

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**VALOR PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO GÊNICA E
PROTEICA DO ATM, p53 E VEGF EM CADELAS COM
NEOPLASIAS MAMÁRIAS**

Talita Mariana Morata Raposo

Mestranda em Medicina Veterinária.

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**VALOR PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO GÊNICA E
PROTEICA DO ATM, p53 E VEGF EM CADELAS COM
NEOPLASIAS MAMÁRIAS**

Talita Mariana Morata Raposo

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Renée Laufer Amorim

Coorientador(a): Prof^a. Dr^a. Mirela Tinucci Costa

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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

TALITA MARIANA MORATA RAPOSO - nascida no dia 20 de março de 1985, natural de Rio Claro, estado de São Paulo. Graduada no curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Araçatuba, no ano de 2008. Desenvolveu dois projetos de iniciação científica, sem bolsa, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Maria Cecília Rui Luvizotto, na área de Anatomia Patológica Geral Veterinária e do Prof. Dr. Alexandre Lima de Andrade, na área de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais. Durante a graduação, participou de vários cursos e estágios, sendo a maioria relacionada com as áreas de Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais. Ainda no último ano da graduação (2008) estagiou na Universidade Técnica de Lisboa (Portugal), onde acompanhou atendimento clínico e cirúrgico de pequenos animais. No período de 2009 a 2011 foi residente do Programa de Aprimoramento da Universidade de Franca/UNIFRAN, sob orientação do Prof. Ms. Daniel Kan Honsho, na área de Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais. Neste período, publicou vários resumos científicos em anais de congressos, além de participar de projetos de pesquisa científica. Em março de 2011 foi aprovada no Programa de Pós-Graduação (Mestrado) em Medicina Veterinária (Clínica Médica), na FCAV/UNESP de Jaboticabal, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Renée Laufer Amorim e coorientação da Prof^a. Dr^a. Mirela Tinucci Costa. Palestras e aulas foram ministradas durante o período de residência e de mestrado sobre Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais e de Oncologia Veterinária (aulas para disciplinas de graduação e pós-graduação da UNIFRAN, simpósios realizados nesta mesma instituição, aula no Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná, Rondônia, aula para disciplina de pós-graduação no Programa de Medicina Veterinária – UNESP de Jaboticabal). Durante o período de 2011 a 2013 foi monitora e aluna do curso *latu sensu* de Oncologia Veterinária, Instituto Bioethicus em Botucatu. Durante este período também participou do atendimento especializado no Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, FCAV/UNESP de Jaboticabal, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Mirela Tinucci Costa.

"A viagem da descoberta consiste não em achar novas paisagens, mas em ver com
novos olhos."

Marcel Proust

Ao meu amor e companheiro sempre presente em todos os momentos de minha vida Juarez, aos meus pais Ana e Darcy, ao meu irmão Rodrigo e aos meus avós Rosa e Antônio dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus por ter me abençoado com a maravilhosa família que tenho, sempre presente e me apoiando em todas as minhas decisões e planos de vida e também agradeço por permitir a realização de mais um sonho.

A todos os meus parentes, em especial minha avó Nair (*in memorian*), que se preocupam comigo e sempre me oferecem conforto e me dão o prazer de suas companhias.

Aos anjinhos que por algum motivo entraram em minha vida e fizeram despertar minha vontade de estar sempre perto deles e prezando pelo seu bem-estar e saúde, Sapeca, Jack, Átila, Mel, Sol, Nick, Mia e Doroty, além de muitos outros que fizeram da minha vida mais feliz.

À minha querida orientadora Prof^a Dr^a. Renée Laufer Amorim, pessoa de bom coração, sempre me mostrou um exemplo a ser seguido pela sua competência, paciência, dedicação e por estar sempre oferecendo além de orientação, amizade, querendo sempre ver o crescimento dos seus orientados, não só profissional, mas pessoal, almejando principalmente nossa felicidade, além de nossas conquistas.

À minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Mirela Tinucci Costa, que contribuiu muito para a realização deste trabalho, me acolhendo nesta instituição e sempre me oferecendo apoio em tudo que precisei.

Ao meu querido amigo Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi que me fez despertar para o mundo da Oncologia, me ajudou a descobrir minha vocação e hoje se tornou um grande amigo, sempre prestativo e também presente na realização deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Sílvia R. Rogatto que cedeu seu laboratório para a realização deste trabalho, agradeço também pelos muitos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Geovanni D. Cassali que contribuiu com seu conhecimento para a concretização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Júlio Carlos Canola e Prof. Dr. Áureo E. Santana pela disposição e contribuição com este trabalho.

Aos meus queridos amigos, os antigos por permanecerem presentes, me apoiando nesta fase de minha vida e aos novos que tive a felicidade de conhecer e de poder crescer junto com eles e também de sermos companheiros de atendimento

junto ao SOV, que além de contribuírem bastante com a realização deste trabalho, me ajudaram a transformar os dias difíceis em dias mais alegres, como Paulo, Giovanna, Érika, Rosana, Lívia, Marília, Letícia, além da Michelle, Geórgia, Mayara, Mônica (Bombom), Sabryna Calazans e Marcela Marcondes.

Aos meus queridos amigos do Laboratório Neogene que tiveram grande contribuição para a concretização deste trabalho e fizeram deste caminho mais leve e prazeroso Renata, Carol, Naiara, Maísa, Sandra e Márcio.

Ao meu querido amigo Cadu, peça fundamental deste trabalho e agora de minha vida.

Aos funcionários Eugênio, Matheus e Val muito obrigada pelo apoio e disposição.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), UNESP Jaboticabal, ao Programa de Pós-graduação, Departamento de Medicina Veterinária e à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP Botucatu pela estrutura e dedicação.

À FAPESP pelo fornecimento da bolsa de estudos e também de auxílio financeiro necessário para a realização desta dissertação de mestrado.

A todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho a minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO CEUA	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT	xviii
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Neoplasias mamárias caninas.....	22
2.2 Marcadores prognósticos	23
2.3 ATM, p53 e VEGF	26
3 OBJETIVOS	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Grupos experimentais	31
4.2 Coleta e armazenamento das amostras.....	35
4.3 Macrodissecção e extração do RNA	36
4.4 Transcrição reversa.....	36
4.5 RT-PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR).....	37
4.6 Análise imuno-histoquímica.....	38
4.7 Contagem das células marcadas	39
4.8 Análise estatística.....	40
5 RESULTADOS	41
5.1 Análise de expressão gênica.....	41
5.2 Associação entre expressão gênica do <i>ATM</i> , <i>TP53</i> e <i>VEGF</i> com as variáveis clínicas e histopatológicas.....	45
5.3 Análise da expressão proteica do ATM, p53 e VEGF	49
5.4 Análise de expressão proteica do ATM, p53 e VEGF e associação com as variáveis clínico-histopatológicas	54

5.5 Correlação entre os resultados da expressão gênica e proteica do ATM, p53 e VEGF.....	59
5.6 Análise de sobrevida das pacientes com carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos	61
6. DISCUSSÃO	66
7. CONCLUSÃO.....	79
8. REFERÊNCIAS.....	80
APÊNDICE	95
APÊNDICE A – Localização das metástases caracterizadas no grupo 4	96

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV/UNESP (Protocolo nº 028129/10)

LISTA DE TABELAS

	Página	
Tabela 1	Dados clínicos como raça, idade, castração, pseudociese e uso de contraceptivos das pacientes pertencentes aos grupos 2, 3 e 4.	33
Tabela 2	Parâmetros clínicos como recidiva, ulceração, tamanho tumoral, <i>status</i> nodal e tratamento das pacientes dos grupos 3 e 4.	34
Tabela 3	Tipo histológico, grau de malignidade e estadiamento clínico dos tumores das pacientes dos grupos 3 e 4.	35
Tabela 4	Sequência dos iniciadores utilizados na análise de expressão gênica.	37
Tabela 5	Diluições, clones e procedência de anticorpos utilizados em mamas normais e tumorais, cortes parafinizados.	38
Tabela 6	Tecido utilizado como controle positivo, localização, escore e intensidade da imunomarcção da glândula mamária normal para os anticorpos testados	40
Tabela 7	Análise de correlação de expressão relativa dos genes alvos.	45
Tabela 8	Resultados da análise da expressão proteica da proteína ATM detectada pela técnica de imuno-histoquímica em mamas normais, lesões benignas, carcinomas mamários não metastáticos e carcinomas metastáticos avaliados pelo escore de marcação nos tecidos.	49
Tabela 9	Resultados da análise de intensidade de marcação da proteína ATM nos quatro grupos estudados.	49
Tabela 10	Resultados da análise de distribuição de marcação da proteína p53 nos quatro grupos estudados.	51
Tabela 11	Resultados da extensão de imunomarcção (escore) da proteína VEGF nos quatro grupos estudados.	51

Tabela 12	Resultados da análise de intensidade de marcação proteica do VEGF nos quatro grupos estudados.	51
Tabela 13	Análise de correlação de expressão das proteínas ATM, p53 e VEGF.	54
Tabela 14	Associação entre os dados clínicos e histopatológicos com o escore de imunomarcção da proteína ATM detectada pela imuno-histoquímica. Os valores de p foram obtidos pelo teste de Quiquadrado.	54
Tabela 15	Associação entre a intensidade de expressão proteica do ATM com as variáveis clínico-histopatológicas. Os valores de p foram obtidos pelo teste de Quiquadrado.	55
Tabela 16	Associação entre o escore de imunomarcção da proteína p53 com as variáveis clínico-histopatológicas. Os valores de p foram obtidos pelo teste de Quiquadrado	56
Tabela 17	Associação entre os dados clínicos e histopatológicos e o escore de imunomarcção da proteína VEGF. Os valores de p foram obtidos pelo teste de Quiquadrado.	57
Tabela 18	Associação entre a intensidade de imunomarcção da proteína VEGF com os dados clínicos e histopatológicos. Os valores de p foram obtidos pelo teste de Quiquadrado	58

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Via de sinalização gênica e controle do <i>ATM</i> .	29
Figura 2	Média do coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos genes de referência.	42
Figura 3	Determinação do número adequado de genes de referência para normalização da expressão dos genes alvos, demonstrando que com o uso dos três transcritos já se obtém uma normalização confiável.	42
Figura 4	Expressão relativa dos genes <i>ATM</i> , <i>TP53</i> e <i>VEGF</i> avaliados por RT-qPCR em tecidos mamários normais, benignos, carcinomas mamários não metastáticos e metastáticos e, em relação aos tecidos normais e tumorais (carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos). Os níveis de expressão relativa de cada gene estão apresentados em escala logarítmica. Os valores de P foram obtidos pelo teste de Kruskal-Wallis para as múltiplas comparações e Mann-Whitney para análise entre pares. O número de amostras analisadas variou entre os genes alvos, uma vez que amostras com resultados não confiáveis foram excluídas da análise.	44
Figura 5	Níveis de transcritos de <i>ATM</i> segundo: A. tipo histológico; B. grau de malignidade; C. tamanho do tumor (T); D. <i>status</i> nodal; E. idade; F. recidiva; G. ulceração tumoral; H. castração; I. uso de contraceptivo; J. pseudociese. A mediana de expressão para cada característica analisada está apresentada no gráfico. Os valores de P foram obtidos pelo teste de Mann Whitney nas comparações entre os pares e pelo teste de Kruskal-Wallis para as múltiplas comparações. Ca= carcinoma, 0 = ausente e 1= presente.	46
Figura 6	Níveis de transcritos de <i>TP53</i> segundo: A. tipo histológico; B. grau de malignidade; C. tamanho do tumor (T); D. <i>status</i> nodal	

(N); **E.** idade; **F.** recidiva; **G.** ulceração tumoral; **H.** castração; **I.** uso de contraceptivo; **J.** pseudociese. A mediana de expressão para cada característica analisada está apresentada no gráfico. Os valores de P foram obtidos pelo teste de Mann Whitney nas comparações entre os pares e pelo teste de Kruskal-Wallis para as múltiplas comparações. Ca= carcinoma, 0= não e 1= presente.

47

Figura 7 Níveis de transcritos de *VEGF* segundo: **A.** tipo histológico; **B.** grau de malignidade; **C.** tamanho do tumor (T); **D.** *status* nodal (N); **E.** idade; **F.** recidiva; **G.** ulceração tumoral; **H.** castração; **I.** uso de contraceptivo; **J.** pseudociese. A mediana de expressão para cada característica analisada está apresentada no gráfico. Os valores de P foram obtidos pelo teste de Mann Whitney nas comparações entre os pares e pelo teste de Kruskal-Wallis para as múltiplas comparações. Ca= carcinoma, 0= ausente e 1= presente.

48

Figura 8 Fotomicrografia de imunomarcção citoplasmática e/ou membranosa da proteína ATM. **A.** Mama normal: escore 4 e intensidade 2. **B.** Tumor misto benigno: escore 4 e intensidade 1. **C.** Carcinoma em tumor misto não metastático: escore 4 e intensidade 2. **D.** Carcinoma tubular metastático: escore 3 e intensidade 1.

50

Figura 9 Fotomicrografia de imunomarcção nuclear da proteína p53. **A.** Mama normal: escore 4. **B.** Adenoma mamário: escore 4. **C.** Carcinoma tubular não metastático: escore 1. **D.** Carcinoma tubular metastático: escore 1.

52

Figura 10 Fotomicrografia de imunomarcção citoplasmática da proteína VEGF. **A.** Mama normal: escore 1 e intensidade 1. **B.** Hiperplasia mamária: escore 1 e intensidade 1. **C.** Carcinoma sólido não metastático: escore 4 e intensidade 2. **D.** Carcinoma anaplásico metastático: escore 4 e intensidade 2

53

Figura 11 Comparação entre os níveis de expressão gênica e proteica

- (escores 1 a 4) do ATM nos tumores benignos, carcinomas mamários não metastáticos e metastáticos, resultado obtido pelo teste de Kruskal-Wallis. 60
- Figura 12 Comparação entre os níveis de expressão gênica e proteica do p53 (escores 1 a 4) nos tumores benignos, carcinomas mamários não metastáticos e metastáticos, resultado obtido pelo teste de Kruskal-Wallis. 60
- Figura 13 Comparação entre os níveis de expressão gênica e proteica do VEGF (escores 1 a 4) nos grupos 2, 3 e 4, resultado obtido pelo teste de Kruskal-Wallis. 61
- Figura 14 Tempo de sobrevida global das pacientes com carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos. 62
- Figura 15 Avaliação do tempo de sobrevida global das pacientes em relação aos parâmetros clínicos e histopatológicos. **A.** Tipo histológico. **B.** Grau de malignidade. **C.** Tamanho tumoral. **D.** *Status* nodal. 62
- Figura 16 Avaliação do tempo de sobrevida global das pacientes em relação aos parâmetros clínicos. **A.** Idade. **B.** Recidiva. **C.** Ulceração tumoral. **D.** *Status* reprodutivo. **E.** Uso de contraceptivo. **F.** Pseudociese. 63
- Figura 17 Avaliação do tempo de sobrevida global das pacientes em relação à expressão gênica e proteica do ATM, p53 e VEGF. **A.** Expressão gênica do ATM. **B.** Expressão proteica do ATM. **C.** Expressão gênica do TP53. **D.** Expressão proteica do p53. **E.** Expressão gênica do VEGF. **F.** Expressão proteica do VEGF. 64
- Figura 18 Avaliação do tempo de sobrevida global das pacientes em relação ao tratamento utilizado (cirúrgico ou cirúrgico associado ao tratamento quimioterápico). QT=quimioterapia 65

VALOR PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DO ATM, p53 E VEGF EM CADELAS COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS

RESUMO – O tumor de mama é o principal tumor que acomete as cadelas e seu comportamento biológico se assemelha com o que ocorre nas mulheres; com isso as cadelas podem ser um excelente modelo comparativo para o estudo do processo carcinogênico desta neoplasia. A metástase é uma consequência comum e a principal causa de mortalidade por esta doença. A identificação de marcadores tumorais pode ser uma ferramenta útil para a determinação do prognóstico pelo câncer de mama. Assim, os objetivos deste estudo foram avaliar a expressão gênica e proteica do ATM, p53 e VEGF na glândula mamária de cadelas e tentar correlacioná-las com a evolução tumoral e possível envolvimento metastático. Com isso foram utilizadas 53 amostras de glândula mamária de cadelas divididas em quatro grupos: G1= mamas normais, G2 = lesões mamárias benignas, G3 = carcinomas mamários não metastáticos e G4 = carcinomas mamários metastáticos. A análise de expressão gênica foi realizada pelo método de RT-qPCR e de expressão proteica pelo método de imuno-histoquímica. Baixa regulação de transcritos do *ATM* foi observada entre as neoplasias e as mamas normais, além da diminuição de níveis proteicos, sendo esta diminuição maior no grupo 4 quando comparado com o grupo 1. Os transcritos de *TP53* e *VEGF* não apresentaram diferença estatística entre os grupos analisados. Entretanto, verificou-se diminuição proteica da p53 e aumento da proteína VEGF nos carcinomas mamários metastáticos em comparação com a mama normal. As expressões gênica e proteica do ATM apresentaram comportamento semelhante ao observado em mulheres, assim, o processo de desenvolvimento de metástase do carcinoma mamário pode ser semelhante em ambas as espécies. O aumento da expressão proteica do VEGF e a diminuição do ATM estavam principalmente relacionados com o grupo quatro, portanto com tumores de pior prognóstico, assim, estas proteínas podem auxiliar no estabelecimento do prognóstico do tumor mamário.

Palavras-chave: ATM, cadelas, mama, marcadores prognósticos e metástases.

PROGNOSTIC VALUE OF ATM, p53 E VEGF GENE AND PROTEIN EXPRESSION IN BITCHES WITH BREAST NEOPLASMS

ABSTRACT – Canine mammary tumor is the major tumor that affects bitches and their biological behavior is similar to what occurs in women, so bitches can be an excellent comparative model for the study of the carcinogenic process in this type of neoplasm. Metastasis is a common consequence and the major cause of death by the tumor. Identification of tumor markers can be a useful tool for determining the prognosis of mammary gland cancer. So, the objectives of this study were to evaluate ATM, p53, and VEGF gene and protein expression in canine mammary tissues and try to correlate them with tumor development and metastatic involvement potential. Therefore 53 bitches mammary gland tissue samples were used divided in four groups: G1 = normal mammary glands, G2: benign mammary lesions, G3 = non-metastatic mammary gland carcinomas and G4 = metastatic mammary gland carcinomas. Gene expression analysis was performed by RT-qPCR and protein expression by immunohistochemistry. Down-regulation of ATM transcripts was observed between tumor tissue and normal mammary gland and protein levels were also reduced, it was mainly observed in group 4 when compared to group 1. TP53 and VEGF markers did not show statistical difference in gene expression among the groups. However, it was observed lower level of p53 protein in malignant tumors and higher level of VEGF protein in tumor tissues. ATM showed similar behavior when compared to women, so tumorigenesis process of breast cancer may be similar in both species. The increase in VEGF protein expression and ATM decrease were mainly related in poor prognosis tumors, thereby the evaluation of these markers can aid support the establishment of the prognosis of this disease.

Keywords: ATM, bitches, mammary gland, prognostic markers and metastasis.

1 INTRODUÇÃO

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

Na mulher, estima-se o surgimento de um milhão de novos casos a cada ano em todo o mundo e no Brasil a estimativa de novos casos no ano de 2012 foi de 52.680, com um risco de 52 casos para cada 100 mil mulheres. A sobrevida média das mulheres após cinco anos do diagnóstico desta enfermidade é de 61% na população mundial (INCA, 2012).

A causa mais comum de mortalidade pelo câncer de mama tanto na mulher como na cadela se deve às metástases do tumor primário aos órgãos distantes (GUPTA et al., 2007; DE NARDI et al., 2009; KLOPFLEISCH; GRUBER, 2009).

A exata patogênese molecular do desenvolvimento do tumor de mama e da metástase ainda é desconhecida (KLOPFLEISCH; GRUBER, 2009). Entretanto, pesquisas recentes sobre determinantes genéticos de metástases identificaram conjuntos de genes ou “assinaturas gênicas” relacionados com alto risco de metástases e baixa sobrevida (GUPTA et al., 2007).

A identificação de marcadores que possam prever o comportamento dos tumores é especialmente importante no câncer de mama devido, sobretudo, à variabilidade na progressão clínica da doença (CAPELOZZI, 2001; EISENBERG; KOIFMAN, 2001; ALMEIDA et al., 2007).

Neste contexto, marcadores como ATM, p53 e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) vem sendo estudados, sugerindo apresentarem um importante papel no estabelecimento do prognóstico do câncer de mama em

mulheres (YE et al., 2007; BUENO, 2012; NICHOLS et al., 2001; LEE et al., 2004; SCHOEFFNER et al., 2005; PAVLAKIS et al., 2008).

O gene mutado ataxia telangiectasia (*ATM*) é um gene supressor tumoral responsável pelas respostas aos danos ao DNA (BENSIMON; AEBERSOLD; SHILOH, 2011). A diminuição da expressão gênica e proteica deste marcador foi associada com carcinomas mamários de mulheres e com a diminuição do tempo de sobrevida livre de doença e sobrevida global (YE et al., 2007; BUENO, 2012).

O *TP53*, outro gene supressor tumoral, é responsável pelo controle do ciclo celular, a perda deste gene pode estar associada com o processo de tumorigênese de inúmeros tumores (KHANNA; CHENEVIX-TRENCH, 2004; LACROIX; TOILLON; LECLERCQ, 2006 ALMEIDA et al., 2007), como o câncer de mama (NICHOLS et al., 2001; LEE et al., 2004).

Enquanto, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um importante estimulador da angiogênese, uma vez que inicia a cascata angiogênica, atuando como fator de proliferação, migração e sobrevivência das células endoteliais (FERRARA, 2004). O aumento da expressão do VEGF foi associado com o aumento do risco do desenvolvimento de metástases e a um pior prognóstico para muitos tumores em humanos, inclusive o de mama (SCHOEFFNER et al., 2005; PAVLAKIS et al., 2008).

Assim, o conhecimento destes marcadores pode também ser útil em estudos de oncologia comparada, uma vez que o tumor de mama em cadela apresenta características epidemiológicas, clínicas, comportamento biológico e molecular semelhante ao apresentado na mulher, servindo como um excelente modelo comparativo ao entendimento da carcinogênese do câncer de mama (BOGGS et al., 2008; ANDRADE et al., 2010; QUEIROGA et al., 2011), além de fornecer informações importantes para a oncologia veterinária, podendo contribuir no estabelecimento de novos fatores prognósticos.

Neste estudo, objetivou-se avaliar a expressão gênica e proteica do *ATM*, *p53* e *VEGF* e tentar correlacioná-los com o processo de tumorigênese da neoplasia mamária de cadelas e no desenvolvimento de metástases, como descrito em humanos, além de permitir uma melhor compreensão da via de controle do

ATM sobre o *TP53* e o *VEGF*, e, com isso, poder tentar estabelecer uma nova perspectiva para o prognóstico de tumores de mama em cadelas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neoplasias mamárias caninas

Os tumores de mama são os mais frequentes em cadelas (SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013), representando 52% de todas as neoplasias (OLIVEIRA-FILHO et al. 2010), afetando principalmente fêmeas caninas de meia idade a idosas (CASSALI et al., 2011; SORENMO et al., 2011; HENRY, 2013; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013). As raças acometidas com maior frequência são: Poodle, Pastor Alemão, Cocker Spaniel, cadelas sem raça definida (DE NARDI et al., 2009), além do Boxer, Daschund e Fox Terrier (BORGE; BØRRESEN-DALE; LINGAAS, 2011). Acredita-se que fêmeas intactas ou castradas tardiamente sejam mais predispostas ao desenvolvimento do câncer de mama (SCHNEIDER et al., 1969; SORENMO et al., 2011; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013).

Em geral, os tumores mamários apresentam-se como nódulos circunscritos de tamanho variado, de milímetros de diâmetros a extremamente desenvolvidos, que podem estar ulcerados e inflamados e, frequentemente (em cerca de 70% dos casos) estão associados com múltiplos nódulos em uma mesma glândula mamária ou envolvendo simultaneamente mais de uma glândula mamária, podendo apresentar tipos histológicos distintos (MISDORP et al., 1999; DE NARDI et al., 2009; SOREMNO et al., 2009). Assim, todos os tumores mamários devem ser biopsiados, uma vez que pode tratar-se de tumores primariamente independentes (SORENMO et al., 2011).

