UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMPUS DE BOTUCATU

TGFβ, pSmad2, p53, p63, E-caderina e Vimentina como marcadores prognósticos em tumores espontâneos de mama de cadelas

Erika Maria Terra

Botucatu - SP

Julho/2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMPUS DE BOTUCATU

TGFβ, pSmad2, p53, p63, E-caderina e Vimentina como marcadores prognósticos em tumores espontâneos de mama de cadelas

Erika Maria Terra

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Paulista "Júlio de Mesquita Filho", campus de Botucatu, para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha

Botucatu - SP

Julho/2010

ERIKA MARIA TERRA

TGFβ, pSmad2, p53, p63, E-caderina e Vimentina como marcadores prognósticos em tumores espontâneos de mama de cadelas

Banca Examinadora:

_____
Noeme Sousa Rocha

_____
Renée Laufer Amorim

_____
Andrigo Barboza de Nardi

_____
Júlio Lopes Sequeira

_____
Mirela Tinucci Costa

Botucatu, 30 de julho de 2010

DEDICO

Aos meus pais que muito me apoiaram em todos estes anos de estudo
Sem vocês este trabalho não existiria

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre ao meu lado e por olhar por mim.

Aos meus pais, José Luiz e Fátima, que deram o melhor deles para que eu chegasse aqui hoje. Eu sei que vocês continuam me apoiando para que eu siga em frente. Amo vocês.

À minha irmã Jessika, pela amizade sincera. Mesmo à distância continuamos unidas.

À minha orientadora Dra. Noeme Sousa Rocha pela orientação, paciência e pela sua dedicação à Patologia Veterinária. Aprendi muito com a senhora.

Ao meu namorado Marcos (Bah), pelos anos de convivência, pela companhia, por ser meu porto seguro e por me fazer sentir tão bem ao seu lado. Por estar comigo desde o início desta jornada e por me fazer feliz. Te Amo.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro que me permitiram concluir este trabalho.

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

À FMVZ – Unesp Botucatu por esta oportunidade que me deram. Ao Serviço de Patologia e a todos os funcionários e residentes pela acolhida. Um abraço especial ao Maury Raul, pelo carinho e atenção dispensados a nós.

À minha co-orientadora Profa. Mirela Tinucci Costa, pelo apoio e pelos ensinamentos pessoais e oncológicos.

À todos “amigos oncológicos” do SOV que me receberam de braços abertos desde a época da graduação. Agradeço pelo apoio e por tudo que aprendi com vocês.

À Sabrina Calazans e ao Andrigo, vocês tiveram e sempre terão participação especial e muita influência na minha formação oncológica.

Aos amigos, Sabrina Costa, Thiago Munhoz e Letícia Abrahão... pelos ensinamentos, pela companhia, por compartilhar os momentos de alegria e por me apoiar nos momentos de tristeza. Obrigada por tudo.

À Geórgia por ser minha companheira no trabalho, me ensinar muito de patologia e acima de tudo por ser também amiga.

À Lìvia por me receber sempre de braços abertos em Botucatu desde o início do mestrado. As obrigações acadêmicas por aqui estão acabando, a nossa amizade não. Obrigada por tudo!

À Marcela, pela ajuda com imuno-histoquímica, com patologia, pela amizade, pelas conversas e pelas risadas... você tem grande participação neste trabalho.

Às grandes amigas que fiz aqui: Taís, Ticiana, Lívia, Lia, Marcela, Isabelle, Mariana. Botucatu não teria o mesmo sentido sem vocês. Sem dúvida levarei vocês comigo no meu coração.

Aos companheiros de orientação Márcia, Rodolfo, Isabelle, Fernanda e Paulo pela ajuda, pelas conversas divertidas e por dividirem comigo mais esta etapa da minha formação. Ao ex-amigo de pós-graduação e agora professor, Adriano Sakai pelo apoio “ornitopatológico”.

Aos amigos Nazarenos (Franco, Fábio, Thiago, Maurício, Marcelo e Sandrinha) pelos anos de amizade, pelos almoços divertidos e pela consideração de vocês. Vocês são meus irmãos.

Às irmãs da República Kabaré, as moradoras atuais e as de antes e sempre... Sem palavras para descrever estes anos todos... “Por onde for, quero ser seu par....”

Ao Snoopy e ao Rex, que me ensinaram a amar os animais ainda mais... um me levou à veterinária e outro à oncologia... Obrigada por tudo que me ensinaram...

À todos os animais que dividem conosco o privilégio de ter uma alma!

“Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante.”
(Albert Schwweitzer – Nobel da Paz – 1952)

Lista de abreviaturas

BMP (proteína óssea morfogenética)

DNA (ácido desoxirribonucléico)

EGF (fator de crescimento epidérmico)

EMT (transição epitelial-mesenquimal)

ERK (quinase regulada pelo extracelular)

FCAV (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias)

FMVZ (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia)

FGF (fator de crescimento do fibroblasto)

H.E. (Hematoxilina e Eosina)

HV (Hospital Veterinário)

ILK (quinase ligada à integrina)

MAPK (proteína quinase mitógeno-ativada)

NF-κβ (fator nuclear κβ)

RNA (ácido ribonucléico)

SOV (Serviço de Oncologia Veterinária)

SRD (Sem raça definida)

TGFβ (fator de crescimento transformador β)

TNM (tumor, linfonodo, metástase)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Anticorpos primários utilizados com especificação de clone, diluição e fabricante. ..... Pág. 17

TABELA 2. Resultados do tipo histológico, idade, raça e tempo de sobrevida de cada um dos animais dos grupos 1, 2 e 3. ..... Pág. 22

TABELA 3. Quantidade de amostras positivas e negativas para a marcação imunoistoquímica com Vimentina. ..... Pág. 36

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Carcinoma mamário simples padrão tubular (grupo 3). Presença de células binucleadas, cromatina grosseira e nucléolos evidentes. Coloração: H.E. Aumento de 400x. ..... Pág. 21

FIGURA 2. Carcinoma mamário complexo (grupo 3). Proliferação do epitélio tubular e das células mioepiteliais. Coloração: H.E. Aumento de 400x. Pág. 21

FIGURA 3. Percentuais de amostras negativas e com baixa e alta marcação para o anticorpo anti-p53 nos diferentes grupos experimentais..... Pág. 23

FIGURA 4. Adenoma mamário (Grupo 1). Ausência de marcação nuclear (seta). Imunoistoquímica, anticorpo primário anti-p53, Envision, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 500x..... Pág. 24

FIGURA 5. Adenoma mamário (Grupo 1). Baixo percentual de marcação nuclear (seta). Imunoistoquímica, anticorpo primário anti-p53, Envision, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 400x. ..... Pág. 24

FIGURA 6. Carcinoma mamário complexo (Grupo 2). Alto percentual de marcação nuclear (seta). Imunoistoquímica, anticorpo primário anti-p53, Envision, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 400x. ..... Pág. 25

FIGURA 7. Percentuais de amostras negativas e com baixa e alta marcação para o anticorpo anti-p63 nos diferentes grupos experimentais. ..... Pág. 26

FIGURA 8. Carcinoma mamário simples padrão sólido não-metastático (Grupo 2). Imunomarcação em células basais (seta). Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário anti-p63, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 400x. ..... Pág. 27

FIGURA 9. Carcinoma mamário simples padrão sólido metastático (Grupo 3). Imunomarcação em células basais (seta). Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário anti-p63, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 400x. ..... Pág. 27

FIGURA 10. Percentuais de amostras com intensidade fraca, moderada ou forte para o anticorpo anti-TGFβ nos diferentes grupos experimentais. Pág. 28

FIGURA 11. Carcinoma mamário simples padrão sólido (Grupo 2). Intensidade moderada de marcação citoplasmática (seta). Imunoistoquímica, anticorpo primário anti-TGFβ, Advance, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 500x. ..... Pág. 29

FIGURA 12. Carcinoma mamário simples padrão tubular (Grupo 2). Forte Intensidade de marcação citoplasmática (seta). Imunoistoquímica, anticorpo primário anti-TGFβ, Advance, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 500x. ..... Pág. 29

FIGURA 13. Percentual de amostras negativas, com baixa e alta marcação para o anticorpo anti-pSmad2 nas células epiteliais tumorais nos diferentes grupos experimentais..... Pág. 30

FIGURA 14. Percentual de amostras negativas, com baixa e alta marcação para o anticorpo anti-pSmad2 no núcleo das células estromais nos diferentes grupos experimentais..... Pág. 31

FIGURA 15. Mama normal. Marcação no núcleo das células epiteliais e ausência de marcação nas células estromais. Imuno-histoquímica, anticorpo primário anti-pSmad2, Advance, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 200x. ..... Pág. 32

FIGURA 16.Carcinoma mamário simples padrão tubular (Grupo 3). Marcação no núcleo das células epiteliais neoplásicas e das células estromais. Imuno-histoquímica, anticorpo primário anti-pSmad2, Advance, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 400x. ..... Pág. 32

