; WORLEY, D.R.; GOLDSCHMIDT, M. H. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, J.S.; VAIL, D.M.; PAGE, L.R. (Eds). **WITHROW and MACEWEN'S Small Animal Clinical Oncology**. 5ed. Missouri: Saunders, 2013. p. 538-556.

SLEECKX, N.; DE ROOSTER, H.; VELDHUIS KROEZE, E. J. B.; VAN GINNEKEN, C.; VAN BRANTEGEM, L. Canine mammary tumours, an overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 1112-1131, 2011

SUÁREZ-CALDERÓN, D.M.; DÍAZ-YAMAL, I. Antagonistas de receptores de progesterona (PRA) y moduladores selectivos de receptores de progesterona (SPRM): aplicaciones en ginecología y obstetricia. **Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología**, v. 59, n.1, p. 31-37, 2008.

STOCKINGER, A.; EGER, A.; WOLF, J.; BEUG, H.; FOISNER, R. E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. **The Journal of Cell Biology**, v.154, n. 6, p. 1185-1196, 2001.

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

SUMIGRAY, K.D.; LECHLER, T. Cell adhesion in eidermal development and barrier formation. *Current topics in developmental biology*, v.112, p: 383-414, 2015.

SZASZ, A. M; TOKES, A.M; MICSINAI, M; KRENACS, T; JAKAB,C; LUKACS, L; NEMETH, Z; BARANYAI, Z; DEDE, K; MADARAS, L; KULKA, J. Prognostic significance of claudin expression changes in breast cancer with regional lymph node metastasis. **Clinical & experimental metastasis**, v. 28, n.1, p.55-63, 2011.

THIAGO, L. de S. A persistência dos cânceres e as células-tronco tumorais. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.52, n.6, p: 379, 2006.

van GARDEREN, E.; SCHALKEN, J.A. Morphogenic and tumorigenic potentials of the mammary growth hormone/growth hormone receptor system. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.197, n.1-2, p. 153-165, 2002.

van ROY, F.; BERX, G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n.23, p: 3756-3788, 2008.

VARALLO, G. R.; RAPOSO, T. M. M.; TERRA, E. M.; COSTA, M. T.; DE NARDI, A. B.; DALECK, C. R. Neoplasias mamárias: idade ao diagnóstico, raça e cadeia

mamária mais acometida em cadelas atendidas no HV da UNESP, Jaboticabal, SP. In: Oncovet, 7, 2012, João Pessoa. **Anais do VII Oncovet**, 2012. p. 20-22.

VIEIRA, D.S.C.; DUFLOTH, R.M.; SCHIMITT, F.C.L.; ZEFERNO, L.C. Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, n.1, p. 42-47, 2008.

WANG, F.; YAMAUCHI, M.; MURAMATSU, M.; OSAWA, T.; TSUCHIDA, R.; SHIBUYA, M. RACK1 regulates VEGF/Flt1-mediated cell migration via activation of a PI3-K/Akt pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n.11, p: 9097-9106, 2011.

WATSON, C.J.; KHALED, W. Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. **Development**, v.135, p: 995-1003, 2008.

WHEELOCK, M.J.; SHITANI, Y.; MAEDA, M.; FUKUMOTO, Y.; JOHNSON, K. Cadherin switching. **Journal of Cell Science**, v.121, p: 727-735, 2008.

WENSMAN, H.; GORASNSSON, H.; LEUCHOWIUS, K.J.; STROMBERG, S.; PONTEM, F.; ISAKSSON, A.; RUTTEMAN, G.R.; HELDIN, N.E.; PEILER, G.; HELLMEN, E. Extensive expression of craniofacial related homeobox genes in canine mammary sarcomas. **Breast Cancer Reserach and Treatment**, v.118, v.2, p:333-343.

WU, M.; CAO, M.; HE, Y.; LIU, Y.; YANG, C.; DU, U.; WANG, W.; GAO, F. A novel role of low molecular weight hyaluronan in breast cancer metastasis. **FASEB Journal**, v. 29, n.4, p: 1290-1298, 2015.

TAN, J.X.; WANG, X.Y., LI, H.Y.; SU, X.L.; WANG, L.; LI, H.Y., SHI, Y.; WANG, L.; REN, G.S. Upregulation of HYAL1 Expression in Breast Cancer Promoted Tumor Cell Proliferation, Migration, Invasion and Angiogenesis. **PloS One**, v. 6, n.7, e22836, 2011a.