A etiologia do tumor de mama é multifatorial, com a participação de fatores genéticos, ambientais, nutricionais e hormonais (PHILIBERT et al., 2003; SORENMO et al., 2009; SORENMO et al., 2011). Nas mulheres sabe-se ainda que um importante fator de risco ao desenvolvimento do câncer de mama está associado à presença de alteração nos genes de predisposição/suscetibilidade,

como *BRCA1* e *BRCA2*, *TP53*, *CHEK2*, *PTEN*, *STK11*, *CDH1*, *CASP8*, *CTLA4*, *NBN*, *CYP19A1*, *TERT*, *XRCC3* e *ATM* (ZHANG et al., 2011).

Um resultado fatal da doença e a causa mais comum de mortes se deve a metástase do tumor primário que pode ocorrer tanto pela via linfática como pela hematogênica e os principais órgãos que podem ser afetados são linfonodos regionais, pulmão, fígado, baço, pele, encéfalo, ossos e rins (GUPTA et al., 2007; DE NARDI et al., 2009; KLOPFLEISCH; GRUBER, 2009; SORENMO et al., 2011).

Segundo Sorenmo (2003), a sobrevida global de cadelas com neoplasias malignas em dois anos é de 25% a 40%, entretanto, esta sobrevida pode ser influenciada por vários fatores e, variar significativamente dependendo do tipo histológico e grau de diferenciação, estágio da doença e tratamento utilizado.

Apesar do tipo histológico e grau de malignidade dos tumores serem importantes no estabelecimento do prognóstico do câncer de mama, há uma divergência entre os patologistas quanto à classificação morfológica dos mesmos (BENJAMIN; LEE; SAUDERS, 1999; SORENMO, 2003.). As classificações mais utilizadas são de Moulton (MOULTON, 1990) e WHO, Organização Mundial da Saúde (HAMPE; MISDORP, 1974; MISDORP et al., 1999), embora existam algumas divergências entre elas. Recentemente, Cassali et al. (2011) apresentaram uma proposta para padronizar o diagnóstico, os fatores prognósticos e o tratamento das neoplasias mamárias caninas no Brasil.

Acredita-se que os tumores de mama em pacientes caninos se transformem durante um longo período de tumores benignos para malignos e que a forma carcinomatosa seja o seu processo final (BENJAMIN; LEE; SAUDERS, 1999; SORENMO et al., 2011).

2.2 Marcadores prognósticos

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

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

O prognóstico da neoplasia mamária canina na rotina clínica é determinado pelos tipos e graus histológicos e estadiamento clínico do tumor (SORENMO, 2003; GAMA; ALVES; SCHMITT, 2008; DE NARDI et al., 2009).

Segundo Karayannopoulou et al. (2005), há uma correlação dos tipos histológicos com o grau de malignidade do tumor mamário canino. Assim, os carcinomas complexos foram relacionados com o grau I, enquanto os carcinomas simples (tipos histológicos mais agressivos) com os graus II e III. Já Philibert et al. (2003) demonstraram haver uma relação do grau de malignidade do tumor com o tempo de sobrevivência, assim, pacientes com tumores de grau II de malignidade apresentaram uma diminuição do tempo de sobrevivência. Outros autores consideram a presença de invasão do tumor no tecido adjacente mais importante do que o tipo histológico (MOULTON, 1990).

O estadiamento clínico do tumor de mama de cadelas é determinado pelo sistema TNM estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e que tem por objetivo avaliar o tamanho do tumor primário (T), o comprometimento dos linfonodos regionais (N) e a presença ou ausência de metástase à distância (M) (OWEN, 1980) e através do sistema de estágio (modificação da OMS), em que o estágio I representa os tumores menores que 3 cm e ausência de metástases em linfonodos e à distância, o estágio II classifica os tumores de 3 a 5 cm e ausência de metástases regionais e à distância, o estágio III refere-se aos tumores com tamanhos superiores a 5 cm e ausência de metástases regionais ou qualquer tamanho tumoral, mas com presença de metástase em linfonodos e ausência de metástase à distância e o estágio IV representa os tumores com qualquer tamanho tumoral, ausência ou presença de metástase regional e presença de metástase à distância (CASSALI et al., 2011).

A avaliação de metástases à distância é evidenciada pelos exames de imagem através da radiografia torácica em três projeções ventro-dorsal (VD), latero-lateral direita (LLD) e latero-lateral esquerda (LLE) e exame ultrassonográfico abdominal (SORENMO, 2003; DE NARDI et al., 2009; SORENMO et al., 2011). Lesões pulmonares a partir de 6 a 8 mm de diâmetro podem ser evidenciadas pelo

exame radiográfico convencional, entretanto, para detecção de lesões menores é necessário à realização de tomografia computadorizada (SORENMO, 2003).

Em mulheres, o estadiamento clínico é considerado como um marcador prognóstico informativo (ESPINOSA et al., 2012), por não ser um indicador totalmente preciso, uma vez que aproximadamente 25% das pacientes linfonodo-negativas possuem micrometástases e recidiva e cerca de 50% das pacientes linfonodo-positivas não apresentam recidiva após vários anos de seguimento, mesmo sem tratamento adjuvante (DUFFY, 2005), além disso, tumores pequenos podem estar relacionados com desenvolvimento de metástases em linfonodos e, portanto, com um pior prognóstico (COMEN; NORTON; MASSAGUE, 2011; WO et al., 2011).

Nas cadelas acredita-se que o tamanho do tumor seja positivamente relacionado com o risco de recidiva e aparecimento de metástases, sendo considerado como um fator prognóstico independente, assim, tumores maiores que 3 cm apresentam pior prognóstico do que os tumores menores (SORENMO, 2003; SORENMO et al., 2011). Pacientes caninos que apresentam tumores pequenos e bem diferenciados possuem um excelente prognóstico após a ressecção cirúrgica, enquanto o prognóstico para as neoplasias mais avançadas é mais reservado, sendo necessário, muitas vezes, o uso de terapias adjuvantes (SORENMO, 2003).

Além disso, a presença de metástases em linfonodos regionais de cadelas está relacionada com uma diminuição significativa do tempo de sobrevida, contribuindo com um prognóstico desfavorável (SORENMO, 2003). Portanto, segundo Sorenmo et al. (2011), o estadiamento baseado no tamanho do tumor e no *status* linfonodal confere um efeito prognóstico e auxilia na escolha terapêutica.

Entretanto, como o câncer é uma doença heterogênea, dada pelo grande número de eventos celulares envolvidos no crescimento celular, diferenciação, proliferação, invasão e desenvolvimento de metástases, acredita-se que a investigação de múltiplas alterações moleculares seja de grande importância no entendimento de sua patogênese (BECKMANN et al., 1997; RAKHA et al., 2009).

Atualmente sugere-se que a progressão do câncer se deva a uma complexa série de eventos genéticos que levam a vias divergentes e distintas culminando no tumor invasivo, incluindo os mecanismos de manutenção da sinalização da

proliferação celular, evasão dos mecanismos supressores de crescimento e da destruição das células tumorais pelo sistema imune, permitindo a imortalidade replicativa, inflamação promovida pelo tumor, ativação dos mecanismos de invasão e metástase, indução da angiogênese, instabilidade genômica, resistência a morte celular e desregulação energética celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Assim, concomitantes aos marcadores prognósticos clínicos, outros marcadores estão sendo estudados, com objetivo de trazer mais informações a respeito de um dado tumor e com isso, estabelecer um prognóstico mais preciso, como é feito em mulheres (QUEIROGA et al., 2011), tais como os marcadores de proliferação celular, como o Ki-67 (MATOS et al., 2006; NOWAK et al., 2008; MORRIS et al., 2009), receptores hormonais (MORRIS et al., 2009), fator de crescimento epidermal 2 humano (HER2) (LEE et al., 2004), moléculas de adesão (NOWAK et al., 2008), ATM (YE et al., 2007; BUENO, 2012), p53 (NICHOLS et al., 2001; Lee et al., 2004) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (TOI et al., 1996).

2.3 ATM, p53 e VEGF

O gene mutado ataxia telangectasia (*ATM*), identificado em 1995 (TERAOKA et al., 1999), está associado com risco intermediário à suscetibilidade de desenvolvimento de câncer de mama na mulher (RIPPERGER et al., 2009; TAVTIGIAN, 2009). Este gene localiza-se no cromossomo 11q22~23 (YE et al., 2007; RIPPERGER, 2009) e sintetiza uma proteína quinase de 350kDa (YE et al., 2007) e de 3056 resíduos de aminoácidos (TAVTIGIAN, 2009).

O *ATM* é um transdutor primário na resposta aos danos ao DNA, sendo ativado principalmente na quebra da dupla fita, que é a lesão mais prejudicial do DNA e se não reparada pode levar a rearranjos genômicos e instabilidade cromossomal contribuindo com o processo de tumorigênese (BENSIMON; AEBERSOLD; SHILOH, 2011).

Assim, a proteína quinase do ATM quando acionada recruta e fosforila uma variedade de proteínas envolvidas em todas as três respostas à injúria ao DNA (reparo do DNA, regulação do ciclo celular e morte celular programada) através de alvos como H2AX, MDC1, Rad50, Nbs1, Chk2, p53, MDM2 (JIANG et al., 2009), CHEK2, BRCA1 (DOMBERNOWSKY et al., 2008; LALLOO; EVANS, 2012).

Quando mutado, o gene *ATM* está associado ao desenvolvimento da doença autossômica recessiva rara conhecida como ataxia telangiectasia (AT), caracterizada por ataxia cerebelar, telangiectasias oculares, deficiência imunológica, radiosensibilidade, diabetes insulino-resistente, envelhecimento precoce e predisposição ao câncer, inclusive ao câncer de mama (TERAOKA et al., 1999; GATEI et al., 2000; CUATRECASAS et al., 2006; PROKOPCOVA et al., 2007; LAVIN, 2008; BHATTI et al., 2010).

Em carcinomas mamários esporádicos de mulheres foi observada baixa expressão gênica e proteica do ATM (YE et al., 2007; TOMMISKA et al., 2008), entretanto, os mecanismos envolvidos nesta desregulação ainda são desconhecidos (PROKOPCOVA et al., 2007). Sugere-se que ocorra um silenciamento epigenético do *ATM*, porém estudos de metilação mostraram resultados contraditórios (VO et al., 2004), outra hipótese seria o envolvimento de microRNAs (SONG et al., 2011).

Segundo Ye et al. (2007), a baixa expressão do *ATM* no câncer de mama mostrou estar relacionada com alta taxa de mutação do DNA e assim, na progressão do fenótipo cancerígeno. Estes autores também observaram que o baixo nível de RNAm do *ATM* estava significativamente mais baixo no câncer de mama do que no tecido adjacente normal dos mesmos pacientes avaliados ou nos tecidos mamários de pacientes com tumor de mama benigno e, o aumento dos níveis de expressão do *ATM* no tecido mamário cancerígeno estava associado com um aumento na sobrevida livre de doença e na sobrevida global.

Bueno (2012) verificou, em 926 amostras de neoplasias mamárias, que a diminuição da expressão proteica do ATM estava significativamente associada aos tumores de alto grau e ao desenvolvimento de metástases à distância, enquanto os tumores que expressavam esta proteína apresentaram um menor risco de desenvolvimento de metástase à distância e morte pela doença, concluindo que o

ATM é um marcador prognóstico independente para sobrevida livre de doença e sobrevida global em carcinomas mamários de mulheres.

Além disso, o gene *ATM* desempenha um importante papel na ativação do gene supressor tumoral, *TP53*, na interface G1/S quando defeitos são observados durante a parada do ciclo celular (LAVIN, 1999) (Figura 1). Modificações na cromatina também são suficientes para ativar a proteína quinase do *ATM*, a qual será capaz de ativar o gene *TP53* (LOEHLBERG et al., 2007).

O gene supressor tumoral *TP53* localiza-se no cromossomo 17p13.1 e codifica uma fosfoproteína de 53 kDa, que desempenha um importante papel no controle do ciclo celular. A proteína p53 tem o papel de bloquear a divisão celular em células que sofreram injúrias no seu DNA, para que ocorra sua reparação. A perda da função desse gene pode estar relacionada tanto à iniciação quanto à progressão tumoral (EISENBERG; KOIFMAN, 2001; KHANNA; CHENEVIX-TRENCH, 2004; LACROIX; TOILLON; LECLERCQ, 2006 ALMEIDA et al., 2007).

Assim como em humanos, acredita-se que mutações no *TP53* estejam envolvidas no aumento do risco de inúmeros cânceres (NICHOLS et al., 2001; Lee et al., 2004). Estudos em cadelas constataram que 17% de 69 carcinomas mamários caninos apresentavam mutação no gene *TP53* e análises multivariadas indicaram que esta mutação conferiu um aumento no risco de recidiva do tumor e morte (SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013). Estudos sugerem que a perda do *TP53*, assim como do *ATM*, está relacionada com tumores de pior prognóstico e com baixa sobrevida dos pacientes (JIANG et al., 2009).

A redução da expressão do *ATM* em tumores mamários de mulheres também foi correlacionada com aumento dos parâmetros microvasculares (CUATRECASAS et al., 2006; YE et al., 2007). Ousset et al. (2010) observaram que a ausência da expressão do *ATM* levou a um aumento da expressão de ambas subunidades do fator de transcrição do Fator Indutor de Hipóxia 1 (*HIF-1*), o qual é o regulador central das respostas de hipóxia, induzindo a transcrição de genes envolvidos na angiogênese como o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (*VEGF*) (Figura 1). A angiogênese é essencial para o crescimento tumoral e desenvolvimento de metástases (ADAMS et al., 2000), uma vez que facilita o fluxo

de oxigenação e nutrição e remove resíduos metabólicos (CUATRECASAS et al., 2006).

O gene *VEGF* é um dos mais potentes e específicos fatores angiogênicos, sendo também conhecido como um fator de permeabilidade vascular e vasculotropina (ADAMS et al., 2000), ficando inicialmente, armazenado na superfície vascular (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003). A expressão deste gene é induzida pela exposição de baixa tensão de oxigênio sobre uma variedade de circunstâncias patofisiológicas (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003).

Altos níveis de RNAm deste gene foram encontrados em carcinomas mamários invasivos de mulheres quando comparados com a forma benigna ou em mama normal e em associação com altos números de vasos (ADAMS et al., 2000).

Numerosos estudos indicaram como essencial o papel de um processo dependente de angiogênese para a disseminação do câncer de mama (KINOSHITA et al., 2001). Assim, marcadores de angiogênese demonstraram ser um potente indicador prognóstico para uma variedade de tipos tumorais, inclusive o de mama (TOI et al., 1996).

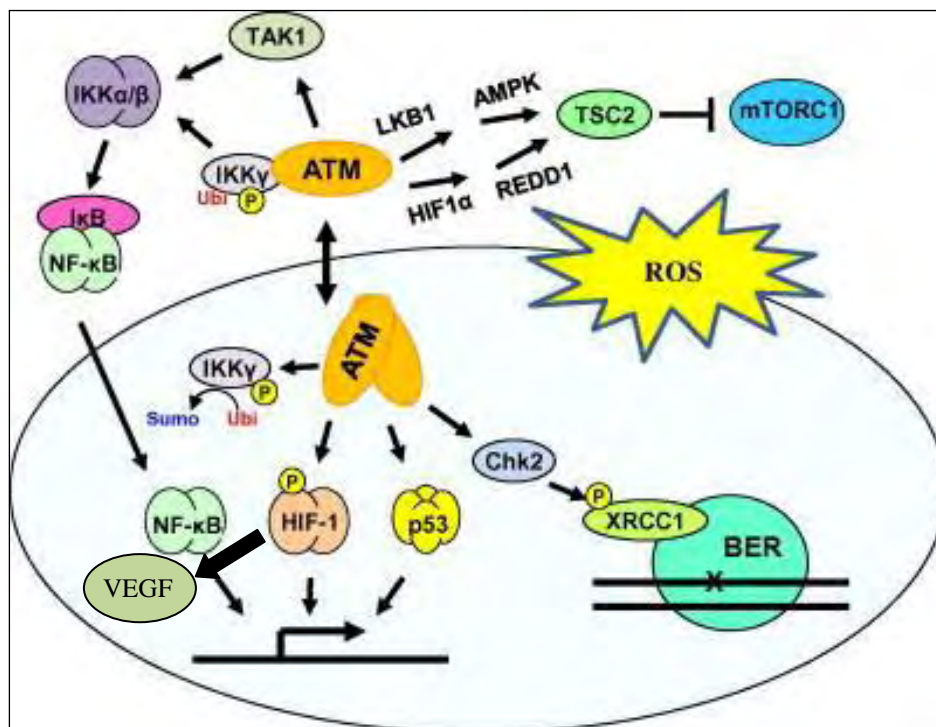


Figura 1 – Via de sinalização gênica e controle do ATM.

Fonte: Adaptado de <http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0304383511007415-gr2.jpg>

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- Avaliar a expressão gênica e proteica do ATM em glândula mamária de cadelas com carcinomas metastáticos e não metastáticos, lesões mamárias benignas e mama normal e correlacioná-las com a evolução tumoral e possível envolvimento metastático.
- Avaliar a expressão gênica e proteica do p53 e VEGF e correlacioná-las com a expressão do ATM.
- Avaliar a expressão gênica e proteica do ATM, p53 e VEGF e correlacioná-las com parâmetros clínicos e histopatológicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Grupos experimentais

Foram utilizadas 53 mamas de cadelas, que foram distribuídas em quatro grupos, de acordo com o diagnóstico histopatológico e presença ou ausência de metástases, sendo o grupo 1 (G1) composto por 12 mamas normais, o grupo 2 (G2) por 11 lesões mamárias benignas, o grupo 3 (G3) por 19 carcinomas mamários não metastáticos e o grupo quatro (G4) por 11 carcinomas mamários metastáticos. A metástase foi confirmada por exame radiográfico de torax e ultrassonográfico abdominal e por punção biópsia aspirativa no caso de metástase cutânea. O G2 foi composto por 04 adenomas mamários, 02 hiperplasias mamárias, 01 fibroadenoma, 03 tumores mistos benignos e 01 papiloma ductal.

As mamas pertencentes ao grupo 1 foram obtidas de cadelas do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Araçatuba, SP, enquanto as mamas referentes aos grupos G2 (oito casos), G3 e G4 foram obtidas de pacientes oriundas do atendimento do Serviço de Oncologia Veterinária (SOV) do Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), UNESP de Jaboticabal, as outras três mamas do G2 foram utilizadas de arquivo.

Os dados clínicos das pacientes dos grupos 2, 3 e 4 como idade, raça, *status* reprodutivo, pseudociese e uso de contraceptivos estão ilustrados na Tabela 1, enquanto os parâmetros clínicos referentes à recidiva, ulceração e tamanho tumoral, *status* nodal e tratamento dos animais dos grupos 3 e 4 estão na Tabela 2.

O estadiamento clínico do tumor das pacientes atendidas no SOV foi realizado através de exame físico das mamas e durante este exame foi avaliado o tamanho da massa tumoral com um paquímetro e seu aspecto macroscópico como consistência, presença ou ausência de aderência à musculatura, ulceração, secreção da glândula mamária e inflamação e, exames complementares como exame radiográfico de tórax em três projeções, ventro-dorsal (VD), latero-lateral

direito (LLD) e latero-lateral esquerdo (LLE) e ultrassonográfico abdominal para constatação de possíveis metástases, principalmente em pulmão, fígado e baço.

Foi avaliado também o estado geral destas pacientes, através da avaliação de hemograma, perfil bioquímico para análise sérica de creatinina, ureia, fosfatase alcalina (FA), alanina aminotransferase (ALT), cálcio, fósforo, albumina e proteínas totais.

As pacientes foram submetidas à mastectomia unilateral e, na presença de nódulos em ambas as cadeias mamárias, a cirurgia foi realizada em duas etapas, com intervalo de 40 dias. Na presença de metástase à distância foi realizada apenas nodulectomia para fins de diagnóstico do tumor. Também foi realizada a exérese de linfonodos regionais, em geral do inguinal e quando aumentado de volume, o axilar também foi removido para avaliação de possível metástase. Assim, foi determinado o TNM e estadiamento clínico da neoplasia de cada paciente (Tabela 3). A classificação histopatológica foi realizada de acordo com Cassali et al. (2011).

Na presença de mais de um nódulo tumoral, foi considerado para a realização deste estudo o tumor de pior prognóstico baseado no estadiamento do tumor, tipo e grau histológico.

Em casos de tumores com prognóstico reservado ou ruim foi proposto tratamento quimioterápico com doxorubicina e/ou carboplatina, ou apenas carboplatina, e nos casos dos tumores metastáticos, optou-se pelo protocolo com gencitabina e carboplatina (Tabela 2).

As pacientes submetidas ao tratamento quimioterápico eram reavaliadas durante os retornos para a administração do fármaco e, ao término do tratamento a cada três meses, enquanto as cadelas que não tinham indicação à quimioterapia adjuvante ou cujo proprietário não concordou em sua realização, foram reavaliadas a cada três meses. Nestes retornos foram feitos exames radiográfico de torax em três projeções, ultrassonográfico de abdome e avaliação laboratorial através da realização de hemograma e exames bioquímicos séricos (ALT, FA, creatinina e ureia).

As pacientes deste estudo tiveram um segmento clínico de no mínimo um ano.

Parâmetros clínicos e histopatológicos como idade, raça, tamanho tumoral, *status* nodal, *status* reprodutivo, presença ou ausência de ulceração, recidiva, uso de contraceptivos, presença ou ausência de pseudociese e tipo e grau histológico também foram avaliados neste estudo em associação com os marcadores analisados e os grupos compostos por tecidos tumorais (carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos).

Tabela 1. Dados clínicos como raça, idade, castração, pseudociese e uso de contraceptivos das pacientes pertencentes aos grupos 2, 3 e 4.

GRUPO	RAÇA	IDADE	CASTRAÇÃO	PSEUDOCIESE	USO DE CONTRACEPTIVOS
2	SRD	11a	Sim	Não	Sim
2	Boxer	6a6m	Sim	Sim	Sim
2	SRD	20a	Não	Não	Não
2	Cocker Spaniel	7a	Sim	Não	Não
2	SRD	17a	Não	Não	Não
2	Rottweiler	11a	Não	Sim	Não
2	Poodle	7a	Não	Sem histórico	Sem histórico
2	Poodle	10a	Não	Não	Não
3	SRD	13a	Não	Não	Sim
3	SRD	9a	Não	Sim	Não
3	Pastor Alemão	14a	Não	Sim	Sim
3	Cocker Spaniel	7a	Não	Não	Sem histórico
3	Teckel	10a	Não	Sim	Não
3	Poodle	12a	Sim	Não	Não
3	SRD	10a	Não	Sim	Não
3	SRD	15a	Não	Sem histórico	Sem histórico
3	Rottweiler	8a	Não	Sim	Não
3	SRD	17a	Não	Não	Não
3	Poodle	10a	Não	Não	Não
3	SRD	9a	Não	Não	Não
3	Pinscher	13a	Sim	Não	Não
3	Pitbull	10a	Sim	Sem histórico	Não
3	SRD	12a	Não	Sim	Sem histórico
3	Pinscher	1a6m	Não	Não	Não
3	Cocker Spaniel	12a	Sim	Não	Sem histórico
3	SRD	12a	Sim	Não	Não
3	SRD	12a	Sim	Sim	Não
4	Poodle	13a	Sim	Sim	Não
4	SRD	13a	Não	Não	Não
4	Teckel	12a	Não	Sim	Não
4	SRD	14a7m	Sim	Sim	Sim
4	SRD	6a	Não	Sem histórico	Sem histórico

4	Pastor Belga	11a	Não	Não	Não
4	Poodle	11a	Não	Sim	Não
4	Cocker Spaniel	9a	Não	Sem histórico	Sem histórico
4	Pinscher	9a	Não	Sim	Não
4	Teckel	11a	Não	Sim	Não
4	SRD	14a	Não	Sim	Não

a= anos de idade e m= meses de idade.

Tabela 2. Parâmetros clínicos como recidiva, ulceração, tamanho tumoral, *status* nodal e tratamento das pacientes dos grupos 3 e 4.