FIGURA 17. Percentual de amostras com baixa e alta marcações para o anticorpo anti-E-caderina nos diferentes grupos experimentais..... Pág. 33

FIGURA 18. Carcinoma mamário complexo (Grupo 2). Baixo percentual de marcação em membrana citoplasmática (seta). Imuno-histoquímica, anticorpo primário anti-E-caderina, Advance, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 400x. ..... Pág. 34

FIGURA 19. Carcinoma mamário simples padrão tubular (Grupo 3). Alto percentual de marcação em membrana citoplasmática (seta). Imunoistoquímica, anticorpo primário anti-E-caderina, Advance, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 500x. ..... Pág. 34

FIGURA 20. Carcinoma mamário simples padrão sólido (Grupo 3). Presença de células marcadas entremeadas no estroma mamário (seta). Imunoistoquímica, anticorpo primário anti-E-caderina, Advance, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 400x. ..... Pág. 35

FIGURA 21. Carcinoma mamário simples padrão sólido (Grupo 3). Presença células neoplásicas marcadas para E-caderina em vaso linfático (seta). Imunoistoquímica, anticorpo primário anti-E-caderina, Advance, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 400x. ..... Pág. 35

FIGURA 22. Adenoma mamário (Grupo 1). Ausência de marcação citoplasmática nas células epiteliais neoplásicas (seta). Imunoistoquímica, anticorpo primário anti-Vimentina, Advance, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 400x. ..... Pág. 37

FIGURA 23. Carcinoma mamário complexo (Grupo 2). Presença de marcação m células basais e ausência de marcação nas células epiteliais (seta). Imunoistoquímica, anticorpo primário anti-Vimentina, Advance, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 500x. ..... Pág. 37

FIGURA 24. Carcinoma mamário simples padrão sólido (Grupo 3). Marcação citoplasmática em células epiteliais neoplásicas (seta). Imunoistoquímica, anticorpo primário anti-Vimentina, Advance, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 500x. ..... Pág. 38

FIGURA 25. Carcinoma mamário simples padrão sólido (Grupo 3). Intensa marcação no citoplasma das células epiteliais neoplásicas (seta). Imunoistoquímica, anticorpo primário anti-Vimentina, Advance, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 400x. ..... Pág. 38

SUMÁRIO

Página

Resumo..... xii

1. Introdução..... 1

2. Revisão de Literatura..... 3

3. Objetivos..... 15

4. Material e métodos..... 16
   4.1. Coleta do material..... 16
   4.2. Grupos Experimentais..... 17
   4.3. Imuno-histoquímica..... 17
   4.4. Forma de Análise dos Resultados..... 19

5. Resultados..... 20
   5.1. Dados epidemiológicos..... 20
   5.2. Avaliação imuno-histoquímica..... 23

6. Discussão..... 39

7. Conclusões..... 48

8. Perspectivas futuras..... 49

9. Referências..... 50

10. Artigo enviado para publicação..... 57

TERRA, E. M. **TGFβ, pSmad2, p53, p63, E-caderina e Vimentina como marcadores prognósticos em tumores espontâneos de mama de cadelas.** Botucatu, 2010, 65 p., Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

RESUMO

Tumores mamários são freqüentemente diagnosticados em cadelas e apresentam comportamento biológico muito semelhante aos das mulheres, fazendo da cadela um modelo para o estudo comparativo. Nas neoplasias malignas, invasão e metástase são características biológicas que têm influência direta no prognóstico. Com o aumento da disponibilidade de anticorpos para imuno-histoquímica na espécie canina, inúmeros estudos têm sido realizados para prover informações a respeito das transformações celulares que ocorrem durante a carcinogênese e o processo metastático. A p53 é conhecida como “guardiã do genoma” e aparece mutada em cerca de 50% das neoplasias humanas. A p63 possui elevada homologia seqüencial com a p53 e sua função supressora tumoral tem sido investigada. A transição de células epiteliais em mesenquimais (EMT) é um processo fisiológico no qual as células perdem suas características epiteliais e adquirem fenótipo mesenquimal, capaz de permitir a migração celular e esta transição tem sido investigada em participar da disseminação metastática nos cânceres humanos. Assim, este estudo avaliou a presença de p53, p63 e marcadores envolvidos na EMT (TGFβ, pSmad2, E-caderina e Vimentina) em adenomas e carcinomas mamários caninos com e sem metástase. Houve diminuição da marcação para p63 e E-caderina conforme progressão da lesão e o inverso ocorreu com a p53 e Vimentina. O percentual de marcação para o TGFβ não variou, tendo apresentado apenas variação com relação à intensidade de marcação. A marcação do pSmad2 foi diminuída nas células epiteliais neoplásicas e aumentada nas células estromais de acordo com o avanço da neoplasia. Estes achados sugerem que a EMT também ocorra nas neoplasias mamárias caninas e abrem perspectivas para mais estudos nesta área.