TAN, J.X.; WANG, X.Y., LI, H.Y.; SU, X.L.; WANG, L.; RAN, L.; ZHENG, K.; REN, G.S. HYAL1 overexpression is correlated with the malignant behavior of human breast cancer. **International Journal of Cancer**, v.128, n.6, p:1303-13015, 2011b.

YOSHIDA, R.; KIMURA, N.; HARADA, Y.; OHUCHI, N. The loss of E-cadherin, alpha- and beta-catenin expression is associated with metastasis and poor prognosis in invasive breast câncer. **International Journal of Oncology**, v.18, n. 3, p:513-520, 2001.

YOSHIDA, K.; YOSHIDA, S.; CHOISUNIRACHON, N.; SAITO, T.; MATSUMOTO, K.; SAEKI, K.; MOCHIZUKI, M.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N.; NAKAGAWA, T. The Relationship between Clinicopathological Features and Expression of Epithelial and Mesenchymal Markers in Spontaneous Canine Mammary Gland Tumors. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.76, n.4, p. 1321-1327, 2014.

ZUCCARI, D.A.P.C.; PAVAM, M.V.; TERZIAN, A.C.B.; PEREIRA, R.S.; RUIZ, C.M.; ANDRADE, J.C. Immunohistochemical evaluation of e-cadherin, Ki-67 and PCNA in canine mammary neoplasias: correlation of prognostic factors and clinical outcome. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.4, p. 207-215, 2008.

APÉNDICE

ANEXO 1: Protocolo Bionalyser

Agilent 2100 –Teste RNA – Célula Eucariota

Preparo do RNA Ladder

1. Centrifugue brevemente a ladder e pipete num tubo RNase-free
2. Aqueça a ladder durante 2 min a 70°C
3. Adicione 90 µL de água livre de RNase e misture
4. Prepare alíquotas de 0,5 µL
5. Armazene as alíquotas a -70°C

Preparo do Gel

1. Retire o kit do freezer e deixe estabilizar em temperatura ambiente durante 30 minutos
2. Coloque 550 µL do RNA Agilent 6000 Nano matriz gel no filtro de rotação (vermelho).
3. Coloque o filtro de centrifugação numa microcentrífuga e centrifugue durante 10 minutos a 1500g
4. Aliquote 65 µL do gel filtrado em tubos de 0,5 mL livres de RNase. Armazene a 4°C por até um mês.



Preparo do Gel Dy-Mix

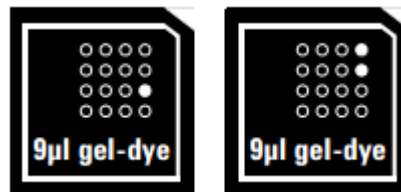
1. Coloque os reagentes (RNA 6000 Pico dye concentrate – azul) em temperatura ambiente durante 30 minutos antes do uso.
2. Homogeneize o RNA 6000 Nano corante concentrado (azul) no vortex por 10 segundos e dar um spin down
3. Adicione 1 µl do RNA 6000 Nano corante concentrado (azul) na alíquota de 65 do gel filtrado
4. Centrifugue em temperatura ambiente durante 10 minutos a 13000 g. Use o gel dy-mix em 1 dia.




Carregando o Gel Dy-Mix

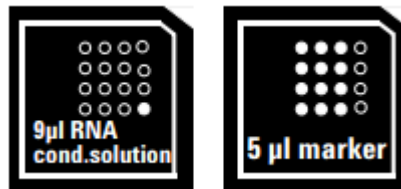
1. Deixe o gel dy-mix equilibrar em temperatura ambiente durante 30 minutos (proteger da luz)

2. Pegue um novo RNA nano chip.
3. Coloque o chip na estação chip priming
4. Pipete 9.0 μl do gel dy-mix e coloque no poço marcado e descarte o gel dy-mix .
5. Defina o temporizador para 30 segundos e se certifique de que o êmbolo esteja posicionado em 1 mL, e, em seguida, feche a estação de chip de priming.
6. Pressione o êmbolo da seringa para baixo até que seja preso pelo clipe
7. Aguarde 30 segundos e solte o êmbolo
8. Verifique que o êmbolo se move para trás, pelo menos, à marca de 0,3 mL.
9. Aguarde 5 segundos, em seguida, lentamente puxe o êmbolo para a posição de 1 mL.
10. Abra a estação de chip de priming.
11. Pipete 9,0 μL da mistura de corante de distribuição do gel em cada um dos poços marcados .
12. Descarte o gel-dye mix que sobrou.