GRUPO	ULCERAÇÃO TUMORAL	RECIDIVA	TAMANHO TUMORAL	STATUS NODAL	TRATAMENTO
3	Não	Não	T1	N0	Cirúrgico
3	Não	Não	T1	N0	Cirúrgico
3	Não	Não	T3	N0	Cirúrgico
3	Não	Não	T2	N0	Cirúrgico
3	Não	Não	T1	N0	Cirúrgico
3	Não	Sim	T1	N0	Cirúrgico
3	Não	Não	T2	N0	Cirúrgico
3	Sim	Não	T3	N0	Cirúrgico + QT (D + C -2 ciclos)
3	Não	Não	T3	N0	Cirúrgico
3	Não	Não	T1	N0	Cirúrgico
3	Não	Sim	T1	N0	Cirúrgico
3	Não	Não	T2	N0	Cirúrgico
3	Não	Sim	T1	N0	Cirúrgico
3	Não	Não	T1	N0	Cirúrgico
3	Não	Não	T1	N0	Cirúrgico
3	Não	Não	T1	N0	Cirúrgico
3	Não	Não	T1	N0	Cirúrgico
3	Não	Não	T1	N0	Cirúrgico
3	Não	Não	T1	N0	Cirúrgico
3	Não	Não	T1	N0	Cirúrgico
3	Não	Não	T3	N0	Cirúrgico
4	Não	Sim	T1	N0	Cirúrgico
4	Não	Não	T3	N1	Cirúrgico
4	Não	Não	T3	N1	Cirúrgico + QT (D – 1 sessão)
4	Sim	Sim	T3	N1	Cirúrgico
4	Sim	Não	T3	N1	Cirúrgico + QT (C – 4 sessões)
4	Não	Não	T2	N0	Cirúrgico
4	Não	Não	T3	N1	Cirúrgico + QT (D + C – 2 ciclos e G + C – 4 ciclos)
4	Não	Sim	T3	N1	Cirúrgico
4	Não	Não	T2	N1	Cirúrgico

4	Sim	Não	T2	N0	Cirúrgico
4	Não	Não	T1	N1	Cirúrgico

QT = quimioterapia, D = doxorubicina, C = carboplatina e G = gencitabina.

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

GRUPO	TIPO HISTOPATOLÓGICO	GRAU	TNM	ESTÁDIO
3	Ca papilar invasor	II	T3N0M0	III
3	Ca tubular	I	T1N0M0	I
3	Ca tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca sólido	III	T3N0M0	III
3	Ca papilar não invasor	—	T1N0M0	I
3	Ca tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca tubular	I	T2N0M0	II
3	Ca tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca tumor misto	I	T2N0M0	II
3	Ca tubular	I	T1N0M0	I
3	Ca tumor misto	I	T2N0M0	II
3	Ca tubular	I	T2N0M0	II
3	Ca tumor misto	II	T1N0M0	I
3	Ca tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca sólido	II	T3N0M0	III
3	Ca papilar invasor	I	T3N0M0	III
3	Ca tumor misto	I	T1N0M0	I
3	Ca tumor misto	I	T1N0M0	I
4	Ca tubular	II	T1N1M0	III
4	Ca complexo	I	T2N1M0	III
4	Ca tumor misto	I	T3N1M0	III
4	Ca anaplásico	II	T3N1M1	IV
4	Ca papilar invasor com metaplasia escamosa	I	T2N0M1	IV
4	Ca micropapilar	III	T2N1M1	IV
4	Ca tumor misto	I	T3N1M1	IV
4	Ca tubular	II	T1N0M1	IV
4	Ca tubular	I	T2N0M1	IV
4	Ca tubular	I	T3N1M0	III
4	Ca anaplásico	III	T3N1M1	IV

Ca = carcinoma

* Classificação histopatológica e estadiamento clínico tumoral de acordo com Cassali et al., 2011.

4.2 Coleta e armazenamento das amostras

As amostras foram coletadas imediatamente após a cirurgia e, no caso das mamas normais, em seguida da eutanásia das cadelas. De cada tumor foi coletado

um ou mais fragmentos de 1 cm³ que foi inserido em criotubo estéril, livre de RNase e DNase, previamente autoclavado e mantido em nitrogênio líquido a -196°C e posteriormente, armazenado em freezer a -80°C até o momento do processamento.

Outro fragmento de cada tumor foi armazenado em formalina 10% durante 24 horas e, em seguida, passado para o álcool 70% para análise histopatológica e imuno-histoquímica.

4.3 Macrodissecção e extração do RNA

As amostras de tecido congeladas dos quatro grupos foram cortadas no criostato (Leica), através de cortes de congelamento sequenciais de 5 µm, as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina e posteriormente analisadas em microscópio de luz (Leica). Para a composição dos grupos 3 e 4 só foram selecionadas as amostras que continham mais de 80% de células neoplásicas.

Posteriormente, estas amostras foram submetidas à clivagem através de tubos com *bids* magnéticos pelo equipamento Precellys R (BioAmerica Inc, Florida, EUA), seguida pela extração do RNA através do protocolo de Trizol® (Invitrogen), conforme protocolo do laboratório Neogene, Departamento de Urologia, FMB, Unesp Botucatu/SP.

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

4.4 Transcrição reversa

Para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico, o RNA total extraído foi tratado com DNase. A transcrição reversa do RNA para cDNA foi

realizada com 1 µg de RNA total e com a enzima Super-script III™ Reverse Transcriptase (Invitrogen). Para este protocolo utilizou-se 1 µL de oligodT (500 µg/mL), 1 µL de *random primers* (100 µg/mL) e 1 µL de dNTP. A mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos e a seguir, foram adicionados 4 µL de tampão de transcrição 5x, 1 µL de DTT 0,1M e, por último, foi acrescido 1 µL da enzima Super-script III (200U/ µL) e feito incubação a 25°C durante 5 minutos, 50°C por 1 hora e meia, seguido de 70°C por 15 minutos. Ao final da transcrição, o cDNA foi mantido a -20°C.

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

Os iniciadores foram desenhados segundo o programa Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para o gene *ATM* e com *software Primer Express 2.0* (Applied Biosystems) para os genes *TP53* e *VEGF* (Tabela 2). Os genes de referência (endógenos) testados foram *RPS5*, *RPS19*, *ACTB*, *HPRT* e *RPL8*. Os iniciadores destes genes foram obtidos segundo Brinkhof et al. (2006) e o gene *ACTB* segundo o *software Primer Express 2.0* (Tabela 4). A especificidade dos iniciadores de cada gene foi avaliada pelo programa BLAST do site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), tanto para a sequência *forward* quanto *reverse*.

Tabela 4. Sequência dos iniciadores utilizados na análise de expressão gênica.

GENE	FORWARD	REVERSE
<i>ATM</i>	5'-CTTAGGAGGAGCCTGGGCCTTTG-3'	5'-CACAAACACAGGGAAAGCTCCGTA-3'
<i>TP53</i>	5'-GAACGCTGCTCTGACAGTAGTGA-3'	5'-CCCGCAAATTTCTTCCA-3'
<i>VEGFA</i>	5'-GCAACTCCGGCAGAAGCAT-3'	5'-TGGCGATCCAATCCAAGAG-3'
<i>RPS5</i>	5'-TCACTGGTGAGAACCCCT-3'	5'-CCTGATTCACACGGCGTAG-3'
<i>RPS19</i>	5'-CCTTCCTCAAAAAGTCTGGG-3'	5'-GTTCTCATCGTAGGGAGCAAG-3'
<i>RPL8</i>	5'-CCATGAATCCTGTGGAGC-3'	5'-GTAGAGGGTTTGCCGATG-3'
<i>ACTB</i>	5'-GGCATCCTGACCCTCAAGTA-3'	5'-CTTCTCCATGTCGTCCCAGT-3'
<i>HPRT</i>	5'-AGCTTGCTGGTGAAGGAC-3'	5'-TTATAGTCAAGGGCATATCC-3'

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

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

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

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

4.6 Análise imuno-histoquímica

Para a análise da expressão proteica do ATM, p53 e VEGF foi utilizada a técnica de imuno-histoquímica em cortes de glândula mamária incluídos em parafina, referentes aos quatro grupos testados para os respectivos anticorpos (Tabela 5).

Tabela 5. Diluições, clones e procedência de anticorpos utilizados em mamas normais e tumorais, cortes parafinizados.

Anticorpos anti	Procedência	Clones	Diluições
ATM (P)	Abcam	ab47575	1:100
p53 (P)	Novocastra	CM1	1:500
VEGF (M)	Santa Cruz	VG-1	1:100

*M=monoclonal e P=policlonal

A técnica de imuno-histoquímica empregada seguiu o protocolo do Laboratório de Imuno-histoquímica do Serviço de Patologia Veterinária da

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Unesp de Botucatu e foi realizada neste mesmo estabelecimento.

As amostras foram seccionadas em cortes de 5 μm de espessura e montadas em lâminas de vidro carregadas eletricamente. Estes cortes foram submetidos à desparafinização e reidratação. A recuperação antigênica do ATM foi realizada em banho-maria à 96°C com tampão Tris-EDTA pH 9,0, enquanto a do p53 feita com tampão Citrato pH 6,0 em panela de pressão (Pascal, DAKO) e do VEGF, com o mesmo tampão, em micro-ondas em três ciclos de 5 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado a partir de uma solução a 10% de peróxido de hidrogênio a 30 volumes (Dinâmica) em metanol absoluto (Dinâmica) durante 20 minutos. Após esta etapa, procedeu-se com o bloqueio de reação inespecífica com solução de leite em pó a 3% (Molico) durante uma hora, em temperatura ambiente.

A seguir, os cortes foram incubados em câmara úmida com os anticorpos primários na diluição ótima (Tabela 5). A incubação do ATM foi de 1 hora à temperatura de 27°C, enquanto a incubação do p53 e do VEGF foi a 4°C durante 18 horas. Como anticorpo secundário ligado a Peroxidase foi utilizado o kit Advance (DAKO) e DAB como cromógeno. Os cortes foram contra corados com Hematoxilina de Harris e, posteriormente, desidratados, montados com resina e observados em microscópio óptico.

4.7 Contagem das células marcadas

A observação das células foi realizada em microscópio de luz acoplado a câmera digital e através do programa de análise de imagens QWin 3.0 (Leica) foram feitas observações quanto ao tipo de marcação (citoplasmática, membranosa e nuclear), intensidade de marcação, apenas para ATM e VEGF (1 - intensa, 2 - moderada e 3 - fraca) e distribuição de marcação, por meio de escore: 1 - até 25% de células positivas, 2 – 26 a 50% de células positivas, 3 – 51 a 75% de células positivas e 4 – acima de 75% de células positivas, observadas em objetiva de 40x.

No caso dos carcinomas em tumor misto considerou-se somente o componente epitelial. As mamas normais foram consideradas como padrão de normalidade de expressão proteica (Tabela 6).

Os resultados foram comparados entre os grupos para o mesmo anticorpo, além de verificar a correlação de imunomarcção dos anticorpos dentro do mesmo grupo.

Tabela 6. Tecido utilizado como controle positivo, localização, escore e intensidade da imunomarcção da glândula mamária normal para os anticorpos testados.

Anticorpo	Controle positivo	Localização da Marcação	Avaliação da Marcação	Escore da mama normal	Intensidade da mama normal
ATM	Pele	Citoplasmática/membranosa	Escore/Intensidade	4	2
P53	Carcinoma mamário sabidamente marcado	nuclear	Escore	4	-
VEGF	Vaso sanguíneo	citoplasmática	Escore/Intensidade	1	1

4.8 Análise estatística

As comparações entre os valores de expressão gênica (*ATM*, *TP53* e *VEGF*) nos grupos amostrais e as variáveis clínicas e histopatológicas foram realizadas através de testes não paramétricos ANOVA ou t-Student, sendo o primeiro utilizado para múltiplas comparações e o segundo para análises pareadas. Em relação à análise da expressão proteica destes marcadores, foi utilizado teste Quiquadrado, analisando também os parâmetros clínicos e histopatológicos nos grupos tumorais. O teste de Spearman foi aplicado para análises de correlação. Curvas de sobrevida foram avaliadas pelo método de Kaplan-Meier e a significância estatística foi determinada pelo teste de log-rank. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos com $p < 0,10$.

Para a realização das análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prism5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

5 RESULTADOS

5.1 Análise da expressão gênica

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

O coeficiente de estabilidade de expressão (M) é determinado a partir de dois genes de referência considerados ideais por possuírem razões de expressão idênticas em todas as amostras analisadas. O programa geNorm avalia a razão de expressão de cada gene de referência em relação aos demais sempre aos pares, permitindo a exclusão dos transcritos menos estáveis (VANDESOMPELE et al., 2002).

Nesta análise, o gene *RPS5* apresentou expressão mais estável (M= 0,430), enquanto o gene *RPL8*, mostrou ser o menos estável (M= 0,537). Assim, o programa geNorm indicou o uso do *RPS5*, *RPS19* e do *ACTB* como os melhores genes de referência para a normalização da expressão dos genes alvos nos carcinomas mamários (Figura 2).

Os genes referência foram também estimados pelo cálculo do desvio padrão (valor ideal <0,150) da relação dos fatores de normalização com a adição de um novo transcrito ao grupo prévio (Figura 3).

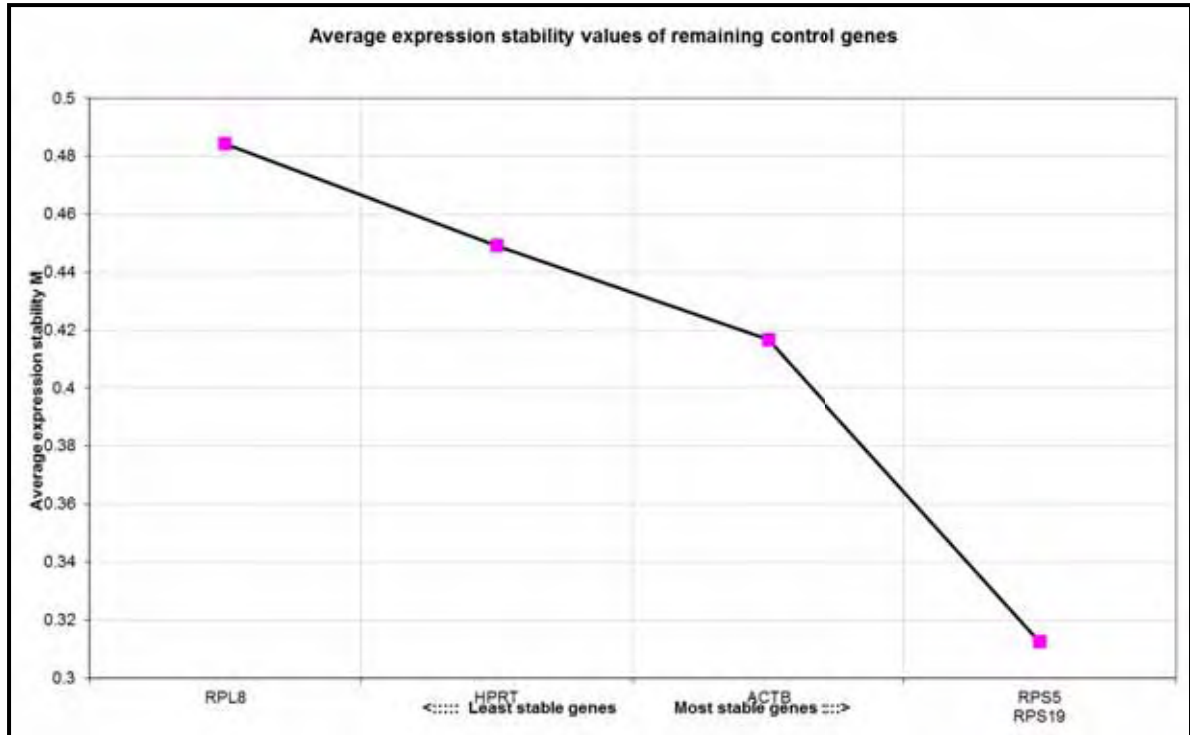


Figura 2. Média do coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos genes de referência.

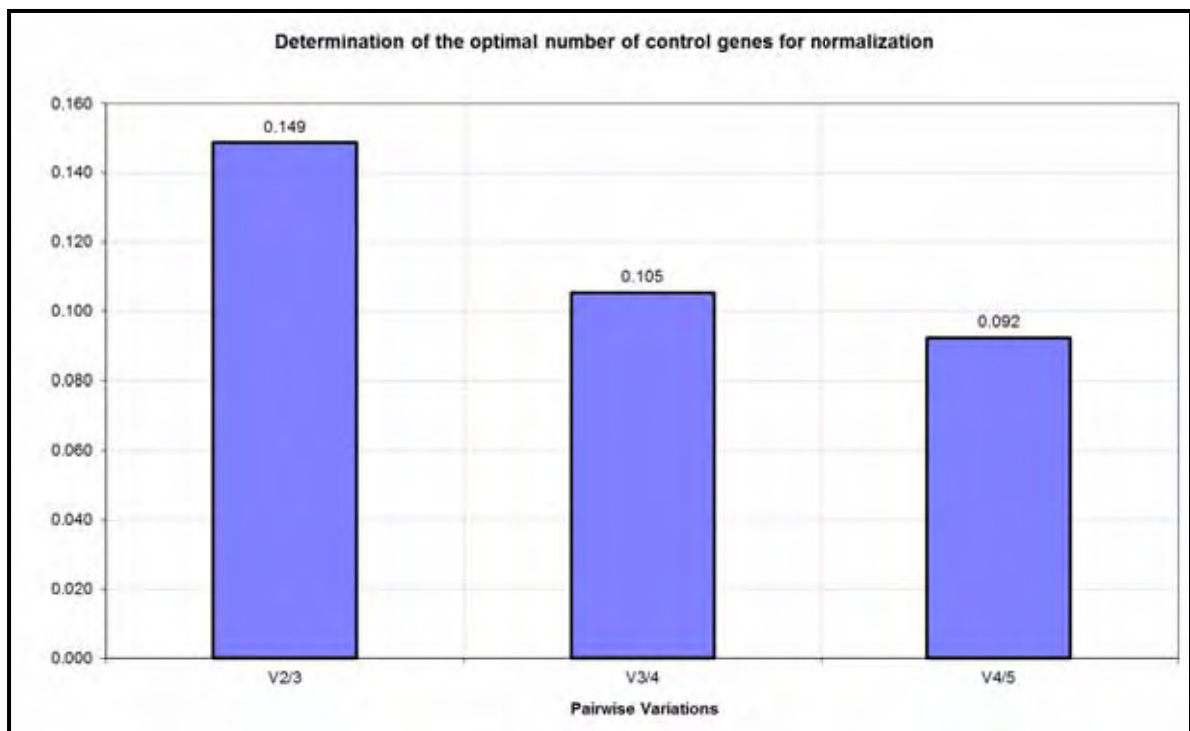


Figura 3. Determinação do número adequado de genes de referência para normalização da expressão dos genes alvos, demonstrando que com o uso dos três transcritos já se obtém uma normalização confiável.

Após a seleção dos três genes referência mais estáveis *RPS5*, *RPS19* e *ACTB*, mínimo proposto por Vandesompele et al. (2002), todas as amostras foram analisadas para os genes alvo (*ATM*, *TP53* e *VEGF*) e dos genes endógenos selecionados foram de 100%.

A seguir, foi estabelecido o QR das amostras para cada gene alvo, obtido pela análise do RT-qPCR. As amostras que não apresentaram resultados confiáveis para cada gene alvo testado foram excluídas da análise final.

Assim, foi avaliada a expressão dos genes alvo entre as amostras dos grupos 1, 2, 3 e 4 e, posteriormente, comparando o grupo 1 com os grupos 3 e 4 unidos como um grupo único de tumores (Figura 4).

Foi verificada diminuição da expressão de transcritos de *ATM* nos tumores e lesões benignas quando comparado com as amostras de mama normal e também quando unificado o grupo de tumores (carcinomas metastáticos e não metastáticos) em relação as mamas normais, apresentando $p=0,0686$ e $p=0,0537$, respectivamente (Figura 4A).

Na comparação por grupos foram observados uma diminuição estatisticamente significativa da expressão do *ATM* em carcinomas mamários não metastáticos em relação as mamas normais ($p=0,0349$) e entre as lesões benignas e as mamas normais ($p=0,0505$). Em relação aos carcinomas mamários metastáticos e as mamas normais não houve diferença estatística ($p=0,3070$), nem entre as lesões benignas e os tecidos neoplásicos ($p>0,10$).

Em relação ao *TP53*, foi observado uma diminuição dos transcritos das lesões benignas em relação as mamas normais ($p=0,0145$) e aumento da expressão dos carcinomas mamários não metastáticos em relação as mamas normais ($p=0,0276$). Além disso, verificou-se uma diminuição significativa da expressão das lesões benignas em relação aos carcinomas mamários não metastáticos ($p=0,0007$) e metastáticos ($p=0,0145$). Não foi observada diferença estatística em relação as mamas normais e os carcinomas mamários metastáticos ($p=0,9738$) e nem entre as mamas normais e tumorais ($p=0,1299$) (Figura 4B).

Na análise de expressão dos transcritos de *VEGF* não se constatou diferença estatística entre os quatro grupos estudados ($p=0,1786$) e nem na análise entre mamas normais e tumorais ($p=0,1977$) (Figura 4C).

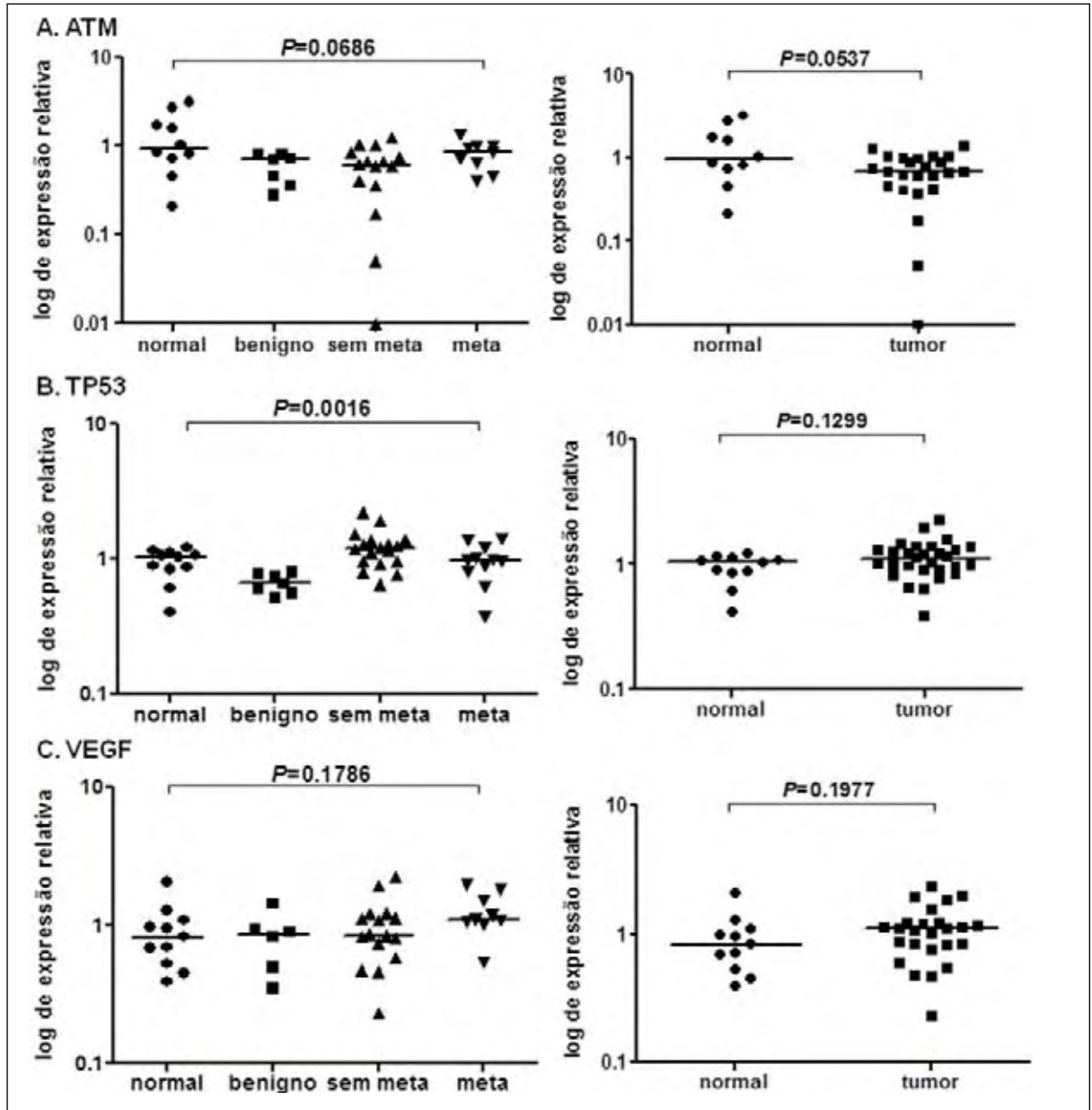


Figura 4. Expressão relativa dos genes *ATM*, *TP53* e *VEGF* avaliados por RT-qPCR em mamas normais, lesões benignas, carcinomas mamários não metastáticos e metastáticos e, em relação aos tecidos normais e tumorais (carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos). Os níveis de expressão relativa de cada gene estão apresentados em escala logarítmica. Os valores de P foram obtidos pelo teste de Kruskal-Wallis para as múltiplas comparações e Mann-Whitney para análise entre pares. O número de amostras analisadas variou entre os genes alvos, uma vez que amostras com resultados não confiáveis foram excluídas da análise.