Palavras-chave: cadela, neoplasia mamária, metástase, EMT

TERRA, E. M. **TGFβ, pSmad2, p53, p63, E-caherin and Vimentin as prognosis markers in spontaneous mammary tumors in bitches.** Botucatu, 2010, 65 p., Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

ABSTRACT

Mammary tumors are often diagnosed in bitches and they are very similar to that occur in women, making this animal an excellent model for comparative studies. In malignancies, invasion and metastasis are important biological features that have direct influence on patient´s prognosis. They occur in several pathways and there are several factors that can influence a malignancy until it arrives at a distant site as well as their growth and differentiation into a new tumor. With increasing of availability of antibodies to perform immnuohistochemistry in dogs, numerous studies have been conducted in order to provide more information about the cellular changes that occur in breast carcinogenesis. p53 is a protein that actively participates in cell cycle regulation and appears mutated in about 50% of human malignancies. p63 has a high sequential homology with p53, and despite its known role in embrio development, its tumor suppression function has been investigated. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a physiological process that occurs during development and wound healing, by which cells lose their epithelial characteristics and acquire mesenchymal phenotype allowing migration. Recently, EMT has been investigated in participate on metastatic spread in human cancers. This way, this study assessed the presence of p53 and p63 as well as EMT´s involved markers (TGFβ, e-cadherin and vimentin) in benign and malignant mammary tumors, with or without metastasis. Decrease staining of p63 was observed in injury progression, what occur inversely with p53. The TGFβ staining did not vary between groups, presenting only variation in labeling intensity. We also observed that e-cadherin staining was decreased in advanced cancers and they were express vimentin, a marker of mesenchymal cells. This findings suggest that EMT also occurs in canine mammary neoplasias and give perspectives for further studies in this area.

Keywords: bitch, mammary tumor, metastasis, EMT

1. INTRODUÇÃO

Segundo relatório recente da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS (Organização Mundial da Saúde), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. Estimou-se que, no ano de 2008, ocorreriam cerca de 12 milhões de casos novos, com 7 milhões de óbitos, sendo destes, 1,29 milhões de novos casos somente de tumores mamários. No Brasil, estima-se que cerca de 50.000 mulheres serão diagnosticadas com esta neoplasia em 2010 (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2008; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA, 2009). Da mesma forma, na Medicina Veterinária, estima-se que 198 em cada 100.000 cadelas desenvolvam neoplasias mamárias a cada ano, tornando-a também a mais comum entre as fêmeas desta espécie, com uma incidência de duas a três vezes maior que a observada em mulheres (BRODEY et al., 1983; SORENMO, 2003; RODASKI & PIEKARZ, 2008).

Apesar dos enormes progressos, a oncogênese do câncer de mama continua a ser um processo de vários passos ligado a mais de uma alteração molecular (WIDAKOWICH et al., 2007). A transformação de células normais em células malignas requer um acúmulo de mutações autônomas no DNA da célula, resultando em proliferação celular e habilidades para escapar do controle endógeno do ciclo celular, além de possuir resistência à apoptose (HANAHAN & WEINBERG, 2000; ARGYLE & KHANNA, 2007; KLOPFLEISCH & GRUBER, 2009). É hoje evidente que, em adição a estes eventos celulares autônomos, são necessários fatores essenciais associados ao microambiente tumoral para que os tumores se tornem clinicamente relevantes (JOYCE, 2005).

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

Desde os pioneiros estudos epidemiológicos de Maurice Leblanc, sabemos que cães são uma das espécies mais susceptíveis ao desenvolvimento de tumores espontâneos (DAGLI, 2008). Este fato, juntamente com a recente publicação do genoma do cão (LINDBLAD-TOH et al., 2005) levam a acreditar no valor do uso dos cães como modelo natural de estudo para os cânceres humanos. Ademais, a prevalência do câncer está aumentando também entre os animais domésticos, devido, ao menos em partes, à grande longevidade alcançada em razão de um controle mais efetivo das doenças em geral (PANG & ARGYLE, 2009).

2. REVISÃO DE LITERATURA

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

A idade média para o aparecimento dos tumores está entre os 7 e os 12 anos de idade, sendo rara a ocorrência em animais menores de quatro anos (LANA et al., 2007; DE NARDI et al., 2008).