Carregando o RNA 6000 pico Conditioning Solution (Branco) e Marcador

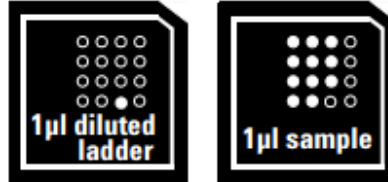
1. Pipete 9,0 μL do RNA 6000 Pico Conditioning Solution (branco) no poço marcado
2. Pipete 5 μL do RNA 6000 Pico marker em todas os 11 poços das amostras, bem como no poço marcado .



Carregando a Ladder Diluída e as Amostras

1. Pipete 1 μL da alíquota ladder aquecida e desnaturada no poço marcado
2. Pipete 1 μL da amostra (no caso o RNA das amostras) em cada poço (total 11)

3. Pipete 1 μ L do RNA 6000 Pico marker (verde) nos poços que não foram usados (caso tenha)
4. Coloque o chip no adaptador e vortex por 1 min na centrifugação indicada (2400 rpm)
5. Corra o chip no equipamento Agilent 2100 bioanalyzer dentro de 5 min



ANEXO 2: Protocolo Microarray (Affymetrix)

DIA 1

1. Preparo do RNA controle

Adicione 2 μL do RNA controle (Hela) em 78 μL de água livre de nuclease.

Para a reação controle, foi utilizado 2 μL dessa solução.

2. Preparo do RNA Poly- A Controles

Para o preparo do RNA controle com as caudas Poly-A foi realizada a diluição seriada do Poly-A RNA stock, conforme especificado na tabela 2.

Tabela 2: Diluição seriada do Poly-A RNA Stock controle.

Diluição Seriada					
Total RNA	de	1ª Diluição	2ª Diluição	3ª Diluição	4ª Diluição
100 ng		1:20	1:50	1:50	1:4

Essas diluições foram preparadas conforme a sequência descrita abaixo:

2.1. Adicione 2 μL da Poly-A controle stock em 38 μL do tampão controle poly-A Dil para o preparo da primeira diluição (1:20);

2.2. Adicione 2 μL da 1ª diluição em 98 μL do tampão controle poly-A Dil para o preparo da segunda diluição (1:50);

2.3. Adicione 2 μL da segunda diluição em 98 μL do tampão controle poly-A Dil para o preparo a preparo da terceira diluição (1:50);

2.4. Adicione 2 μL da terceira diluição 18 μL de do tampão controle poly-A Dil para o preparo a preparo da quarta diluição (1:10);

2.5. Adicione 2 μL dessa quarta diluição nas amostras com 100 ng de RNA total. A tabela 3 especifica, para cada reação, o volume de cada componente para o preparo das amostras. O volume final não deve exceder 5 μL .

Tabela 3. Solução do RNA/Poly-A controle

Componente	Volume para UMA Reação
Amostra de RNA total (100ng)	variável
Poly-A controle (4ª Diluição)	2 μL
Água livre de nuclease	variável
Volume total	5 μL

3. Síntese da Primeira Cadeia de cDNA

3.1 Preparo do First-Strand Master Mix

- Para cada reação, foram adicionados 4 μL do tampão first-strand e 1 μL da enzima first-strand. Em seguida, foram transferidos 5 μL dessa solução para cada amostra.

- Homogeeinize no vortex e, em seguida, dê um spin rápido.

3.2 Termocilcador

- Incube por uma hora a 25°C, depois a 1 hora a 42°C e, por fim, 2 minutos a 4°C (termociclador).

- Spin rápido.

- Coloque as amostras no gelo para o próximo passo.

4. Síntese da Segunda Cadeia de cDNA

4.1 Preparo do Second-Strand Master Mix

- O volume para cada reação não deve ultrapassar 20 μL . Para tanto, adicione 18 μL do tampão second-strand e 2 μL da enzima second-strand.

- Homogeeinize no vortex.

- Spin rápido.

- Adicione 20 μL desse mix às amostras (fita simples de cDNA).

- Homogeeinize no vortex.

- Spin rápido.

4.2. Termociclador

- Incube durante uma hora a 16°C e, após, dois minutos a 4°C.

- Spin rápido.

- Amostras (placa) no gelo.

5. Síntese do cRNA por transcrição in vitro

Importante: essa nova etapa é realizada em temperatura ambiente.