Após a análise de cada gene, foi feita uma análise de correlação de expressão entre os genes alvos através do teste de Spearman, não sendo observada correlação de expressão entre eles (Tabela 7).

Tabela 7. Análise de correlação de expressão relativa dos genes alvo.

	Correlação	de	Spearman
	R		p
<i>TP53</i> ^a	0,1242		0,4839
<i>TP53</i> ^b	0,1681		0,3419
<i>VEGF</i> ^a	0,0553		0,7559

r = coeficiente de correlação. a= correlação com *ATM* e b= correlação com *VEGF*

5.2 Associação entre a expressão gênica do *ATM*, *TP53* e *VEGF* com as variáveis clínicas e histopatológicas

Para avaliar se os genes estudados poderiam estar associados com características de pior prognóstico ou outra característica clínica, os níveis de expressão destes genes foram comparados com dados clínicos e histopatológicos das pacientes, como idade, tamanho do tumor (T), *status* nodal (N), recidiva, ulceração tumoral, *status* reprodutivo, uso de contraceptivo, pseudociese, tipo histológico e grau de malignidade considerando apenas os grupos tumorais (3 e 4) (Figuras 5, 6 e 7).

Nas análises de expressão gênica do *ATM* observou-se diferença na expressão gênica entre os tamanhos tumorais (T1 a 3) ($p=0,0552$), ocorrendo um aumento dos níveis de transcritos entre T2 e T1 ($p=0,0299$). Além disso, verificou-se diminuição da expressão do *ATM* entre cadelas que apresentavam pseudociese das que não apresentavam ($p=0,0940$) (Figura 5).

Enquanto a expressão gênica do *TP53* e *VEGF* não foram associadas com os parâmetros clínicos e histopatológicos das pacientes (Figuras 6 e 7).

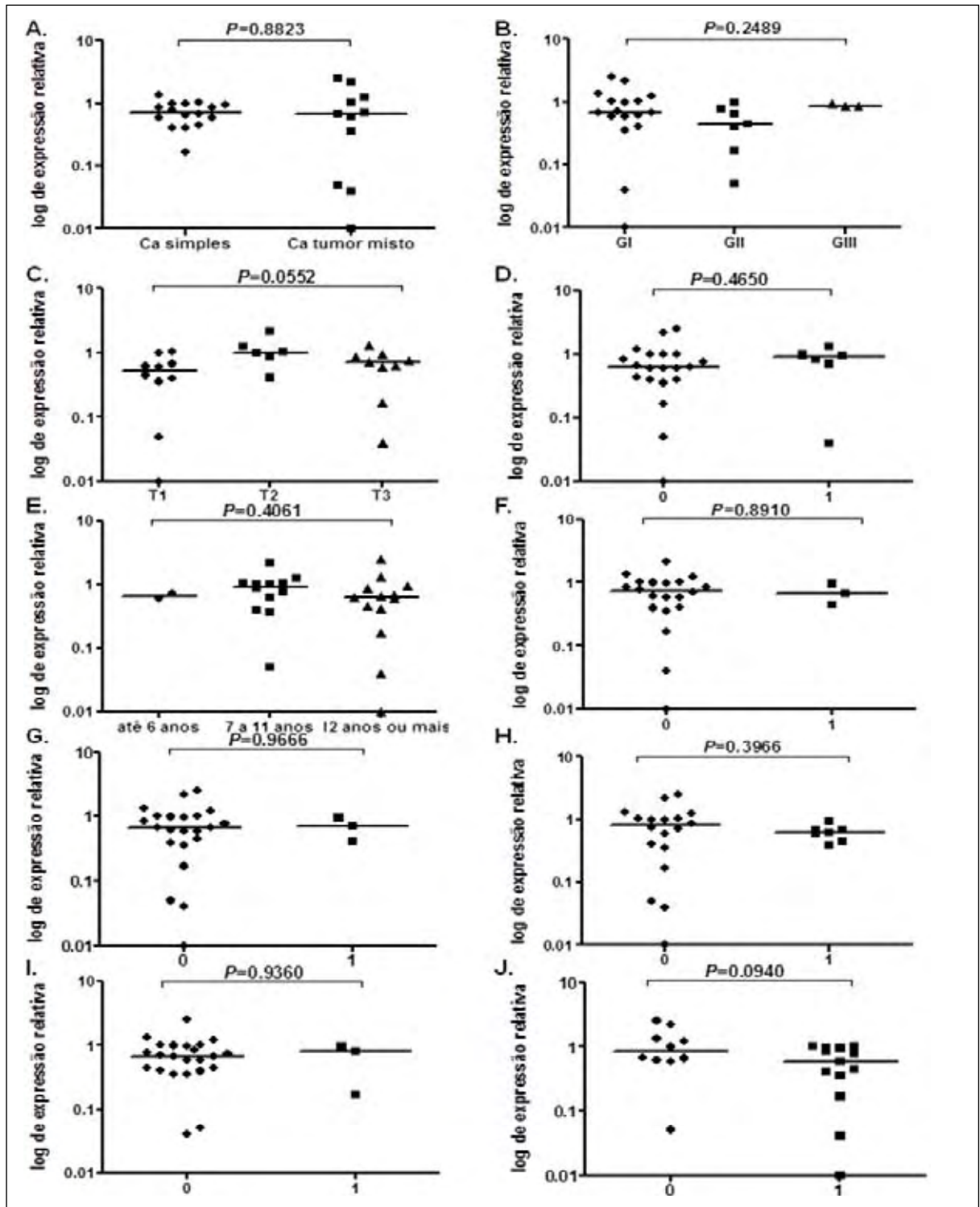


Figura 5. Níveis de transcritos de *ATM* segundo: **A.** tipo histológico; **B.** grau de malignidade; **C.** tamanho do tumor (T); **D.** *status* nodal; **E.** idade; **F.** recidiva; **G.** ulceração tumoral; **H.** castração; **I.** uso de contraceptivo; **J.** pseudociste. A mediana de expressão para cada característica analisada está apresentada no gráfico. Os valores de P foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre os pares e pelo teste de Kruskal-Wallis para as múltiplas comparações. Ca= carcinoma, 0 = ausente e 1= presente.

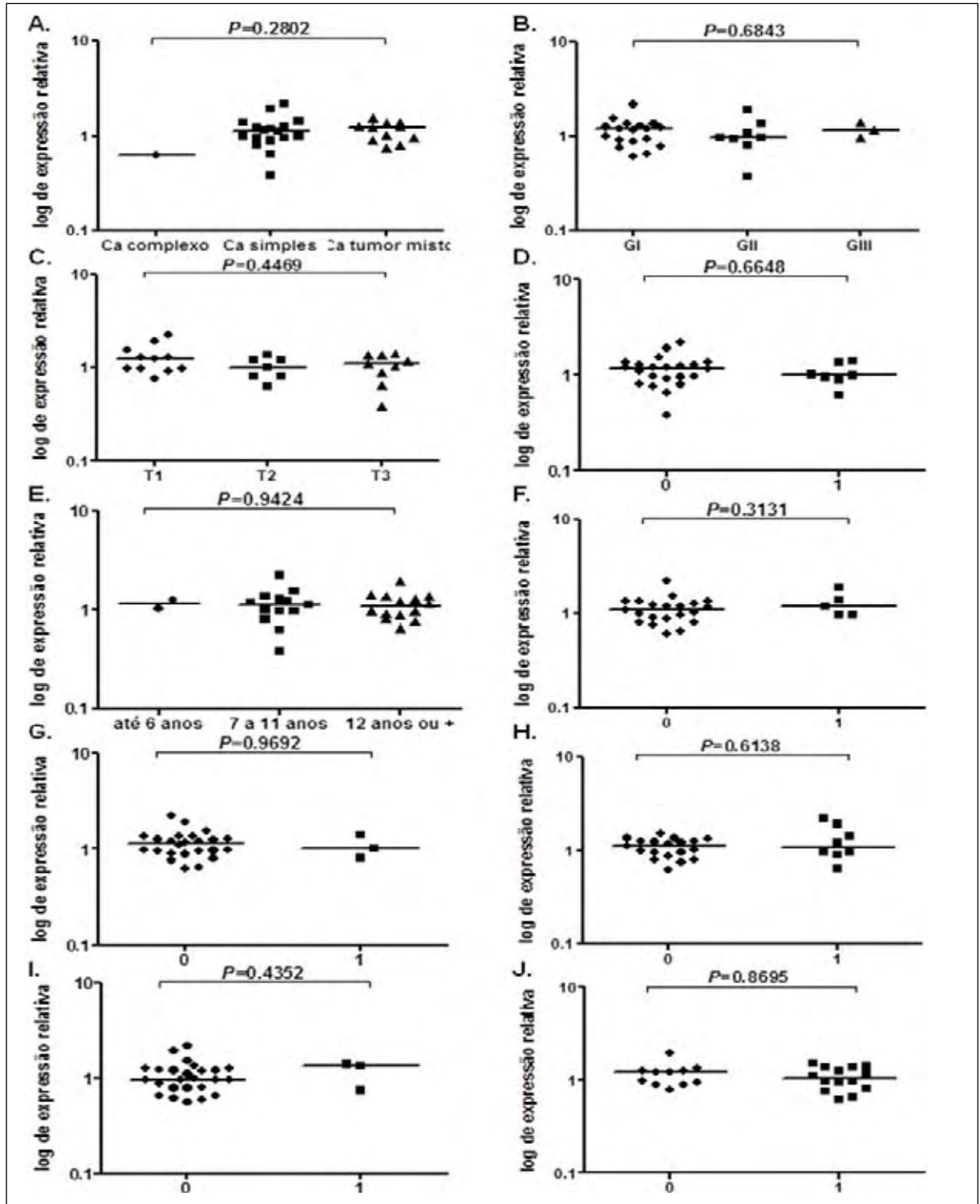


Figura 6. Níveis de transcritos de *TP53* segundo: **A.** tipo histológico; **B.** grau de malignidade; **C.** tamanho do tumor (T); **D.** *status* nodal (N); **E.** idade; **F.** recidiva; **G.** ulceração tumoral; **H.** castração; **I.** uso de contraceptivo; **J.** pseudocistose. A mediana de expressão para cada característica analisada está apresentada no gráfico. Os valores de P foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre os pares e pelo teste de Kruskal-Wallis para as múltiplas comparações. Ca= carcinoma, 0= ausente e 1= presente.

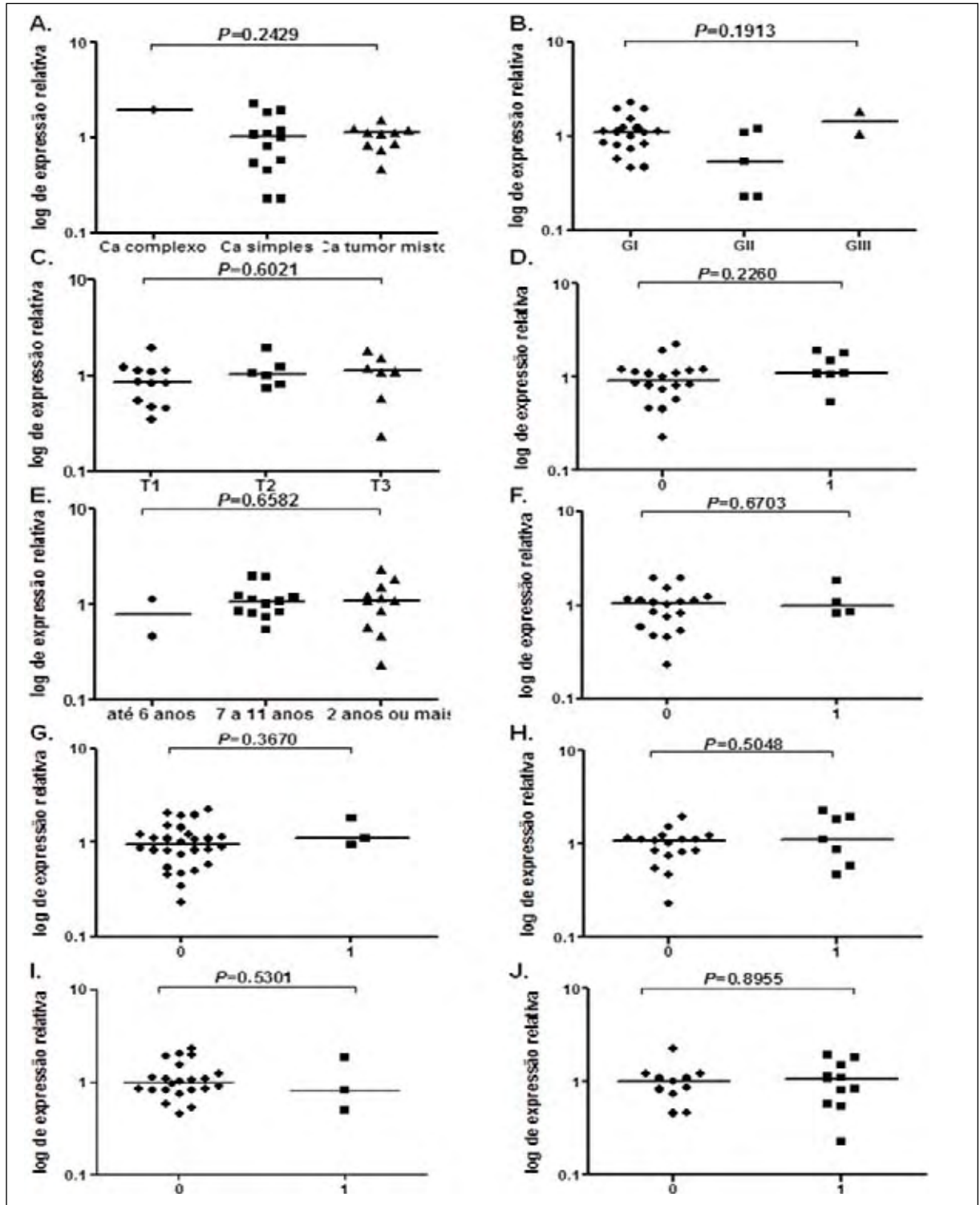


Figura 7. Níveis de transcritos de *VEGF* segundo: **A.** tipo histológico; **B.** grau de malignidade; **C.** tamanho do tumor (T); **D.** status nodal (N); **E.** idade; **F.** recidiva; **G.** ulceração tumoral; **H.** castração; **I.** uso de contraceptivo; **J.** pseudociese. A mediana de expressão para cada característica analisada está apresentada no gráfico. Os valores de P foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre os pares e pelo teste de Kruskal-Wallis para as múltiplas comparações. Ca= carcinoma, 0= ausente e 1= presente.

5.3 Análise da expressão proteica do ATM, p53 e VEGF

O padrão de imunomarcção da proteína ATM foi citoplasmática e/ou membranosa em todas as amostras, a glândula mamária normal apresentou escore 4 de marcação e intensidade 2 (Figura 8). Houve diferença significativa do percentual de células imunomarcadas quando comparada entre todos os grupos ($p=0,0009$). Além disso, foi observada uma diminuição significativa da expressão proteica do ATM entre os grupos 1 e 3 ($p=0,0004$) e entre os grupos 1 e 4 ($p=0,0002$). Foi observada também diferença estatística entre as mamas normais e as mamas com lesões benignas ($p=0,0313$). Não houve diferença estatística da expressão da proteína ATM entre as lesões benignas, os carcinomas mamários não metastáticos e metastáticos ($p>0,10$) (Tabela 8). Em relação a intensidade de marcação do ATM houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,0622$), sendo bastante significativa entre os grupos 1 e 4 ($p=0,0061$) (Tabela 9).

Os valores de p foram obtidos pelo teste de Quiquadrado para as três proteínas analisadas, ATM, p53 e VEGF.

Tabela 8. Resultados da análise da expressão proteica da proteína ATM detectada pela técnica de imuno-histoquímica em mamas normais, lesões benignas, carcinomas mamários não metastáticos e carcinomas metastáticos avaliados pelo escore de marcação nos tecidos.

Grupos	Escore n (%)			
	1	2	3	4
Mama normal	0	0	0	12 (100)
Lesão benigna	2 (18)	2 (18)	2 (18)	5 (46)
Ca não metastático	3 (16)	4 (21)	8 (42)	4 (21)
Ca metastático	2 (18)	5 (46)	3 (27)	1 (9)

Ca= Carcinoma

Tabela 9. Resultados da análise de intensidade de marcação da proteína ATM nos quatro grupos estudados.

Grupos	Intensidade n (%)		
	1	2	3
Mama normal	2 (17)	8 (66)	2 (17)
Lesão benigna	6 (55)	3 (27)	2 (18)
Ca não metastático	9 (47)	9 (47)	1 (6)

Ca metastático	9 (82)	1 (9)	1 (9)
Ca= Carcinoma			

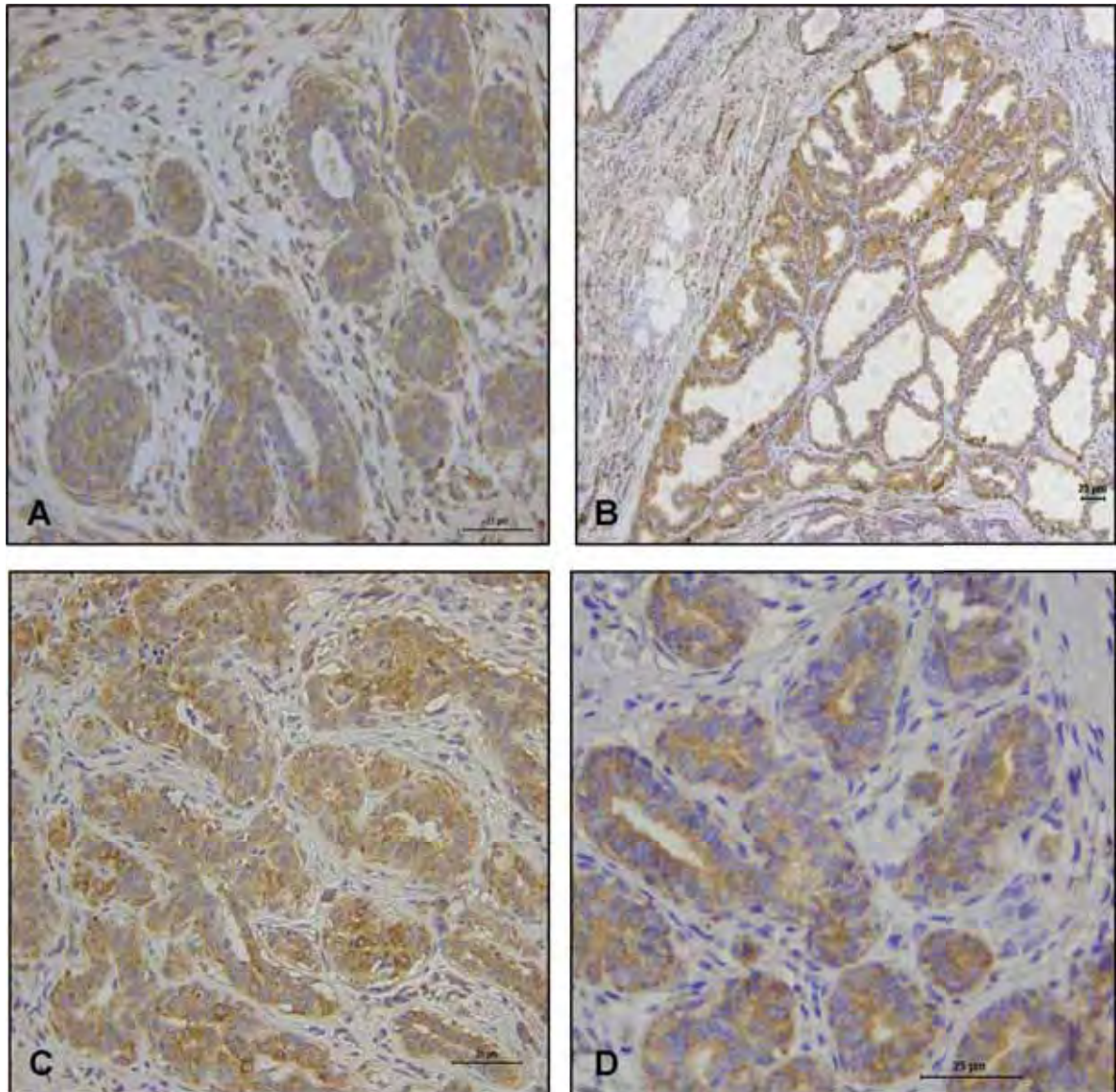


Figura 8. Fotomicrografia de imunomarcção citoplasmática e/ou membranosa da proteína ATM.
A. Mama normal: escore 4 e intensidade 2. **B.** Tumor misto benigno: escore 4 e intensidade 1. **C.** Carcinoma em tumor misto não metastático: escore 4 e intensidade 2.
D. Carcinoma tubular metastático: escore 3 e intensidade 1.

A imunomarcção da proteína p53 foi nuclear e as mamas normais apresentaram positividade das células epiteliais superior a 75% (escore 4) (Figura 9). Em relação aos quatro grupos estudados não foi verificada diferença estatística na extensão de imunomarcção ($p > 0,10$), entretanto, foi verificada diminuição da proteína entre as amostras de carcinomas mamários metastáticos e as mamas

normais ($p=0,0143$) e entre os carcinomas mamários não metastáticos e as mamas normais ($p=0,0417$) (Tabela 10).

Tabela 10. Resultados da análise de distribuição de marcação da proteína p53 nos quatro grupos estudados.

Grupos	Escore n (%)			
	1	2	3	4
Mama normal	1 (8)	0	2 (17)	9 (75)
Lesão benigna	2 (18)	2 (18)	2 (18)	5 (46)
Ca não metastático	6 (32)	4 (21)	4 (21)	5 (26)
Ca metastático	4 (36)	4 (36)	1 (10)	2 (18)

Ca= carcinoma

Em todas as amostras analisadas, o padrão de imunomarcção do VEGF foi citoplasmático e o escore de imunomarcção da mama normal foi 1 e de fraca intensidade (Figura 10). Em relação ao percentual de células imunomarcadas não foi verificada diferença estatística entre os quatro grupos estudados ($p=0,1588$), entretanto, foi observado um aumento da expressão da proteína entre os grupos 2 e 1 ($p=0,0583$), 3 e 1 ($p=0,0507$) e 4 e 1 ($p=0,0431$), entre os grupos 2, 3 e 4 não houve diferença estatística ($p>0,10$). Enquanto, em relação à intensidade de marcação da proteína VEGF não houve diferença estatística entre os quatro grupos ($p=0,4019$) (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11. Resultados da extensão de imunomarcção (escore) da proteína VEGF nos quatro grupos estudados.

Grupos	Escore n (%)			
	1	2	3	4
Mama normal	6 (50)	3 (25)	0	3 (25)
Lesão benigna	3 (27)	0	3 (27)	5 (46)
Ca não metastático	3 (16)	2 (11)	4 (21)	10 (53)
Ca metastático	1 (9)	1 (9)	2 (18)	7 (64)

Ca= carcinoma.

Tabela 12. Resultados da análise de intensidade de marcação proteica do VEGF nos quatro grupos estudados.

Grupos	Intensidade de Marcação n (%)		
	1	2	3
Mama normal	8 (66)	2 (17)	2 (17)
Lesão benigna	3 (27)	7 (64)	1 (9)

Ca não metastático	7 (37)	10 (53)	2 (10)
Ca metastático	4 (37)	6 (55)	1 (8)

Ca= carcinoma.