5.1 Preparo do ITV Master Mix

- Preparo do ITV master mix: para uma reação, adicione em um microtubo 24 μL do tampão ITV e 6 μL da enzima ITV.

- Homogeeinize no vórtex.
- Transfira 30 do master mix ITV para cada amostra de cDNA dupla fita.
- Homogeeinize no vórtex.
- Spin rápido.

5. 2 Termociclador

- Incube as amostras durante 16 horas a 40°C e, após a 4°C.
- Spin rápido.

***Primeiro ponto de parada**

DIA 2

6. Purificação do cRNA com Beads

- 6.1** Estabilize as beads em temperatura ambiente e homogeeinize no vortex.
- 6.2** Adicione 100 µL das beads em cada amostra de cRNA.
- 6.3** Homogeeineze por pipetagem (10x).
- 6.4** Transfira as amostras para uma placa com fundo em U.
- 6.5** Homogeeinize bem (10x) por pipetagem.
- 6.6** Incube durante 10 minutos.
- 6.7** Coloque a placa sob uma raque magnética.
- 6.8** Espere 5 minutos – as amostras voltam a ficar incolor e forma um botão marrom no lado do imã .
- 6.9** Aspire e descarte o sobrenadante – NUNCA incomode as beads.
- 6.10** Lave as beads com etanol 80% (200 µL) e incube durante 30 segundos.
- 6.11** Remova o etanol sem incomodar as beads.
- 6.12** Lave 3 vezes com etanol 80%.
- 6.13** Após remover o etanol da última lavagem e, ainda sobre a raque magnética, deixe as amostras secar em temperatura ambiente por volta de 5 minutos.
- 6.14** Para a eluição do RNA.
 - Remova a placa da raque magnética.
 - Adicione 27 µL de água livre de nuclease pre-aquecida a 65°C e aguarde 1 minuto.
 - Homogeeinize por pipetagem 10 vezes.

- Reposicione a placa na raque magnética e aguarde 5 minutos.
- Transfira o sobrenadante (cRNA) em um microtubo.
- Coloque a placa no gelo.
- Quantificação.

7. Síntese da primeira cadeia do cDNA – Segundo Ciclo

Pré-requisito: 15 µg de cRNA

15 µg de cRNA em 24 µL de água livre de nuclease.

7.1 Preparo do cRNA e do Mix dos primers do segundo ciclo

- Misture 24 µL do cRNA (15µg) com 4 µL dos primers.
- Homogeeinize no vortex.
- Spin rápido.
- Termociclador: 5 minutos a 70°C, depois 5 minutos a 25°C, após 2 minutos a 4 °C (ciclo de anelamento).
- Spin rápido

7.2 Preparo do ss-cDNA Master Mix – Segundo Ciclo

- Em um microtubo, adicione 8 µL do tampão ss-cDNA segundo ciclo e 4 µL da enzima ss-cDNA segundo ciclo.
- Homogenize no vortex.
- Spin rápido.
- No gelo, transfira 12 µL desse master mix para cada amostra (cRNA/primers do 2ºciclo).
- Homogeeinize no vortex.
- Spin rápido.
- Termociclador: incube durante 10 minutos a 25°C, depois 90 minutos a 42°C, após 10 minutos a 70C°, e por fim 2 minutos a 4°C.
- Spin rápido
- Amostras no gelo.

8. Hidrolise do RNA com RNase H

- No gelo:
- Adicione 4 µL de RNase H em cada amostra deo 2ºciclo ss-cDNA.

- Homogeeinize no vortex.
- Spin.
- Termociclador: 45 minutos a 37°C, depois 5 minutos a 95°C, e por fim 2 minutos a 4°C.
- Spin.
- Adicione 11 µL de água livre de nuclease nas amostras.
- Homogeeinize no vórex.
- Spin rápido.

9. Purificação do cDNA fita simples – Segundo Ciclo

9.1 Purificação do ss-cDNA com as beads

- Estabilize as beads em temperatura ambiente e homogeeinize no vortex
- Adicione 100 µL das beads em cada amostra de cRNA, homogeeinize por pipetagem e transfira as amostras para uma placa com fundo em U.
- Adicione 150 µL de etanol a 100% em cada amostra de ss-cDNA 2ºciclo.
- Homogenize por pipetagem 10x e deixe incubando por 20 minutos.
- Coloque a placa em uma raque magnética e aguarde a formação dos botões das beads até as amostras ficarem novamente transparentes (cerca de 5 minutos).
- aspire o sobrenadante sem incomodar as beads.
- Adicione 200 µL de etanol 80% para lavar as amostras e incube durante 30 segundos.
- Cuidadosamente, aspire e descarte o etanol.
- Lave 3 vezes.
- Após a última lavagem, deixe secar em temperatura ambiente por cerca de 5 minutos.

9.2 Eluição do ss-cDNA

- Remova a placa da raque magnética.
- Para cada amostra, adicione 30 µL de água livre de RNase pré-aquecida a 65°C e espere 1 minuto.
- Homogeeinize por pipeagem 10 vezes.
- Reposicione a placa na raque magnética e espere cinco minutos.
- Trasfira o sobrenadante em microtubos (contém o ss-cDNA).

- Amostras no gelo.
- Quantificação.

DIA 3

10. Fragmentação e marcação da fita simples do cDNA

Para essa nova etapa é necessário 5.5 µg de ss-cDNA fita simples

10.1 Preparo do ss-cDNA

- Adicione 5.5 µg da amostra em 31.2 µL de água livre de nuclease.
- Em um microtubo, prepare o master mix de fragmentação. Faça no gelo. Para uma reação, adicione 10 µL de água livre de nuclease, 4.8 µL do tampão de fragmentação de cDNA 10X, 1 µL de UDG e 1 µL de APE1.
- Homogeeinize e centrifugue.
- Transfira 16.8 µL desse master mix para cada amostra.
- Homogenize no vortex.
- Spin rápido.
- Termociclador: 1 hora a 37°C, 2 minutos a 93°C, depois 2 minutos a 4°C.
- Spin rápido.

11. Marcação

- No gelo, transfira 45µL do ss-cDNA fragmentado para microtubos ou placas.
- Prepare o master mix de marcação. Em um microtubo, adicione 12 µL do tampão TdT 5X, 1 µL do reagente de marcação do DNA, 2 µL do dt 30U/µL.
- Transfira 15µL desse master mix para as amostras.
- Homogeeinize em vórtex.
- Spin rápido.
- Termociclador: incube por 1 hora a 37°C, depois 10 minutos a 70°C e, por fim, 2 minutos a 4°C.
- Spin rápido.

12. Hibridização

12.1 Preparo do Maxter Mix

Observação: Prepare o master mix de hibridização em temperatura ambiente.

- Pré –aqueça o controle de hibridização 20X por 5 minutos a 65°C no forno de hibridização.
- A tabela 4 especifica os reagentes e quantidade de cada um para o preparo do master mix de hibridização suficiente para uma reação.

Tabela 4: Master mix de hibridização

Reagentes	Volume	Concentração Final
Fragmentação e Marcação do ss-DNA	3.5 µg	23 ng/ µL
Oligo B2 (3nM) controle	2.5 µL	50pM
Controle hibridização 20X	7.5 µL	25pM
Hibridização Mix 2X	75 µL	1X
DMSO	10.5 µL	7%
Água livre de nuclease	13.5 µL	

- Homogeeinize no vortex.
- Spin rápido.

13.Preparo do coquetel de hibridização

- Em temperatura ambiente, prepare o coquetel de hibridização: 109 µL do master mix de hibridização e 41 µL da amostra.
- Homogeeinize no vortex.
- Spin rápido.
- Termociclador: incube as amostras durante 5 minutos a 95°C, depois minutos a 45°C.
- Spin rápido.
- Injetar 130 µL do coquetel no chip de array e cubra os orifícios com adesivos.
- Incube o chip no forno: rotação de 60rpm durante 16 horas a 45°C.

14. Lavagem do Array e Marcação

- Remova os arrays do forno de hibridização.
- Remova os adesivos.
- Retire o coquetel de hibridização do interior de cada chip e o reserve em microtubos (opcional – estocar a -20°C).
- Preencha os chips com tampão de lavagem .
- Antes de iniciar a lavagem, aguarde o chip estabilizar em temperatura ambiente.
- Estação fluidica: coloque 3 microtubos em cada suporte (1, 2 e 3). No suporte 1, adicione 600 µL do coquetel de marcação 1 . No suporte 2, 600 µL do coquetel de marcação 2. No suporte 3, adicione 800 µL do tampão Array Holding.
- Lave as amostras conforme o tipo de array usado no teste.

15. Scanner dos chips

- Digitalize os chips no scanner Affymetrix GeneChip 3000.