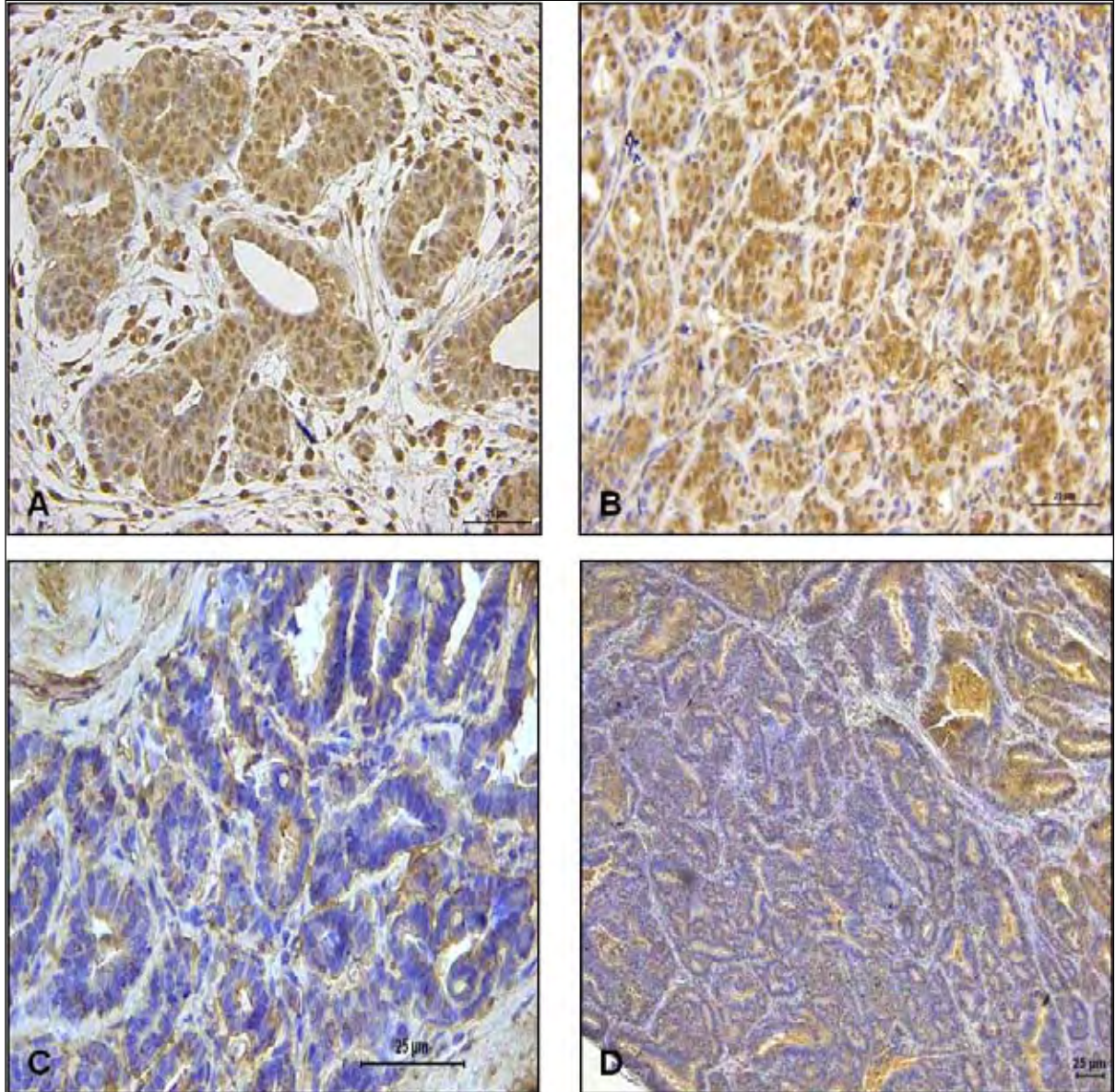


Figura 9. Fotomicrografia de imunomarcção nuclear da proteína p53. **A.** Mama normal: escore 4. **B.** Adenoma mamário: escore 4. **C.** Carcinoma tubular não metastático: escore 1. **D.** Carcinoma tubular metastático: escore 1.

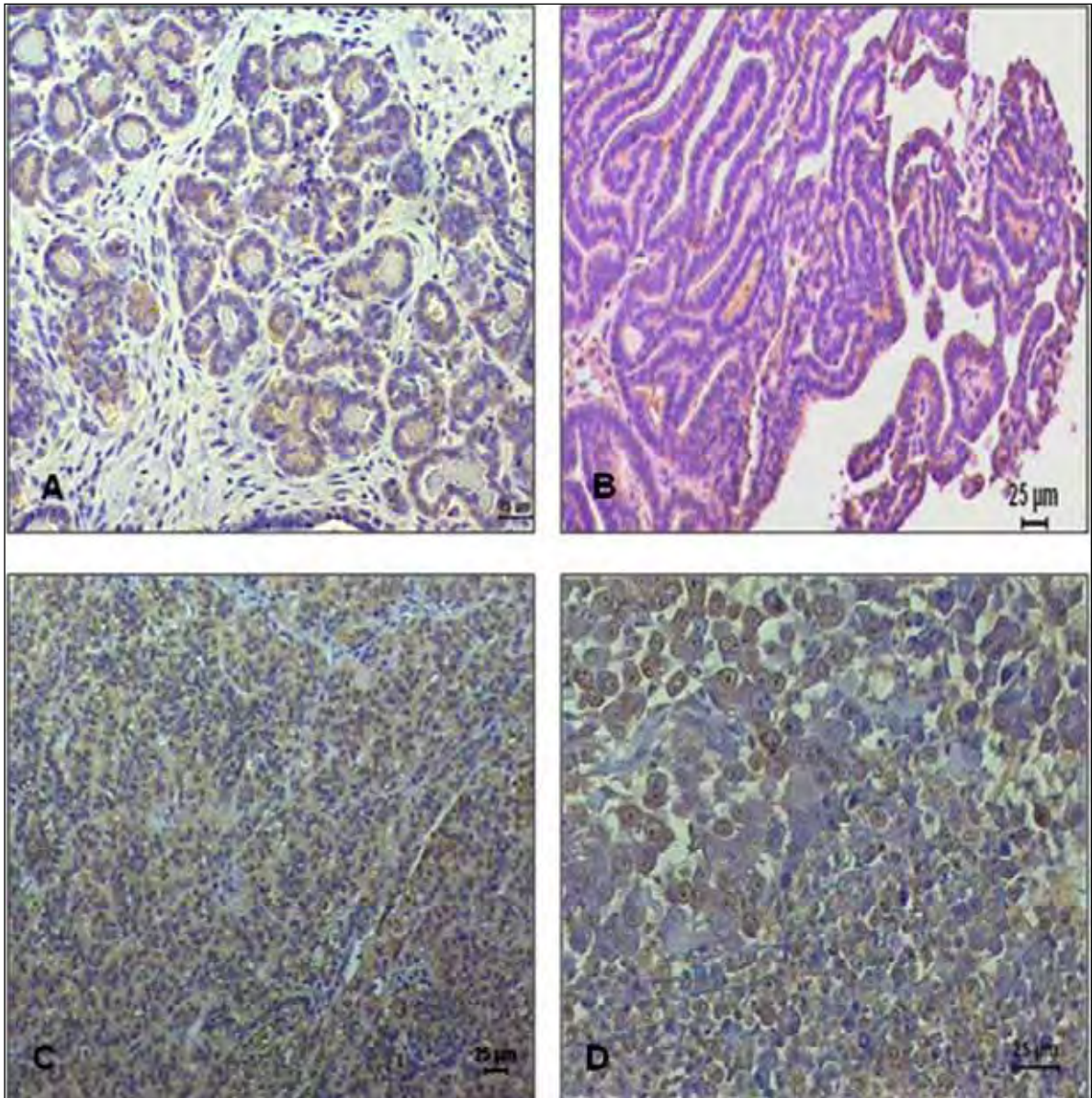


Figura 10. Fotomicrografia de imunomarcagem citoplasmática da proteína VEGF. **A.** Mama normal: escore 1 e intensidade 1. **B.** Hiperplasia mamária: escore 1 e intensidade 1. **C.** Carcinoma sólido não metastático: escore 4 e intensidade 2. **D.** Carcinoma anaplásico metastático: escore 4 e intensidade 2.

A seguir foi realizada análise de correlação de expressão proteica entre as três proteínas estudadas pelo teste de Spearman, não sendo verificada correlação estatística entre elas (Tabela 13).

Tabela 13. Análise de correlação de expressão das proteínas ATM, p53 e VEGF.

	Correlação de Spearman	
	R	P
p53 ^a	0,1143	0,5199
p53 ^b	0,2239	0,2031
VEGF ^a	0,0406	0,8195

r = coeficiente de correlação. a= correlação com ATM e b= correlação com VEGF

5.4 – Análise de expressão proteica do ATM, p53 e VEGF e associação com as variáveis clínico-histopatológicas

Assim como realizado na análise de expressão gênica, as proteínas ATM, p53 e VEGF foram comparadas com as variáveis clínicas e histopatológicas. As diferenças no número de casos avaliados para cada parâmetro se devem à ausência de informações clínicas fornecidas pelo proprietário do animal

A correlação entre os escores e intensidades de expressão proteica destes marcadores e os dados clínicos e histopatológicos em geral não revelou resultados estatisticamente significativos (Tabelas 14, 15, 16, 17 e 18). Entretanto, foi identificada fraca marcação da proteína ATM nas amostras com metástases em linfonodos ($p=0,0887$) e também com ulceração tumoral ($p=0,0997$). Além disso, Foi verificado aumento da expressão da proteína VEGF associado aos carcinomas simples quando comparados com o carcinoma complexo ($p=0,0372$) e diferença estatística na intensidade da marcação entre as idades das pacientes ($p=0,0294$) e o uso de contraceptivos ($p=0,0574$).

Tabela 14. Associação entre os dados clínicos e histopatológicos com o escore de imunomarcção da proteína ATM detectada pela imuno-histoquímica. Os valores de p foram obtidos pelo teste de Quiquadrado.

Variáveis	N	ATM N (%)				p
		1	2	3	4	
Tipo histológico						0,2369
Ca complexo	1	1 (100)	0	0	0	
Ca simples	17	1 (6)	6 (35)	6 (35)	4 (24)	
Ca tumor misto	12	3 (25)	3 (25)	5 (42)	1 (8)	

Grau						0,2248
GI	19	3 (16)	5 (26)	8 (42)	3 (16)	
GII	8	2 (28)	3 (36)	3 (36)	0	
GIII	3	0	1 (33)	0	2 (67)	
T (tamanho tumor)						0,7802
T1	14	3 (21)	2 (14)	6 (44)	3 (21)	
T2	7	1 (14)	3 (43)	2 (29)	1 (14)	
T3	9	1 (11)	4 (44)	3 (32)	1 (11)	
N (status nodal)						0,8069
N1	7	2 (29)	2 (29)	2 (29)	1 (13)	
N0	23	3 (13)	7 (30)	9 (40)	4 (17)	
Idade						0,6552
≤ 6 anos	2	0	0	2 (100)	0	
7 a 11 anos	13	2 (15)	4 (32)	5 (38)	2 (15)	
12 ≥	15	3 (20)	5 (33)	4 (27)	3 (20)	
Ulceração						0,2092
sim	4	0	3 (75)	1 (15)	0	
não	25	5 (20)	6 (24)	10 (40)	4 (16)	
Recidiva						0,4799
sim	6	2 (33)	1 (17)	3 (50)	0	
não	21	3 (14)	6 (29)	8 (38)	4 (19)	
Castração						0,5238
sim	8	2 (25)	1 (13)	3 (37)	2 (25)	
não	20	3 (15)	7 (35)	8 (40)	2 (10)	
Contraceptivo						0,3301
sim	3	0	2 (67)	0	1 (33)	
não	21	4 (19)	6 (29)	8 (38)	3 (14)	
Pseudociese						0,5742
sim	14	2 (14)	4 (29)	7 (50)	1 (7)	
não	12	3 (25)	4 (33)	3 (25)	2 (17)	

Tabela 15. Associação entre a intensidade de expressão proteica do ATM com as variáveis clínico-histopatológicas. Os valores de p foram obtidos pelo teste de Quiquadrado.

Variáveis	N	N (%)			p
		1	2	3	
Tipo histológico					0,3831
Ca complexo	1	1 (100)	0	0	
Ca simples	17	10 (59)	7 (41)	0	
Ca tumor misto	12	7 (58)	3 (25)	2 (17)	
Grau					0,7562
GI	19	10 (53)	7 (37)	2 (10)	

GII	8	6 (75)	2 (25)	0	
GIII	3	2 (67)	1 (33)	0	
T (tamanho tumor)					0,9323
T1	14	8 (57)	5 (36)	1 (7)	
T2	7	4 (57)	3 (43)	0	
T3	9	5 (56)	3 (33)	1 (11)	
N (status nodal)					0,0887
N1	7	6 (86)	0	1 (14)	
N0	23	12 (52)	10 (43)	1 (5)	
Idade					0,1162
≤ 6 anos	2	1 (50)	0	1 (50)	
7 a 11 anos	13	8 (62)	4 (31)	1 (7)	
12 ≥	15	10 (67)	5 (33)	0	
Ulceração					0,0997
sim	4	3 (75)	0	1 (25)	
não	25	12 (48)	12 (48)	1 (4)	
Recidiva					0,3737
sim	6	5 (83)	1 (17)	0	
não	21	11 (53)	8 (38)	2 (9)	
Castração					0,3460
sim	8	4 (50)	4 (50)	0	
não	20	13 (65)	5 (25)	2 (10)	
Contraceptivo					0,3575
sim	3	3 (100)	0	0	
não	21	12 (57)	8 (38)	1 (5)	
Pseudociese					0,6343
sim	14	9 (64)	4 (29)	1 (7)	
não	12	8 (67)	4 (33)	0	

Tabela 16. Associação entre o escore de imunomarcção da proteína p53 com as variáveis clínico-histopatológicas. Os valores de p foram obtidos pelo teste de Quiquadrado.

Variáveis	N	N (%)				p
		1	2	3	4	
Tipo histológico						0,1502
Ca complexo	1	0	0	0	1 (100)	
Ca simples	17	7 (40)	4 (24)	3 (18)	3 (18)	
Ca tumor misto	12	3 (25)	4 (33)	2 (17)	3 (25)	
Grau						0,6697
GI	19	7 (37)	6 (32)	4 (21)	2 (10)	
GII	8	3 (38)	1 (12)	1 (12)	3 (38)	
GIII	3	1 (34)	1 (33)	0	1 (33)	

T (tamanho tumor)						0,8697
T1	14	6 (44)	3 (21)	3 (21)	2 (14)	
T2	7	2 (29)	1 (15)	1 (15)	3 (43)	
T3	9	2 (22)	4 (44)	1 (12)	2 (22)	
N (status nodal)						0,5266
N1	7	2 (29)	4 (57)	0	1 (14)	
N0	23	8 (35)	4 (17)	5 (22)	6 (26)	
Idade						0,6061
≤ 6 anos	2	0	1 (50)	1 (50)	0	
7 a 11 anos	13	5 (38)	2 (15)	2 (15)	4 (32)	
12 ≥	15	5 (33)	5 (33)	2 (13)	3 (21)	
Ulceração						0,7496
sim	4	1 (25)	1 (25)	0	2 (50)	
não	25	9 (36)	7 (28)	4 (16)	5 (20)	
Recidiva						0,8099
sim	6	3 (50)	2 (33)	1 (17)	0	
não	21	6 (29)	6 (29)	3 (13)	6 (29)	
Castração						0,1444
sim	8	4 (50)	3 (38)	1 (12)	0	
não	20	5 (25)	5 (25)	3 (15)	7 (35)	
Contraceptivo						0,3301
sim	3	0	1 (33)	0	2 (67)	
não	21	6 (29)	7 (33)	4 (19)	4 (19)	
Pseudociese						0,6946
sim	14	7 (50)	4 (29)	0	3 (21)	
não	12	2 (17)	3 (25)	4 (33)	3 (25)	

Tabela 17. Associação entre os dados clínicos e histopatológicos e o escore de imunomarcção da proteína VEGF. Os valores de p foram obtidos pelo teste de Quiquadrado.

Variáveis	N	N (%)				p
		1	2	3	4	
Tipo histológico						0,1246
Ca complexo	1	0	1(100)	0	0	
Ca simples	17	3(18)	1 (6)	3 (18)	10 (58)	
Ca tumor misto	12	1 (8)	1 (8)	3 (26)	7 (58)	
Grau						0,4089
GI	19	2 (11)	3 (16)	5 (26)	9(47)	
GII	8	2 (25)	0	0	6 (75)	
GIII	3	0	0	1 (33)	4 (67)	
T (tamanho tumor)						0,8751
T1	14	3 (21)	1 (8)	3 (21)	7 (50)	

T2	7	0	1 (14)	1 (14)	5 (72)	
T3	9	1 (11)	1 (11)	2 (22)	5 (56)	
N (status nodal)						0,5478
N1	7	0	1 (14)	2 (29)	4 (57)	
N0	23	4 (17)	1 (4)	5 (22)	13 (57)	
Idade						0,4908
≤ 6 anos	2	0	0	1 (50)	1 (50)	
7 a 11 anos	13	1 (8)	1 (8)	1 (8)	10 (76)	
12 ≥	15	3 (20)	2 (13)	4 (27)	6 (40)	
Ulceração						0,6841
sim	4	0	0	1 (25)	3 (75)	
não	25	4 ()	3 ()	5 (20)	13 (52)	
Recidiva						0,4740
sim	6	2 (33)	0	1 (17)	3 (50)	
não	21	2 (10)	2 (10)	5 (23)	12 (57)	
Castração						0,2625
sim	8	2 (24)	2 (24)	1 (14)	3 (38)	
não	20	2 (10)	1 (5)	5 (25)	12 (60)	
Contraceptivo						0,1036
sim	3	1 (33)	0	2 (67)	0	
não	21	3 (14)	3 (14)	3 (14)	12 (58)	
Pseudociese						0,6883
sim	14	2 (14)	2 (14)	2 (14)	8 (58)	
não	12	1 (8)	1 (8)	4 (33)	6 (51)	

Tabela 18. Associação entre a intensidade de imunomarcção da proteína VEGF com os dados clínicos e histopatológicos. Os valores de p foram obtidos pelo teste de Quiquadrado.

Variáveis	N	N (%)			p
		1	2	3	
Tipo histológico					0,1101
Ca complexo	1	1 (100)	0	0	
Ca simples	17	5 (29)	12 (71)	0	
Ca tumor misto	12	4 (33)	5 (42)	3 (25)	
Grau					0,4300
GI	19	7 (37)	9 (47)	3 (16)	
GII	8	2 (25)	6 (75)	0	
GIII	3	2 (67)	1 (33)	0	
T (tamanho tumor)					0,5197
T1	14	5 (36)	8 (57)	1 (7)	
T2	7	1 (14)	5 (72)	1 (14)	
T3	9	5 (56)	3 (33)	1 (11)	

N (status nodal)					0,7981
N1	7	3 (43)	3 (43)	1 (14)	
N0	23	8 (35)	13 (57)	2 (8)	
Idade					0,0294
≤ 6 anos	2	0	1 (50)	1 (50)	
7 a 11 anos	13	2 (15)	9 (70)	2 (15)	
12 ≥	15	9 (60)	6 (40)	0	
Ulceração					0,5750
sim	4	1 (25)	2 (50)	1 (25)	
não	25	9 (36)	14 (56)	2 (8)	
Recidiva					0,3173
sim	6	2 (33)	2 (33)	2 (34)	
não	21	7 (33)	12 (57)	2 (10)	
Castração					0,3932
sim	8	4 (50)	4 (50)	0	
não	20	6 (30)	11 (55)	3 (15)	
Contraceptivo					0,0574
sim	3	3 (100)	0	0	
não	21	6 (29)	14 (67)	1 (4)	
Pseudociese					0,2485
sim	14	7 (50)	7 (50)	0	
não	12	4 (33)	7 (58)	2 (9)	

5.5 Correlação entre os resultados da expressão gênica e proteica do ATM, p53 e VEGF

Os níveis de transcritos do *ATM*, *TP53* e *VEGF* foram comparados com a expressão de suas respectivas proteínas em amostras pareadas. Para os marcadores ATM e p53 não foi detectada correlação estatística entre os resultados obtidos por ambas as técnicas em relação aos quatro grupos analisados. (Figuras 11 e 12). Entretanto, níveis mais baixos de transcritos ($QR < 0,5$) de *ATM* foram correlacionados com positividade proteica menor que 25% das células (escore 1), havendo diferença estatística quando comparado com o escore 4 com aumento de transcritos ($QR > 2$) ($P=0.0316$, teste de Mann-Whitney) (Figura 11).

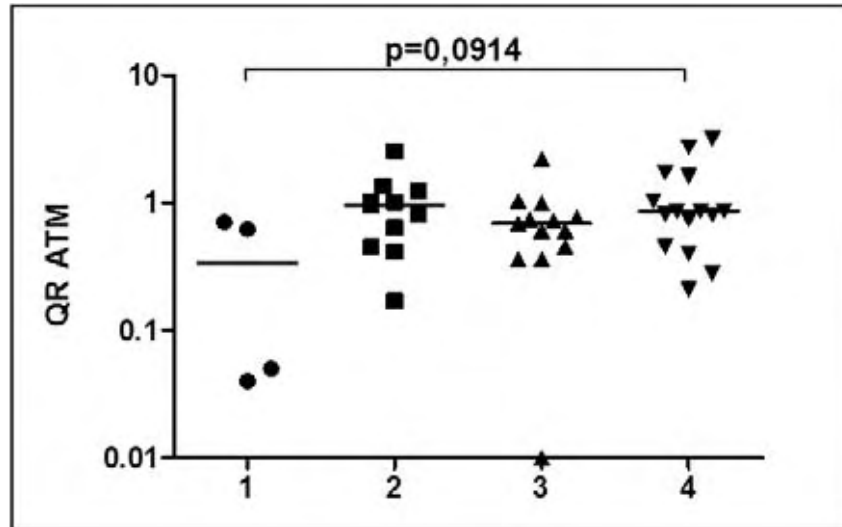


Figura 11. Comparação entre os níveis de expressão gênica e proteica (escores 1 a 4) do ATM nos tumores benignos, carcinomas mamários não metastáticos e metastáticos, resultado obtido pelo teste de Kruskal-Wallis.

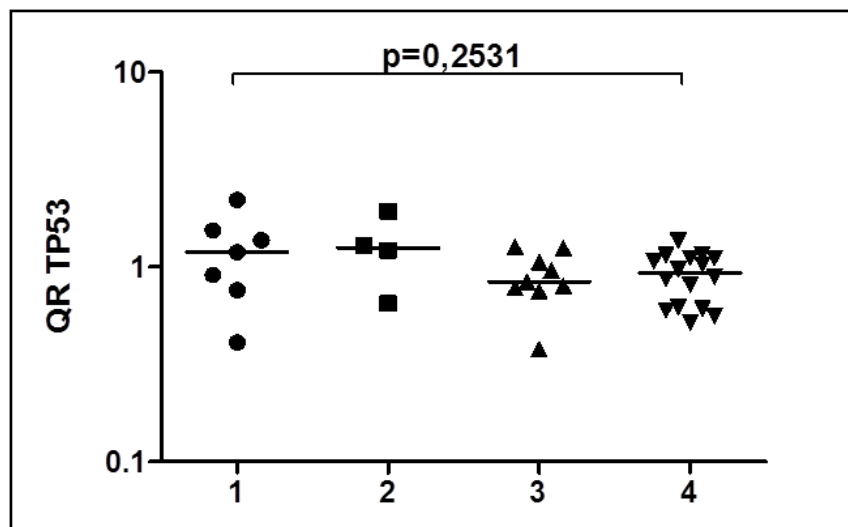


Figura 12. Comparação entre os níveis de expressão gênica e proteica do p53 (escores 1 a 4) nos tumores benignos, carcinomas mamários não metastáticos e metastáticos, resultado obtido pelo teste de Kruskal-Wallis.

Correlação estatística da expressão gênica e proteica do VEGF foi observada entre os quatro grupos estudados ($p=0,0402$) sendo identificada uma correlação estatisticamente significativa entre os escore 4 e 2, uma vez que o escore 4 apresentou um aumento bastante significativo de transcritos de VEGF, quando comparado ao escore 2, em que apresentou diminuição dos transcritos ($p=0,0048$). No entanto, não foi verificada diferença estatística entre os outros escores com os respectivos níveis de transcritos (Figura 13).

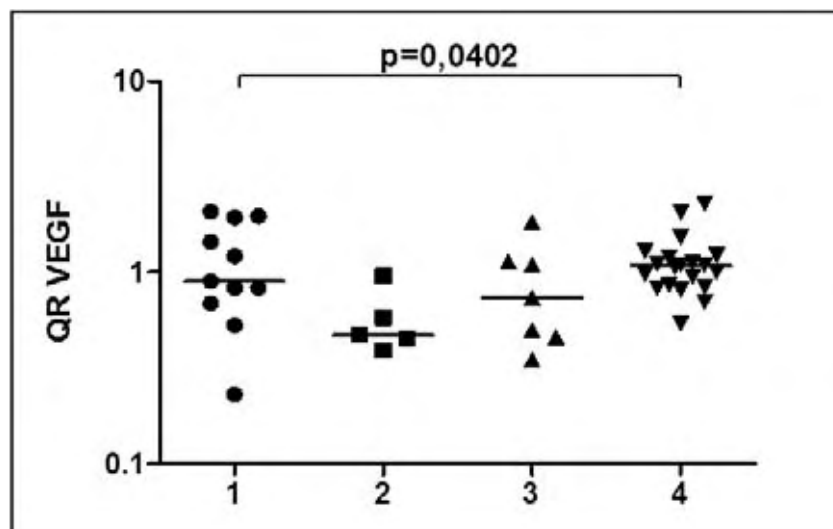


Figura 13. Comparação entre os níveis de expressão gênica e proteica do VEGF (escores 1 a 4) nos grupos 2, 3 e 4, resultado obtido pelo teste de Kruskal-Wallis.

5.6 Análise de sobrevida das pacientes com carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos

O tempo de sobrevida global das pacientes pertencentes aos grupos 3 e 4 foi avaliado comparando os grupos entre si (Figura 14), sendo que a sobrevida global média do grupo 4 foi de 8 meses ($8 \pm 6,1$ meses) e do grupo 3 de 12 meses ($12 \pm 4,0$ meses).

Posteriormente, foi avaliado o tempo de sobrevida global das pacientes com carcinomas mamários (metastáticos e não metastáticos) em relação aos parâmetros clínicos e histopatológicos e com a expressão gênica e proteica do ATM, p53 e VEGF (Figuras 15,16, 17), também foi realizado a comparação dos grupos tumorais com o tratamento das pacientes, ou seja, tratamento cirúrgico ou cirúrgico associado à quimioterapia antineoplásica adjuvante (Figura 18). As curvas de sobrevida foram avaliadas pelo método de Kaplan-Meier.

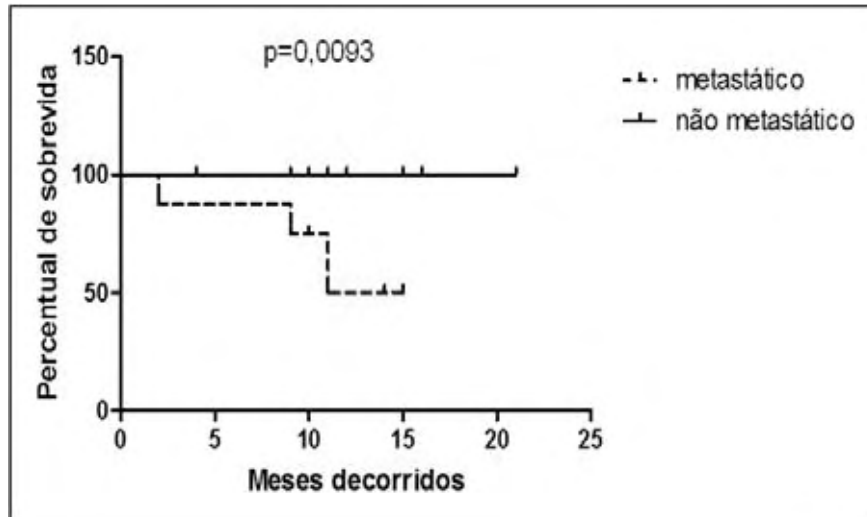


Figura 14. Tempo de sobrevida global das pacientes com carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos.

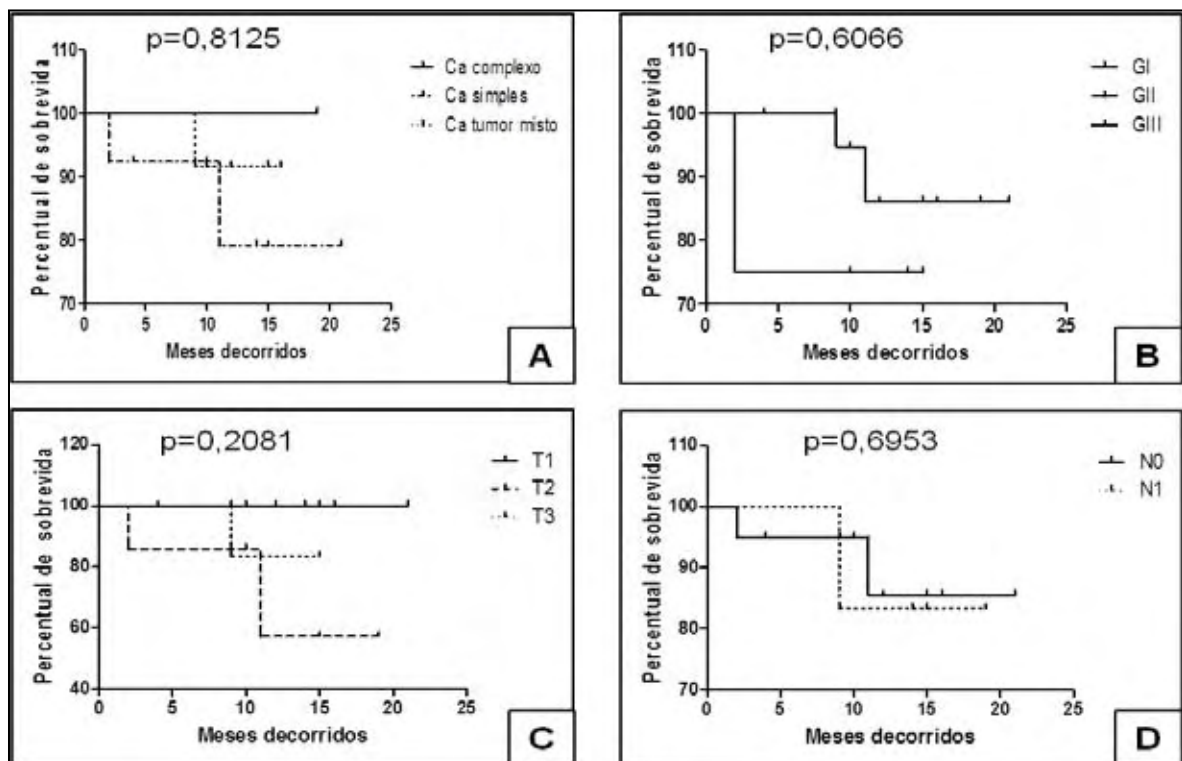


Figura 15. Avaliação do tempo de sobrevida global das pacientes em relação aos parâmetros clínicos e histopatológicos. **A.** Tipo histológico. **B.** Grau de malignidade. **C.** Tamanho tumoral. **D.** Status nodal.

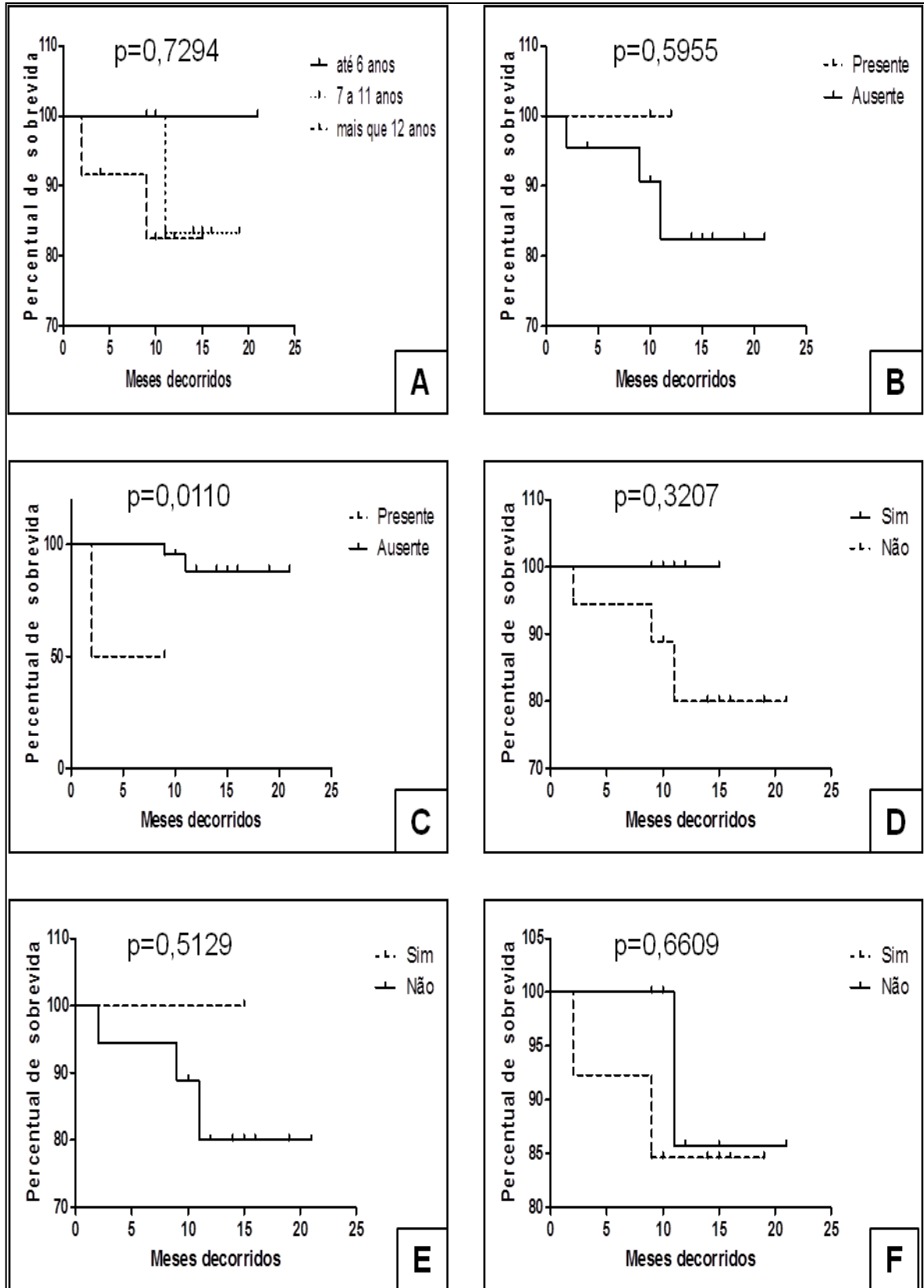


Figura 16. Avaliação do tempo de sobrevida global das pacientes em relação aos parâmetros clínicos. **A.** Idade. **B.** Recidiva. **C.** Ulceração tumoral. **D.** *Status* reprodutivo. **E.** Uso de contraceptivo. **F.** Pseudociese.

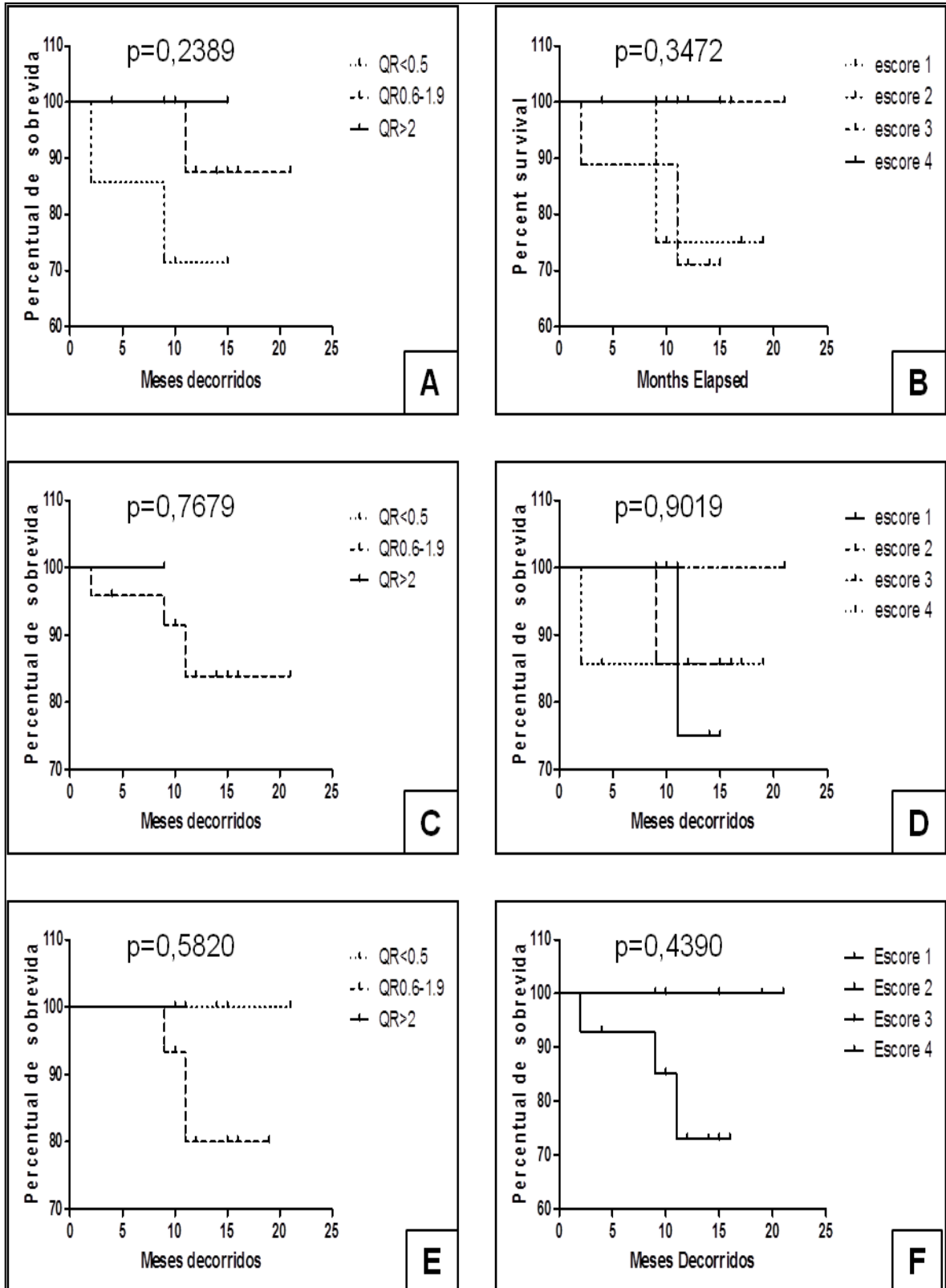


Figura 17. Avaliação do tempo de sobrevida global das pacientes em relação à expressão gênica e proteica do ATM, p53 e VEGF. **A.** Expressão gênica do ATM. **B.** Expressão proteica do ATM. **C.** Expressão gênica do TP53. **D.** Expressão proteica do p53. **E.** Expressão gênica do VEGF. **F.** Expressão proteica do VEGF.

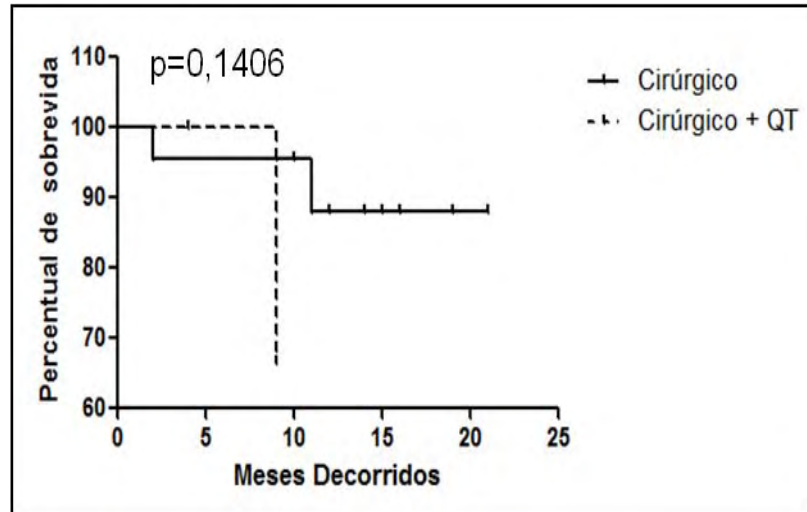


Figura 18. Avaliação do tempo de sobrevivida global das pacientes em relação ao tratamento utilizado (cirúrgico ou cirúrgico associado ao tratamento quimioterápico). QT=quimioterapia.

6 DISCUSSÃO

Nos tumores de mama de cadelas o tipo e grau histológico e dados clínicos são considerados fatores prognósticos (SORENMO, 2003; GAMA; ALVES; SCHMIT, 2008; DE NARDI et al., 2009; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013), . Entretanto, poucos estudos avaliam a correlação da expressão gênica e proteica de biomarcadores considerados prognósticos nos tumores de mama em mulheres

As pacientes do presente estudo apresentavam faixa etária média de 11 anos ($11,1 \pm 2,95$ anos), corroborando com a faixa etária de maior incidência de neoplasias mamárias em cadelas (DE NARDI et al., 2009; CASSALI et al., 2011; SORENMO et al., 2011; HENRY, 2013; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013). Esta também foi a idade média das pacientes acometidas por lesões mamárias benignas, discordando com o estudo de Sorenmo et al. (2009), no qual cita que há uma predominância de cadelas mais velhas com tumores malignos quando comparado aos benignos.

Em relação às raças destas pacientes, 45% eram sem raça definida (SRD), 13% Poodle, 10% Cocker, 10% Teckel e 10% Pinscher, o restante foram representados pelas raças Boxer, Pastor Alemão, Pastor Belga, Pitbull e Rottweiler. Assim, as raças de maior prevalência deste estudo concordam com outros trabalhos (DE NARDI et al., 2009; BERGE; BØRRESEN-DALE; LINGAAS, 2011). Entretanto, segundo Sorenmo (2003), a predisposição a determinadas raças pode variar de acordo com a região geográfica.

Alguns autores sugerem ainda que a incidência maior do câncer de mama em algumas raças pode estar relacionada a fatores genéticos hereditários, como fator de risco para o desenvolvimento desta enfermidade (SORENMO, 2003; BERGE; BØRRESEN-DALE; LINGAAS, 2011; IM et al., 2012).

Outro fator de risco ao desenvolvimento do tumor de mama refere-se ao *status* reprodutivo das cadelas, acredita-se que estes tumores sejam hormônio dependente e assim fêmeas intactas ou castradas tardiamente seriam mais predispostas ao acometimento desta enfermidade (SORENMO et al., 2011;

HENRY, 2013). Contudo, Beauvais; Cardwell e Brodbelt (2012) identificaram em uma revisão sistemática avaliando 11.149 estudos relacionados à associação entre a castração e o desenvolvimento de tumor de mama em cadelas, falhas na metodologia da grande maioria dos estudos que tentam comprovar a influência hormonal no desenvolvimento do câncer de mama de cadelas, encontrando viés de alto, médio e baixo risco, sendo que um destes trabalhos identificou associação entre castração e o risco de desenvolvimento de tumor de mama, dois estudos não encontraram esta associação e um estudo relatou algum efeito da castração sobre o desenvolvimento de tumor de mama, entretanto, não apresentou números.

No entanto, 71% (27/38 casos) das pacientes deste estudo não eram castradas e, além disso, 47% (16/34 casos) apresentavam histórico de pseudocirose, sugerindo uma possível influência dos fatores hormonais no desenvolvimento da neoplasia mamária. Outros estudos identificaram uma alta porcentagem de pseudocirose relacionada às neoplasias malignas (OLIVEIRA et al., 2003; OLIVEIRA-FILHO et al., 2010).

Em relação à administração prévia de progestágenos, 12,5% (3/24 CASOS) das pacientes com neoplasia maligna e 29% (2/7 casos) com tumor benigno, fizeram uso desta medicação e, assim como observado por Oliveira et al. (2003), a correlação da administração deste fármaco foi maior em relação aos tumores benignos do que malignos.

Quanto a análise de sobrevida das pacientes deste estudo, foi constatado que as cadelas pertencentes ao grupo quatro (carcinomas mamários metastáticos) apresentaram sobrevida global média de 8 meses ($8 \pm 6,1$ meses), resultado inferior quando comparado com as pacientes do grupo 3 (carcinomas mamários não metastáticos), que foi de 12 meses ($12 \pm 4,0$ meses) ($p=0,0093$), sendo que três pacientes do grupo 4 e uma do grupo 3 foi submetida à tratamento com quimioterapia adjuvante. Esta diferença, estatisticamente significativa, entre os grupos tumorais é esperada, uma vez que a metástase é uma característica que está diretamente relacionada com o tempo de sobrevida e ao prognóstico da paciente, tanto em mulheres quanto em cadelas (GUPTA et al., 2007; KHANNA; HUNTER, 2005; DE NARDI et al., 2009; HOLLIER et al., 2009; KLOPFLEISCH; GRUBER, 2009).

Em relação ao tipo histológico dos tumores, constatou-se que o carcinoma em tumor misto e o carcinoma tubular foram os tipos predominantes, sendo que o primeiro correspondeu a 40% dos casos e o segundo a 30%, corroborando com os outros trabalhos que citam a alta frequência destes tipos histológicos nas cadelas (CASSALI et al., 2011), porém divergindo do estudo de Sorenmo (2003) em que cita o carcinoma tubular como tipo histológico mais prevalente em cadelas. Em contrapartida, o carcinoma complexo e o micropapilar foram os tumores de menor incidência, assim como descrito em estudos prévios (SORENMO, 2003; CASSALI et al.; 2011; GAMBA et al., 2012).

Apesar de o carcinoma micropapilar ser considerado um tumor bastante agressivo, associado a um prognóstico ruim (CASSALI et al.; 2011; GAMBA et al., 2012), o único caso com este tipo histológico está vivo até o presente momento, apresentando sobrevida global de 9 meses, mesmo tendo desenvolvido metástases em linfonodo regional e cutânea, sendo submetida aos tratamentos cirúrgico e quimioterápico com doxorrubicina e carboplatina (dois ciclos) e, posteriormente, gencitabina com carboplatina (4 ciclos). Metástases relacionadas à este tipo de tumor são bastante frequentes (CASSALI et al.; 2011; GAMBA et al., 2012).

O carcinoma anaplásico é outro tipo histológico também relacionado a um prognóstico ruim devido ao desenvolvimento de recidivas precoces e metástases (CASSALI et al.; 2011) e, neste estudo, duas pacientes foram diagnosticadas com este tipo de tumor, e ambas vieram a óbitos, apresentando sobrevida global inferior a 30 dias, apresentando um prognóstico bastante ruim.

Na correlação do tipo histológico com o grau de malignidade do tumor foi verificado que o único caso de carcinoma complexo apresentava grau I de malignidade, conforme relatado por Karayannopoulou et al. (2005). Enquanto os carcinomas simples, representados pelos subtipos carcinomas papilar, tubular, sólido e anaplásico, apresentaram as três graduações, não sendo observada uma associação do tipo histológico com o grau de malignidade do tumor, diferentemente da citação de Karayannopoulou et al. (2005). No entanto, os tipos histológicos considerados de pior prognóstico (carcinoma anaplásico e micropapilar) foram relacionados com graus II e III de malignidade.

Das cinco pacientes que vieram à óbito durante o seguimento clínico deste estudo, apenas uma apresentava tumor com grau III de malignidade, enquanto três apresentaram tumor com grau II e duas com grau I. Deste modo, não foi identificada correlação do grau de malignidade do tumor com o tempo de sobrevida das pacientes conforme relatado nos trabalhos de Philibert et al. (2003) e Peña et al. (2013), entretanto, o baixo número de amostra pode ter interferido neste resultado.

Outra característica importante para o estabelecimento do prognóstico do câncer de mama em cadelas refere-se ao tamanho tumoral e ao *status* nodal. Assim, alguns autores sugerem que o tamanho tumoral seja um fator prognóstico independente, uma vez que tumores maiores que 3 cm têm sido associados com piores prognósticos (SORENMO, 2003; SORENMO et al. 2011). No presente trabalho verificou-se que todas as cadelas (5/30) que faleceram pelo câncer de mama apresentavam tumores com tamanho superior a 3 cm e 100% destas pacientes eram pertencentes ao grupo 4. Entretanto, não foi observada associação entre o tamanho tumoral e o tempo de sobrevida das pacientes ($p=0,2081$).

A presença de metástases em linfonodos regionais das cadelas também não foi associada com a diminuição do tempo de sobrevida, uma vez que 63% das pacientes N1 apresentaram sobrevida superior a 13 meses, diferentemente do observado no trabalho de Sorenmo (2003), esta diferença pode ser decorrente do pequeno número de pacientes com metástases em linfonodos regionais analisado.

Outro dado interessante observado neste estudo foi que as pacientes com ulceração tumoral apresentaram baixa sobrevida global ($p=0,0110$), Oliveira et al. (2003) verificaram que 72,7% dos tumores ulcerados analisados em seu trabalho estavam relacionados aos tumores malignos. Enquanto, outros autores relacionaram a presença de ulceração tumoral a respostas inflamatórias, através da identificação de níveis elevados de proteínas de inflamação, como a proteína C reativa e, também constataram que estas proteínas estavam aumentadas nos carcinomas mamários (PLANELLAS et al., 2009).

Somando aos achados clínicos e histopatológicos avaliados no presente estudo, marcadores tumorais previamente estudados em mulheres (ATM, p53 e VEGF) foram avaliados, visando compreender melhor os mecanismos envolvidos

no processo de carcinogênese do câncer de mama de cadelas e na tentativa de se obter novos modelos de marcadores prognósticos.

Na análise do *ATM* foi observada uma baixa regulação deste gene nas neoplasias (carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos) em relação à mama normal. Estes achados corroboram com estudos realizados em mulheres (ANGELE et al., 2000; ANGELE et al., 2003; YE et al, 2007; TOMMISKA et al., 2008; BHATTACHARYA et al., 2012; BUENO, 2012). No entanto, quando avaliados separadamente, os carcinomas mamários não metastáticos apresentaram diminuição da expressão do *ATM* em relação às amostras de mamas normais, enquanto entre os carcinomas mamários metastáticos e as mamas normais não houve diferença estatística.

Este achado difere dos resultados observados em estudos prévios em mulheres, uma vez que a baixa regulação do *ATM* foi relacionada com a diminuição do tempo livre de doença e da sobrevida global, portanto com tumores mais agressivos (YE et al, 2007). Os presentes achados podem ser decorrentes do pequeno número de amostras analisadas pertencentes ao grupo metastático (11 casos).

As lesões mamárias benignas apresentaram diminuição da expressão dos transcritos de *ATM* em relação as mamas normais; porém, quando comparadas com as amostras de carcinomas (metastáticos e não metastáticos) não foi constatada diferença em sua expressão, diferentemente do observado no estudo de Ye et al. (2007), em que a baixa expressão do *ATM* foi observada em ordem decrescente nas amostras neoplásicas, lesões mamárias benignas e tecido mamário normal. Estes resultados podem diferir nas cadelas pela demora no diagnóstico das lesões benignas, uma vez que a maioria das pacientes apresentava tempo de evolução superior a seis meses e, assim, com o processo evolutivo destas lesões, o *ATM* poderia estar sendo perdido nestes tecidos.

O *ATM* tem papel de fosforilar proteínas relacionadas a checagem de pontos de dano do DNA (*DNA damage proteins*), que permite a parada do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose (JIANG et al., 2009; BENSIMON; AEBERSOLD; SHILOH, 2011). A diminuição dos níveis de transcritos nos tumores benignos e

malignos pode estar relacionada ao acúmulo de outras mutações importantes no processo carcinogênico e metastático.

Em mulheres, já foram descritas mais de 400 mutações no *ATM* causadoras de doença, sendo que cerca de 70% delas resultaram em terminação prematura da tradução, sintetizando proteínas incompletas (REHWICK et al, 2006). Além disso, mutações neste gene também foram associadas ao desenvolvimento de câncer de mama em famílias (REHWICK et al, 2006; BOZHANOV et al., 2010). Entretanto, em tumores esporádicos esta relação é controversa (EINARSDOTTIR et al., 2006; PROKOPCOVA et al., 2007; DOMBERNOWSKY et al., 2008; BOGDANOVA et al., 2009).

Alguns autores acreditam ainda que esta baixa regulação do *ATM* poderia estar relacionada com a perda deste gene no cromossomo 11, a qual é frequentemente observada em células do tecido neoplásico mamário de mulheres, podendo explicar a diminuição de RNAm (KHANNA; CHENEVIX-TRENCH, 2004).

Outro mecanismo sugerido seria o silenciamento do gene *ATM* pela perda de um alelo identificada através de estudos de perda de heterozigose (Loss of Heterozygosity – LOH). A perda de um alelo foi anteriormente descrita em 40% de casos de tumor de mama em mulheres (RIO et al., 1998), porém o mecanismo de inativação do outro alelo é desconhecido (PROKOPCOVA et al., 2007).

Em relação à análise da expressão da proteína ATM, foi observada localização de imunomarcacão citoplasmática e/ou membranosa e, embora não há descrição na literatura de estudos sobre esta proteína na glândula mamária de cadelas, em mulheres esta marcação normalmente é nuclear (BUENO, 2012), mas, segundo THE HUMAN PROTEIN ATLAS, a imunomarcacão também pode ser citoplasmática e membranosa. Esta localização observada nas amostras de cadelas provavelmente ocorreu pela ligação do anticorpo à uma isoforma da proteína ATM presente no citoplasma e/ou na membrana plasmática celular.

Além disso, em mulheres, geralmente a marcação da ATM é considerada como positiva ou negativa, avaliada pela presença ou ausência de expressão (BUENO, 2012), enquanto neste estudo, foi encontrada marcação em todas as amostras avaliadas, entretanto, a extensão das células imarcadas diferiu entre os quatro grupos estudados. Assim, os resultados da expressão proteica do ATM

demonstraram que 100% das amostras de mamas normais, 46% das lesões benignas, 21% dos carcinomas mamários não metastáticos e 9% dos carcinomas mamários metastáticos apresentaram imunomarcção superior a 75%, evidenciando uma perda desta proteína com a agressividade da lesão na glândula mamária. Enquanto, 18% das lesões benignas, 21% dos carcinomas mamários não metastáticos e 46% dos carcinomas mamários metastáticos apresentaram marcação inferior a 50%. Esta diminuição da ATM foi altamente significativa entre os quatro grupos ($p=0,0009$).

Na avaliação da intensidade de imunomarcção da ATM verificou-se diferença entre o grupo 1 (intensidade moderada) e os outros três grupos, os quais apresentaram intensidade fraca. Esta intensidade fraca foi bastante predominante no grupo 4, representada por 82% dos casos, apresentando uma diferença altamente significativa entre o grupo 1 ($p=0,0061$). A diminuição de intensidade da imunomarcção nestes três grupos poderia ser justificada pela perda gradual da proteína ATM nestes grupos.

Em mulheres, a expressão da ATM também foi associada com o grau histológico do câncer de mama, estando à diminuição de sua expressão associada com graus II e III (TOMMISKA et al., 2008; BUENO, 2012). No presente estudo não foi observada diferença entre a expressão da proteína e o grau de malignidade do tumor, entretanto, o número de amostras analisadas foi pequeno.

Outras variáveis clínicas e histopatológicas foram analisadas em associação com a expressão gênica e proteica do ATM, entretanto, não foi observada relação estatística entre elas. O pequeno número de amostras de tecido neoplásico (30 casos) avaliado pode ter interferido nestes resultados. No entanto, Bueno (2012), utilizou 63 amostras de carcinomas mamários de mulheres para análise de expressão gênica e 926 para análise de expressão proteica do ATM e, mesmo assim, não observou associação estatística da expressão proteica do ATM com o tamanho tumoral, *status* nodal e idade das pacientes de seu estudo, fatores sabidamente incriminados no estabelecimento do prognóstico da doença.

Os mecanismos celulares envolvidos na baixa expressão gênica e proteica do ATM nos tumores mamários de mulheres ainda permanecem desconhecidos (KHANNA; CHENEVIX-TRENCH, 2004; YE et al., 2007; BUENO, 2012).

No presente estudo não foi observado uma correlação entre a análise de expressão gênica e proteica do ATM e, embora, na análise de expressão gênica tenha sido observada uma baixa regulação de transcritos de *ATM* entre os tecidos neoplásicos e as mamas normais ($p=0,0537$), na análise de expressão proteica, esta redução foi altamente significativa ($p=0,0009$).

Desse modo, a diminuição proteica da ATM poderia ser decorrente de um mecanismo de regulação pós transcricional, como pelos microRNAs, mecanismo também sugerido por alguns autores em análises de carcinomas mamários de mulheres (DI LEVA; CROCE, 2010). Os microRNAs podem estar localizados em regiões intergênicas ou em regiões intrônicas de genes conhecidos e, de acordo com sua localização podem ser classificados em microRNAs exônicos presentes em transcritos não codificados, microRNAs intrônicos em transcritos não codificadores e microRNAs intrônicos localizados em transcritos codificadores de proteínas (IORIO et al., 2005).

Outra hipótese seria a de que a baixa expressão proteica do ATM estivesse relacionada com a metilação bidirecional da região promotora do *ATM*, segundo sugerido por Vo et al. (2004) e Bhattacharya et al. (2012) e com a deleção (BHATTACHARYA et al., 2012). No entanto, outros estudos mostraram não ocorrer associação entre a metilação do *ATM* e o câncer de mama em mulheres (BRANDES et al., 2007; TREILLEUX et al., 2007; PAL et al., 2010).

No presente estudo não foi observada correlação entre a baixa expressão proteica do ATM com o tempo de sobrevida global das pacientes, como observado no trabalho de Bueno (2012). Entretanto, a baixa expressão desta proteína nos tecidos neoplásicos metastáticos sugere um envolvimento deste marcador com o estabelecimento do prognóstico da doença, assim como em mulheres. Além disso, todas as pacientes que faleceram no decorrer deste estudo, apresentaram baixa expressão do ATM.

Como a avaliação da expressão gênica não é uma ferramenta prática no diagnóstico da rotina clínica, a avaliação por painéis de imuno-histoquímica acaba sendo uma boa opção prática da rotina clínica (GAMA et al., 2008), assim, seria interessante acrescentar a proteína ATM nos painéis realizados em cadelas,

podendo ser um indicativo a mais no estabelecimento do prognóstico desta doença nesta espécie.

Este estudo avaliou também o comportamento do gene *TP53* na glândula mamária de cadelas e não encontrou correlação deste gene com o *ATM* nas amostras analisadas, como citado em outros trabalhos (LAVIN, 1999; LOEHLBERG et al., 2007), também não foi verificada correlação entre suas proteínas (p53 e ATM). Mutações no gene *TP53* em mulheres apesar de serem raras (LALLO; EVANS, 2012) estão associadas com um alto risco de desenvolvimento do câncer de mama e com tumores mais agressivos, de pior prognóstico (OZBUN; BUTEL, 1995; NICHOLS et al., 2001; LEE et al., 2004; BOZHANOV et al. 2010). Enquanto, estudos em cadelas observaram a presença de mutação do *TP53* em 17% de 69 carcinomas mamários, também estando associada com aumento do risco de recidiva e óbito pela neoplasia (SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013).

No presente estudo não foi observada diferença estatística da expressão do *TP53* entre as mamas normais e os tecidos mamários neoplásicos (carcinomas metastáticos e não metastáticos). Porém, quando avaliados separadamente verificou-se um aumento da expressão do grupo 3 em relação ao grupo 1 ($p=0,0276$), enquanto, entre o grupo 4 e o grupo 1, não houve diferença estatística. Na análise de expressão proteica, por sua vez, constatou-se uma diminuição da p53 em relação aos carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos e as mamas normais, $p=0,0143$ e $p=0,0417$, respectivamente.

Estudos relacionados ao *TP53* são bastante divergentes, pois enquanto alguns autores consideram a superexpressão da p53 associada com um prognóstico ruim (GAMBLIN et al., 1997; MARTINEZ-DELGADO et al., 1997; EISENBERG & KOIFMAN, 2001; LEE et al., 2004; BERTAGNOLLI et al., 2009; TERRA 2010), outros estudos sugerem que a perda do *TP53* esteja relacionada com tumores de pior prognóstico e com baixa sobrevida das pacientes (JIANG et al., 2009).

Em mulheres, normalmente o aumento da proteína p53 está associado com a agressividade dos tumores (EISENBERG; KOIFMAN, 2001), enquanto a positividade da marcação da p53 em tumores benignos está relacionada com o

aumento do risco de desenvolvimento do câncer de mama no futuro (ROHAN et al., 1998).

Esta diminuição da p53 observada neste estudo poderia ser decorrente de um outro mecanismo envolvido no processo de carcinogênese do *TP53*, como uma regulação pós-transcricional, como sugerido ocorrer com o *ATM*. Assim, o gene *TP53* poderia atuar no processo carcinogênico do tumor de mama através de outros mecanismos e, não apenas pela mutação gênica.

Uma outra hipótese seria do gene *TP53* ser um gene de alta prevalência familiar, assim como em mulheres, nas quais mutações neste gene estão presentes em cerca de 15 a 40% dos tumores esporádicos e na linhagem germinativa de pacientes com Síndrome de Li-Fraumeni, uma síndrome hereditária associada ao câncer de mama (EISENBERG; KOIFMAN, 2001; LALLO; EVANS, 2012) e, neste estudo, foram utilizados casos esporádicos de câncer de mama em cadelas, sem conhecimento prévio de parentesco familiar.

O p53 é um marcador difícil de ser compreendido conforme observado em outros estudos, inclusive em mulheres, por apresentar resultados conflitantes (EISENBERG; KOIFMAN, 2001).

Outro marcador analisado neste estudo foi o *VEGF*, o qual é considerado como um marcador fundamental para o crescimento tumoral e desenvolvimento de metástases (ADAMS et al., 2000), sendo induzido pelo *HIF-1* (ADAMS et al., 2000; SAPONARO et al., 2013). A baixa regulação do *ATM* já foi incriminada no aumento de expressão do *HIF-1* (OUSSET et al., 2010). Entretanto, neste estudo não foi observada correlação entre a expressão gênica e proteica do *VEGF* com o *ATM*, como indiretamente era suposto de ser encontrada e, nem com o p53, mostrando a complexidade dos mecanismos envolvidos no processo de carcinogênese do câncer de mama nas cadelas.

Altos níveis de RNAm do *VEGF* têm sido associados com carcinomas mamários invasivos de mulheres (ADAMS et al., 2000) quando comparado com amostras de mamas normais ou de tumores benignos (LEE et al., 1998), entretanto, no presente estudo não foi verificada diferença estatística entre os níveis de transcritos com os quatro grupos analisados, nem entre as mamas normais e os tecidos neoplásicos. Enquanto na análise de expressão proteica,

observou-se um aumento da expressão de sua proteína entre as lesões mamárias benignas, os carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos e as mamas normais. A marcação observada em todas as células foi citoplasmática como citado em outros trabalhos (QUEIROGA et al., 2011; FELICIANO; VICENTE; SILVA, 2012). Além disso, todos os tumores avaliados no presente estudo apresentaram imunomarcação do VEGF, variando na extensão das células marcadas, conforme observado por Restucci et al. (2002) e Stragliotto et al. (2013).

Assim, 64% das amostras do grupo 4, 53% do grupo 3, 46% do grupo 2 e 25% do grupo 1 apresentaram imunomarcação citoplasmática superior a 75%, ou ainda 82% do grupo 4, 74% do grupo 3 e 73% do grupo 2 apresentaram imunomarcação superior a 50%, enquanto apenas 25% das amostras de mamas normais manifestaram esta percentagem de células marcadas.

Em relação a intensidade da marcação, as amostras pertencentes ao grupo 1 apresentaram intensidade fraca e as amostras dos outros três grupos manifestaram, predominantemente, intensidade moderada, embora estatisticamente não houve diferença entre os quatro grupos avaliados. Queiroga et al. (2011) verificaram em seu trabalho uma marcação moderada a forte nas amostras de tecidos neoplásicos.

Os resultados verificados pela análise de expressão proteica corroboraram com outros estudos (SANTOS et al., 2010; FELICIANO; VICENTE; SILVA, 2012), uma vez que tanto os tumores benignos quanto os malignos apresentaram aumento da expressão desta proteína, enquanto Queiroga et al. (2011) e Restucci et al. (2012) identificaram um aumento da expressão do VEGF maior nos tecidos mamários neoplásicos do que nos tumores benignos.

Esta alta expressão nas amostras pertencentes ao grupo 2 poderia ser decorrente à mudanças na homeostase deste tecido, devido a um processo fisiológico ou patológico, podendo resultar na expressão de fatores estimulantes da angiogênese (HANAHAM; FOLKMAN, 1996), como por exemplo a evolução destes tumores para um processo carcinogênico, exemplificando um processo patológico.

Entretanto, fatores fisiológicos também poderiam estar estimulando a expressão do VEGF, tanto nas lesões benignas, quanto nos casos das mamas normais que expressaram esta proteína. Alguns autores identificaram aumento da

expressão do VEGF em mamas normais, sugerindo a participação hormonal neste processo (SANTOS et al., 2010), acredita-se ainda que este aumento esteja relacionado com determinadas fases do ciclo estral (SANTOS et al., 2010). Segundo Al-Dissi et al. (2010), a expressão do VEGF é considerada importante para o crescimento da glândula mamária durante a gestação e a lactação. Além disso, em humanos, foi sugerido uma regulação de esteroides sexuais pelo VEGF (HYDER, 2006). Como as amostras de mamas normais foram obtidas durante a eutanásia de cadelas no CCZ do Município de Araçatuba, não foi possível determinar o histórico reprodutivo destas cadelas enquanto 50% das cadelas com tumores benignos eram intactas.

A expressão gênica e proteica do VEGF também foram associadas com características clínicas e histopatológicas das pacientes, e praticamente não foi observada correlação estatística entre elas, sendo observado apenas aumento da expressão proteica do VEGF associado aos carcinomas simples quando comparados com o carcinoma complexo ($p=0,0372$). Santos et al. (2010) também não encontraram correlação da VEGF com os parâmetros clínicos nas 64 amostras de tecidos neoplásicos avaliados. Entretanto, Al-Dissi et al. (2010) observaram uma moderada correlação do VEGF com o grau histológico das neoplasias mamárias de cadelas. Resultados contraditórios também foram observados em estudo com mulheres, sendo que alguns autores encontraram correlação da VEGF com determinados parâmetros clínico-histopatológicos, enquanto outros não observaram esta correlação (AL-HARRIS et al., 2008; MYLONA et al., 2007).

Estudos em tumores mamários de cadelas sugeriram uma associação do aumento de expressão do VEGF com um prognóstico ruim, pela associação deste aumento com o desenvolvimento de metástases e baixo tempo de sobrevida (RESTUCCI et al., 2002; AL-DISSI et al., 2007; DICKINSON et al., 2008; QIU et al., 2008), assim como em mulheres (TOI et al., 1996; JIN et al., 2005; BURSTEIN et al., 2008). Entretanto, o presente trabalho não conseguiu demonstrar uma correlação da expressão proteica do VEGF com a sobrevida das pacientes, no entanto, todas as pacientes que vieram à óbito no decorrer deste estudo apresentaram alta expressão desta proteína (extensão da marcação celular superior à 75%). Santos et al. (2010) também não observaram esta correlação em

seu estudo. Todavia, este resultado pode ter sido interferido pelo número de amostra analisado e pelo tempo de seguimento clínico das pacientes.

7 CONCLUSÃO

O marcador ATM apresentou comportamento semelhante ao observado na mama de mulheres, ou seja, diminuição da expressão gênica e proteica dos tecidos neoplásicos em relação as mamas normais, sendo este o primeiro estudo avaliando o comportamento deste marcador em neoplasias mamárias de cadelas. Assim, acredita-se que o mecanismo deste marcador envolvido no processo de tumorigênese do câncer de mama em cadelas seja semelhante ao mecanismo que ocorre nas mulheres.

Enquanto o p53, apesar de ser considerado um importante fator prognóstico avaliado tanto em estudos em mulheres quanto em cadelas, sua expressão gênica e proteica demonstraram resultados bastante contraditórios, sugerindo inclusive que outros mecanismos pudessem estar envolvidos no processo de carcinogênese do tumor de mama em cadelas além da mutação gênica.

A proteína VEGF esteve aumentada nos tecidos neoplásicos e inclusive nos casos que apresentaram piores prognósticos e, assim como o ATM, também pode ser considerada um marcador auxiliar no estabelecimento do prognóstico desta enfermidade.

O método de imuno-histoquímica para estes marcadores avaliados mostrou ser um exame prático, uma vez que permitiu o fornecimento de informações complementares ao estadiamento clínico e as variáveis clínico-histopatológicas.

8 REFERÊNCIAS

ADAMS, J.; CARDER, P. J.; DOWNEY, S. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen. **Cancer Research**, Chicago, v. 60, p. 2898–2905, 2000.

AL-DISSI, A. N.; HAINES, D. M.; SINGH, B.; KIDNEY, B. A. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor receptor associated with tumor cell proliferation in canine cutaneous squamous cell carcinomas and trichoepitheliomas. **Veterinary Pathology**, New York, v. 44, p. 823–830. 2007.

AL-HARRIS, E. S.; AL-JANABI, A. A.; AL-TORIAHI, K. M.; YASSEEN, A. A. Overexpression of vascular endothelial growth factor in correlation to Ki-67, grade, and stage of breast cancer. **Saudi Medical Journal**, Saudi Arabia, v. 29, p. 1099–1104. 2008.

ALMEIDA, J. R. C.; PEDROSA, N. L.; LEITE, J. B.; FLEMING, T. R. P.; CARVALHO, V. H.; CARDOSO, A. A. A. Marcadores tumorais: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 3, p. 305-316, 2007.

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

ANGÈLE, S.; TREILLEUX, I.; TANIÈRE, P.; MARTEL-PLANCHE, G.; VUILLAUME, M.; BAILLY, C.; BRÈMOND, A.; MONTESANO, R.; HALL, J. Abnormal expression of the ATM and TP53 genes in sporadic breast carcinomas. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 6, p. 3536–3544. 2000.

ANGÈLE S, TREILLEUX I, BRÈMOND A, TANIÈRE P, HALL J. Altered expression of DNA double-strand break detection and repair proteins in breast carcinomas. **Histopathology**, Oxford, v. 43, p. 347–353. 2003.

BEAUVAIS, W.; CARDWELL, J. M.; BRODBELT, D. C. The effect of neutering on the risk of mammary tumours in dogs – a systematic review. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 53, p. 314–322. 2012.

BECKMANN, M. W.; NIEDERACHER, D.; SCHNÜRCH, H.G.; GUSTERSON, B. A.; BENDER, H. G. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. **Journal of molecular medicine**, Amsterdam, v. 75, p. 429–439. 1997.

BENJAMIN S. A.; LEE A. C.; SAUDERS W.J. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. **Veterinary Pathology**, New York, v. 36, p. 423-436, 1999.

BENSIMON, A.; AEBERSOLD, R.; SHILOH, Y. Beyond ATM: the protein kinase landscape of the DNA damage response. **FEBS Letters**, Amsterdam; v. 585, p. 1625-1639. 2011.

BOZHANOV, S. S.; ANGELOVA, S. G.; KRASTEVA, M. E.; MARKOV, T. L.; CHRISTOVA, S. L.; GAVRILOV, I. G.; GEORGIEVA, E. I. Alterations in *p53*, *BRCA1*, *ATM*, *PIK3CA*, and *HER2* genes and their effect in modifying clinicopathological characteristics and overall survival of Bulgarian patients with breast cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Berlin, v. 136, p. 1657–1669. 2010.

BHATTACHARYA, N.; MUKHERJEE, N.; SINGH, R. K.; SINHA, S.; ALAM, N.; ROY, A.; OYCHOUDHURY, S.; PANDA, C. K. Frequent alterations of MCPH1 and ATM are associated with primary breast carcinoma: clinical and prognostic implications. **Annals Of Surgical Oncology**, New York, 2012.

BHATTI, S.; KOZLOV, S.; FAROOQI, A. A.; NAGI, A.; LAVIN, M.; KHANNA, K. K. ATM protein kinase: the linchpin of cellular defenses to stress. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Boston, v. 68, p. 2977-3006. 2011.

BOGDANOVA, N.; CYBULSKI, C.; BERMISHEVA, M.; DATSYUK, I.; YAMINI, P.; HILLEMANN, P.; ANTONENKOVA, N. N.; KHUSNUTDINOVA, E.; LUBINSKI, J.; DÖRK, T. A nonsense mutation (E1978X) in the ATM gene is associated with breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, The Hague, v. 118, n. 1, p. 207-211. 2009.

BOGGS, R. M.; WRIGHT, Z. M.; STICKNEY, M. J.; PORTER, W. W.; MURPHY, K. E. MicroRNA expression in canine mammary cancer. **Mammalian Genome**, New York, v. 19, p. 561–569. 2008.

BORGE, K. S.; BØRRESEN-DALE, A. L.; LINGAAS, F. Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumour. **Veterinary and Comparative Oncology**, Oxford, v. 9, n.4, p. 241-250. 2011.

BRANDES, J. C.; CARRAWAY, H.; HERMAN, J. G. Optimal primer design using the novel primer design program: MSP primer provides accurate methylation analysis of the ATM promoter. **Oncogene**, Basingstoke, v. 26, n. 42, p. 6229-6237. 2007.

BRINKHOF, B.; SPEE, B.; ROTHUIZEN, J.; PENNING, L. C. Development and evaluation of canine reference genes for accurate quantification of gene expression. **Analytical Biochemistry**, New York, v. x; 2006.

BUENO, R.C. **Valor prognóstico e preditivo de genes candidatos selecionados após análise de *oligoarray* em carcinomas mamários**. 2012, 111f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2012.

BURSTEIN, H. J.; CHEN, Y. H.; PARKER, L. M.; SAVOIE, J.; YOUNGER, J.; KUTER, I.; RYAN, P. D.; GARBER, J. E.; CHEN, H.; CAMPOS, S. M.; SHULMAN, L. N.; HARRIS, L. N.; GELMAN, R.; WINER, E. P. VEGF as a marker for outcome among advanced breast cancer patients receiving anti-VEGF therapy with bevacizumab and vinorelbine chemotherapy. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 14, p. 7871–7877, 2008.

CALVEZ-KELM, F.; OLIVER, J.; DAMIOLA, F.; FOREY, N.; ROBINOT, N.; DURAND, G.; VOEGELE, C.; VALLÉE, M. P.; BYRNES, G. BREAST CANCER FAMILY REGISTRY, HOPPER, J. L.; SOUTHEY, M. C.; ANDRULIS, I. L.; JOHN, E. M.; TAVTIGIAN, S. V.; LESUEUR, F. RAD51 and breast cancer susceptibility: no evidence for rare variant association in the breast cancer family registry study. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, e52374. 2012.

CAPELOZZI, V. L. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. **Jornal de Pneumologia**, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 321-328, 2001.

CASSALI et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, Botucatu, v. 4, n. 2, p. 153-180. 2011.

COMEN, E. A.; NORTON, L.; MASSAGUE, J. Breast cancer tumor size, nodal status, and prognosis: biology trumps anatomy. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 29, n. 19, 2610-2612. 2011.

CUATRECASAS, M.; SANTAMARIA, G.; VELASCO, M.; CAMACHO, E.; HERNANDEZ, L.; SANCHEZ, M.; ORRIT, C.; MURCIA, C.; CARDESA, A.; CAMPO, E.; FERNANDEZ, P. L. ATM gene expression is associated with differentiation and angiogenesis in infiltrating breast carcinomas. **Histology and Histopathology**, Murcia, v. 21, p. 149–156, 2006.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; ROCHA, N. S.; FERNANDES, S. C. Neoplasias mamárias. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2009. cap. 25, p. 371-383.

DICKINSON, P. J.; STURGES, B. K.; HIGGINS, R. J.; ROBERTS, B. N.; LEUTENEGGER, C. M.; BOLLEN, A. W.; LECOUTEUR, R. A. Vascular endothelial growth factor mRNA expression and peritumoral edema in canine primary central nervous system tumors. **Veterinary Pathology**, New York, v. 45, p. 131–139. 2008.

DI LEVA, G.; CROCE, C. M. Roles of small RNAs in tumor formation. **Trends in Molecular Medicine**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 257-267. 2010.

DOMBERNOWSKY, S. L.; WEISCHER, M.; ALLIN, K. H.; BOJESEN, S. E. TYBJÆRG-HANSEN, A.; NORDESTGAARD, B. G. Risk of cancer by ATM missense mutations in the general population. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 26, n. 18, p. 3057-3062, 2008.

DUFFY, M. J. Predictive markers in breast and other cancers: a review. **Clinical Chemistry**, Washington, v.51, n. 3, p. 494-503. 2005.

EINARSDOTTIR, K.; ROSENBERG, L. U.; HUMPHREYS, K.; BONNARD, C.; PALMGREN, J.; LI, Y.; LI, Y.; CHIA, K. S.; LIU, E. T.; HALL, P.; WEDRÉN, S. Comprehensive analysis of the ATM, CHEK2 and ERBB2 genes in relation to breast tumour characteristics and survival: a population-based case-control and follow-up study. **Breast Cancer Research**, London, v. 8, n. 6, p.R67. 2006.

EISENBERG, A. L. A.; KOIFMAN, S. Câncer de mama: marcadores tumorais (revisão de literatura). **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 4, p. 377-388, 2001.

ESPINOSA, E.; GAMEZ-POZO, A.; SANCHEZ-NAVARRO, I.; PINTO, A.; CASTANEDA, C. A.; CIRUELOS, E.; FELIU, J.; VARA, J. A. F. The present and future of gene profiling in breast cancer. **Cancer Metastasis Reviews**, Boston, v. 31, p. 41-46, 2012.

FELICIANO, M. A. R.; VICENTE, W. R. R.; SILVA, M. A. M. Conventional and doppler ultrasound for the differentiation of benign and malignant canine mammary tumours. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 53, p. 332–337. 2012.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 25, p. 581-611. 2004.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, New York, v. 9, n. 6, p. 669-673, 2003.

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

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

GATEI, M.; SCOTT, S. P.; FILIPPOVITCH, I. et al. Role for ATM in DNA damage-induced phosphorylation of BRCA11. **Cancer Research**, Chicago, v. 60, p. 3299–3304, 2000.

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

HAMPE, J. F.; MISDORP, W. Tumours and dysplasias of the mammary gland, In: IBID. (Eds), Bulletin of World Health Organization. International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals.WHO, Geneva, Switzerland. p.111-133. 1974.

HANAHAM, D.; FOLKMAN, J. Pathways and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell Press**, Amsterdam, v. 86, n. 3, p. 353-364. 1996.

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

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

HOLLIER, B. G.; EVANS, K.; MANI, S. A. The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, New York, v. 14, p. 29-43. 2009.

HYDER, S. M. Sex-steroid regulation of vascular endothelial growth factor in breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, Woodlands, v. 13, p. 667-687. 2006.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). Tipos de câncer: Mama. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2011. Acesso em 15 de novembro de 2012. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>

IM, K. S.; KIM, I. H.; KIM, N. H.; LIM, H. Y.; KIM, J. H.; SUR, J. H. Breed-related differences in altered BRCA1 expression, phenotype and subtype in malignant canine mammary tumors. **Veterinary Journal**, London, 2012.

IORIO, M. V.; FERRACIN, M.; LIU, C. G.; VERONESE, A.; SPIZZO, R.; SABBIONI, S.; et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. **Cancer Research**, Chicago, v. 65, n. 16, p. 7065-7070. 2005.

JIANG, H.; REINHARDT, H. C.; BARTKOVA, J.; TOMMISKA, J.; BLOMQUIST, C.; NEVANLINNA, H.; BARTEK, J.; YAFFE, M. B.; HEMANN, M. T. The combined status of ATM and p53 link tumor development with therapeutic response. **Genes & Development**, New York, v. 23, p.1895–1909, 2009.

JIN, Q.; HEMMINKI, K.; ENQUIST, K.; LENNER, P.; GRZYBOWSKA, E.; KLAES, R.; HENRIKSSON, R.; CHEN, B.; PAMULA, J.; PEKALA, W.; ZIENTEK, H.; ROGOZINSKA-SZCZEPKA, J.; UTRACKA-HUTKA, B.; HALLMANS, G.; FÖRSTI, A. Vascular endothelial growth factor polymorphisms in relation to breast cancer

development and prognosis. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 11, p. 3647–3653. 2005.

KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T. C.; DESSIRIS, A. Histological grading and prognosis in dog with mammary carcinomas: application of a human grading method. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 133, p. 246-252, 2005

KHANNA, K. K.; CHENEVIX-TRENCH, G. ATM and genome maintenance: defining its role in breast cancer susceptibility. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, New York, v. 9, n. 3, p. 247-62, 2004.

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

KINOSHITA, J.; KITAMURA, K.; KABASHIMA, A.; SAEKI, H.; TANAKA, S.; SUGIMACHI, K. Clinical significance of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, Boston, v. 66, n.2, p.159–164, 2001.

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

LACROIX, M.; TOILLON, R. A.; LECLERCQ, G. P53 and breast cancer, an update. **Endocrine-Related Cancer**, Bristol, v. 13, n. 2, p. 293-325, 2006.

LALLOO, F.; EVANS, D. G. Familial breast cancer. **Clinical Genetics**, Copenhagen, v. 82, p. 105–114. 2012.

LAVIN, M. F.; KHANNA, K. K. ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia-telangiectasia. **International Journal of Radiation Biology**, London, v. 75, p. 1201–1214, 1999.

LAVIN, M.F. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signaling and cancer. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 9, p. 759-769. 2008.

LEE, A. H. S.; DUBLIN, E. A.; BOBROW, L. G.; POULSOM, R. Invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast show distinct patterns of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. **Journal of Pathology**, London, v. 185, p. 394–401, 1998.

LEE, C. H.; KIM, W. H.; LIM, J. H.; KANG, M. S.; KIM, D. Y.; KWEON, O. K. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. **Journal of Veterinary Science**, Suwon, v. 5, p. 63–69. 2004.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, San Diego, v. 25, p. 402–408. 2001.

LOEHBERG, C. R.; THOMPSON, T.; KASTAN, M. B.; MACLEAN, K. H.; EDWARDS, D. G.; KITTRELL, F. S.; MEDINA, D.; CONNEELY, O. M.; O'MALLEY, B. W. Ataxia telangiectasia-mutated and p53 are potential mediators of Chloroquine-induced resistance to mammary carcinogenesis. **Cancer Research**, Chicago, v. 67, n. 24, p. 12026-12033, 2007.

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

MATOS, A. J.; LOPES, C. C.; FAUSTINO, A. M.; CARVALHEIRA, J. G.; DOS SANTOS, M. S.; RUTTEMAN, G. R.; GARTNER, F. MIB-1 labelling indices according to clinico-pathological variables in canine mammary tumours: a multivariate study. **Anticancer Research**, Athens, v. 26, p. 1821–1826. 2006.

MARTINEZ-DELGADO, B.; ROBLEDO, M.; ARRANZ E.; INFANTES, F.; ECHEZARRETA, G.; MARCOS, B.; SANZ, C.; RIVAS, C.; BENITEZ, J. Correlation between mutations in p53 gene and protein expression in human lymphomas. **American Journal of Hematology**, New York, v. 55, p. 1-8, 1997.

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

MORRIS, J. S.; NIXON, C.; KING, O. J. A.; MORGAN, I. M.; PHILBEY, A. W. Expression of TopBP1 in canine mammary neoplasia in relation to histological type, Ki67, ER α and p53. **Veterinary Journal**. London, v. 179, p. 422-429. 2009.

MOULTON, J. E. Tumors of the mammary gland. In: **Tumors in Domestic Animals**. 3. ed. California: Berkeley University of California Press, 1990, p.518-552.

MYLONA, E.; ALEXANDROU, P.; GIANNOPOULOU, I.; LIAPIS, G.; SOFIA, M.; KERAMOPOULOS, A.; NAKOPOULOU, L. The prognostic value of vascular endothelial growth factors (VEGFs)-A and -B and their receptor, VEGFR-1, in invasive breast carcinoma. **Gynecologic Oncology**, New York, v. 104, p. 557-563. 2007.

NICHOLS, K. E.; MALKIN, D.; GARBER, J. E.; FRAUMENI, J. F. JR.; LI, F. P. Germ-line p53, mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v. 10, p. 83-87. 2001.

NOWAK, M.; MADEJ, J. A.; PODHORSKA-OKOLOW, M.; DZIEGIEL, P. Expression of extracellular matrix metalloproteinase (MMP-9), e-cadherin and proliferation-associated antigen Ki-67 and their reciprocal correlation in canine mammary adenocarcinomas. **In Vivo**, Brooklyn, v. 22, p. 463-470. 2008.

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

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

OUSSET, M.; BOUQUET, F.; FALLONE, F.; BIARD, D.; DRAY, C.; VALET, P.; SALLES, B.; MULLER, C. Loss of ATM positively regulates the expression of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) through oxidative stress: Role in the physiopathology of the disease. **Cell Cycle**, Georgetown, v. 9, n. 14, 2010.

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

OZBUN, M. A.; BUTEL, J. S. Tumor supressor p53 mutations and breast cancer: a critical analysis. **Advances in Cancer Research**, New York, v. 66, p. 71-141. 1995.

PAL, R.; SRIVASTAVA, N.; CHOPRA, R.; GOCHHAIT, S.; GUPTA, P.; PRAKASH, N.; AGARWAL, G.; BAMEZAI, R. N. Investigation of DNA damage response and apoptotic gene methylation pattern in sporadic breast tumors using high throughput quantitative DNA methylation analysis technology. **Molecular Cancer**, London, v. 9, p. 303. 2010.

PAVLAKIS, K.; MESSINI, I.; VREKOUSSIS, T.; YIANNOU, P.; KERAMOPOULLOS, D.; LOUVROU, N.; LIAKAKOS, T.; STATHOPOULOS, E. N. The assessment of angiogenesis and fibroblastic stromagenesis in hyperplastic and pre-invasive breast lesions. **BMC Cancer**, London, v. 8, p. 88. 2008.

PEÑA, L.; DE ANDRÉS, P. J.; CLEMENTE, M.; CUESTA, P.; PÉREZ-ALENZA, M. D. Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. **Veterinary Pathology**, New York, v. 50, n. 1, p. 94-105. 2013.

PHILIBERT, J. C.; SNYDER, P. W.; GLICKMAN, N.; GLICKMAN, L. T.; KNAPP, D. W.; WATERS, D. J. Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 1, p. 102-106, 2003.

PLANELLAS, M.; BASSOLS, A.; SIRACUSA, C.; SACO, Y.; GIMÉNEZ, M.; PATO, R.; PASTOR, J. Evaluation of serum haptoglobin and C-reactive protein in dogs with mammary tumors. **Veterinary Clinical Pathology**, Columbia, v. 38, n. 3, p. 348–352. 2009.

PROKOPCOVA, J.; KLEIBL, Z.; BANWELL, C. M.; POHLREICH, P. The role of ATM in breast cancer development. **Breast Cancer Research and Treatment**, Boston, v. 104, p. 121-128. 2007.

QUEIROGA, F.; PIRES, I.; PARENTE, M.; GREGÓRIO, H.; LOPES, C. S. COX-2 over-expression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer. **Veterinary Journal**, London, v. 189, p. 77-82. 2011.

QUEIROGA, F. L.; RAPOSO, T.; CARVALHO, M. I.; PRADA, J.; PIRES, I. Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: Most recent findings. **In Vivo**, Brooklyn, v. 25, n. 3, p. 455-65. 2011.

QIU, C. W.; LIN, D. G.; WANG, J. Q.; LI, C. Y.; DENG, G. Z. Expression and significance of PTEN and VEGF in canine mammary gland tumours. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 32, p. 463–472. 2008.

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

RAKHA, E. A.; EL-SAYED, M. E.; REIS-FILHO, J.; ELLIS, I. O. Pathobiological aspects of basal-like breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, Dordrecht, v. 113, p. 411-422. 2009.

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

RENWICK, A.; THOMPSON, D.; SEAL, S.; KELLY, P.; CHAGTAI, T.; AHMED, M.; NORTH, B.; JAYATILAKE, H.; BARFOOT, R.; SPANOVA, K.; MCGUFFOG, L.; EVANS, D. G.; ECCLES, D. BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY COLLABORATION (UK); EASTON, D. F.; STRATTON, M. R.; RAHMAN, N. ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. **Nature Genetics**, New York, v. 38, n. 8, p. 873-875. 2006.

RESTUCCI, B.; PAPPARELLA, S.; MAIOLINO, P.; DE VICO, G. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, New York, v. 39, n. 4, p. 488-493. 2002.

RIO, P. G.; PERNIN, D.; BAY, J. O.; ALBUISSON, E.; KWIATKOWSKI, F.; DE LATOUR, M.; BERNARD-GALLON, D. J.; BIGNON, Y. J. Loss of heterozygosity of BRCA1, BRCA2 and ATM genes in sporadic invasive ductal breast carcinoma. **International Journal of Oncology**, Athens, v. 13, n. 4, p. 849-853. 1998.

RIPPERGER, T.; GADZICKI, D.; MEINDL, A.; SCHLEGELBERGER, B. Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counseling. **European Journal of Human Genetics**, Basel, v. 17, p. 722–731, 2009.

ROHAN, T. E.; HARTWICK, W.; MILLER, A. B.; KANDEL, R. A. Immunohistochemical detection of c-erbB-2 and p53 in benign disease and breast cancer risk. **Journal of the National Cancer Institute**, Washington, v. 90, n. 17, p. 1998.

SANTOS, A. A. F.; OLIVEIRA, J. T.; LOPES, C. C. C.; AMORIM, I. F.; VICENTE, C. M. F. B.; GAËRTNER, F. R. M.; MATOS, A. J. F. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumours. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 143, p. 268-275. 2010.

SAPONARO, C.; MALFETTONE, A.; RANIERI, G.; DANZA, K.; SIMONE, G.; PARADISO, A.; MANGIA, A. VEGF, HIF-1 α expression and MVD as an angiogenic network in familial breast cancer. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 1, p. e53070. 2013.

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, p. 1249-1261, 1969.

SCHOEFFNER, D. J.; MATHENY, S. L.; AKAHANE, T.; BERRY, A.; MERLINO, G. VEGF contributes to mammary tumor growth in transgenic mice through paracrine and autocrine mechanisms. **Laboratory Investigation**, Baltimore, v. 85, n. 5, p. 608-623. 2005.

SONG, L.; LIN, C.; WU, Z.; GONG, H.; ZENG, Y.; WU, J.; LI, M.; LI, J. miR-18a impairs DNA damage response through downregulation of ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, p. e25454. 2011.

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

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 tumors; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. **Veterinary and Comparative Oncology**, Oxford, v. 7, 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**, New York, v. 48, n. 1, p. 85-97. 2011.

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

STRAGLIOTTO, A.; SILVA, M. I. V.; CAMPOS, C. G.; GONÇALVES, G. B. D.; PIRES, M. A. M.; SOUZA, R. L.; COLODEL, E. M.; PESCADOR, C. A. Expressão do fator de crescimento endotelial vascular em tumores mamários de cadelas, **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, 1096. 2013.

TAVTIGIAN, S. V.; OEFNER, P. J.; BABIKYAN, D.; HARTMANN, A.; HEALEY, S.; CALVEZ-KELM, F. L.; LESUEUR, F.; BYRNES, G. B.; CHUANG, S. C.; FOREY, N.; FEUCHTINGER, C.; GIOIA, L.; HALL, J.; HASHIBE, M.; HERTE, B.; MCKAY-CHOPIN, S.; THOMAS, A.; VALLÉE, M. P.; VOEGELE, C.; WEBB, P. M.; WHITEMAN, D. C.; AUSTRALIAN CANCER STUDY, BREAST CANCER FAMILY REGISTRIES (BCFR); KATHLEEN CUNINGHAM FOUNDATION CONSORTIUM FOR RESEARCH INTO FAMILIAL ASPECTS OF BREAST CANCER (KCONFAB); SULEEPORN SANGRAJRANG; HOPPER, J. L.; SOUTHEY, M. C.; ANDRULIS, I. L.; JOHN, E. M.; CHENEVIX-TRENCH, G. Rare, evolutionarily unlikely missense substitutions in ATM confer increased risk of breast cancer. **The American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 85, p. 427–446, 2009.

TERAOKA, S. N.; TELATAR, M.; BECKER-CATANIA, S.; LIANG, T.; ONENGÜT, S.; TOLUN, A.; CHESSA, L.; SANAL, O.; BERNATOWSKA, E.; GATTI, R. A.; CONCANNON, P. Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene, ATM: underlying mutations and consequences. **American Journal of Humam Genetics**, Chicago, v. 64, p. 1617–1631, 1999.

TERRA, E. M. TGFB, p53, **E-caderina, e Vimentina como marcadores prognósticos em tumores espontâneos de mama de cadelas**. 2010. 63 f. Dissertação (Mestrado em clínica) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2010.

THE HUMAN PROTEIN ATLAS. Disponível em: <<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000149311/cancer/breast+cancer>>. Acesso em: 14 jan. 2013.

TOI, M.; KONDO, S.; SUZUKI, H.; YAMAMOTO, Y.; INADA, K.; IMAZAWA, T.; TANIGUCHI, T.; TOMINAGA, T. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in primary breast cancer. **Cancer**, New York, v. 77, n. 6, p. 1101-1106, 1996.

TOMMISKA, J.; BARTKOVA, J.; HEINONEN, M.; HAUTALA, L.; KILPIVAARA, O.; EEROLA, H.; AITTOMÄKI, K.; HOFSTETTER, B.; LUKAS, J.; VON SMITTEN, K.; BLOMQVIST, C.; RISTIMÄKI, A.; HEIKKILÄ, P.; BARTEK, J.; NEVANLINNA, H. The DNA damage signalling kinase ATM is aberrantly reduced or lost in BRCA1/BRCA2-deficient and ER/PR/ERBB2-triplex-negative breast cancer. **Oncogene**, Basingstoke, v. 27, p. 2501-2506. 2008.

TREILLEUX, I.; CHAPOT, B.; GODDARD, S.; PISANI, P.; ANGELE, S.; HALL, J. The molecular causes of low ATM protein expression in breast carcinoma; promoter methylation and levels of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase. **Histopathology**, Oxford, v. 51, n. 1, p. 63-69. 2007.

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

VO, Q. N.; KIM, W. J.; CVITANOVIC, L.; BOUDREAU, D. A.; GINZINGER, D. G.; BROWN, K. D. The ATM gene is a target for epigenetic silencing in locally advanced breast cancer. **Oncogene**, Basingstoke, v. 23, p. 9432-9437. 2004.

WO, J. Y.; CHEN, K.; NEVILLE, B. A.; LIN, N. U.; PUNGLIA, R. S. Effect of very small tumor size on cancer specific mortality in node-positive breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 29, n. 19, p. 2619-2627. 2011.

YE, C.; CAI, Q.; DAI, Q.; SHU, X. O.; SHIN, A.; GAO, Y. T.; ZHENG, W. Expression patterns of the ATM gene in mammary tissues and their associations with breast cancer survival. **Cancer**, New York, v. 109, n. 9, p. 1729-1735, 2007.

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

ZHANG, B.; BEEGHLY-FADIEL, A.; LONG, J.; ZHENG, W. Genetic variants associated with breast cancer risk: Comprehensive research synopsis, meta-

analysis, and epidemiological evidence. **The Lancet Oncology**, London, v. 12, n. 5, p. 477-488. 2011.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Localização das metástases caracterizadas no grupo 4.

Tabela 1A. Caracterização das pacientes pertencentes ao grupo 4 quanto ao tipo e grau histológico, localização da metástase, ocorrência de óbito e tempo de sobrevida global.

TIPO HISTOLÓGICO	GRAU HISTOLÓGICO	LOCALIZAÇÃO DA METÁSTASE	ÓBITO	SOBREVIDA GLOBAL
Ca tubular	II	Pulmão, fígado e baço	Não	10 meses
Ca tubular	I	Linfonodo inguinal	Não	15 meses
Ca tumor misto	I	Linfonodo inguinal e pulmão	Sim	9 meses
Ca anaplásico	II	Linfonodo inguinal e adrenal	Sim	1 dia
Ca tumor misto	I	Linfonodo inguinal	Não	9 meses
Ca tubular	I	Baço e fígado	Sim	11 meses
Ca micropapilar	III	Linfonodo inguinal e cutânea	Não	9 meses
Ca anaplásico	II	Linfonodo inguinal e pulmão	Sim	1 dia
Ca complexo	I	Linfonodo inguinal	Não	19 meses
Ca tubular com áreas sólidas	II	Pulmão	Sim	2 meses
Ca tubular	II	Linfonodo axilar	Não	16 meses

Ca= carcinoma