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

Os tumores mamários das cadelas são normalmente de origem epitelial e sua nomenclatura internacional é conflitante, pois existem várias propostas de classificação. Estas se baseiam principalmente no padrão morfológico, devido à escassez de informações baseadas em outros parâmetros (DESTEXHE et al., 1993). A Organização Mundial da Saúde realizou a classificação de tumores mamários de cães e gatos, associando histogênese, descrição da expressão morfológica e fatores prognósticos (MISDORP et al., 1999; SORENMO, 2003). Há uma busca contínua para a elucidação dos mecanismos envolvidos no processo de desenvolvimento de tumores mamários na cadela, e também para a identificação de fatores prognósticos que possam prever como a doença poderá evoluir em cada paciente (GAMA et al., 2008; ZAIDAN-DAGLI, 2008).

O TNM (do inglês: tumor, node, metastasis) é um sistema de estadiamento que pode ser utilizado para ajudar no estabelecimento do prognóstico e que deve ser aplicado antes do início do tratamento. Seus fatores mais importantes são a avaliação do tumor primário, dos linfonodos regionais e a identificação de qualquer sítio de metástases à distância. O mais importante a ser notado no tumor primário é seu tamanho, evidência clínica de

invasividade, a suspeita de carcinoma inflamatório, ulceração e recente crescimento rápido (LANA et al., 2007).

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

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

A remoção cirúrgica permanece como a forma mais utilizada e mais aceita para o tratamento das neoplasias mamárias e a recomendação é que sempre seja realizada a mastectomia total unilateral ou a mastectomia radical (ambas as cadeias mamárias). Isto se deve ao alto percentual de recidivas no pós-operatório de cadelas tratadas apenas com a mastectomia regional (NOVOSAD, 2003; STRATMANN et al., 2008).

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

A invasão e a metástase são características biológicas dos tumores malignos e influenciam diretamente no tratamento e no prognóstico do câncer

de mama. Para que as células tumorais se desprendam de uma massa primária, penetrem nos vasos sanguíneos ou linfáticos e produzam um segundo crescimento tumoral num local à distância, elas devem superar uma série de etapas e podem estar sujeitas a diversas influências favoráveis ou não ao seu desenvolvimento (KHANNA & HUNTER, 2005; ZAIDAN-DAGLI, 2008; HOLLIER et al., 2009). A progressão de uma fase primária para uma fase metastática representa um ponto-chave no prognóstico dos pacientes com câncer (CLOHESSY & PANDOLFI, 2009).

p53 e p63

Muitos genes supressores tumorais pertencem à famílias com muitos membros, no entanto, apesar do papel central do *TP53* na tumorigênese, genes relacionados a ele não foram descobertos por quase duas décadas. Isto mudou nos anos de 1997 e 1998 com a descoberta de seus dois homólogos: *TP63* e *TP73* (WESTFALL & PIETENPOLL, 2004).

O gene TP53 é um gene supressor tumoral e é o sítio mais freqüente de alterações genéticas nas neoplasias humanas. Ele codifica a proteína p53, que controla a expressão de uma variedade de genes envolvidos na regulação do ciclo celular. Em uma célula normal, a p53 é mantida em baixas concentrações pela ação de seu regulador Mdm2 e possui uma meia-vida relativamente curta. Além disto, em algumas células a proteína pode estar em uma forma latente, inativa para transcrição e deve receber um sinal para iniciar sua função, o que resulta em um rápido aumento em sua concentração e conseqüente ativação. Danos no DNA e hipóxia celular são alguns dos eventos que podem desencadear a cascata de ação da p53 (LEVINE, 1997; GOODSELL, 1999; LEVRERO et al., 2000).

Em resposta à estes eventos, a p53 pode agir das seguintes maneiras: (i) induzindo pausa na divisão celular para que o dano seja reparado; (ii) parando a divisão celular e fazendo com que a célula permaneça na fase G1 do ciclo e não se divida mais (senescência) e/ou (iii) dando início à morte celular programada desta célula (apoptose). Por exercer um importante papel na manutenção da integridade do genoma, a inativação do *TP53* devido a mutações ou deleções é reconhecida como um passo importante no

desenvolvimento de aproximadamente 50% dos cânceres em humanos (LEVINE 1997; VOUSDEN & PRIVES, 2009; ZUCKERMAN et al., 2009).

A maioria das mutações no gene *TP53* que codifica a proteína são do tipo *missense* e alteram apenas um aminoácido de uma proteína para outra. Isto pode alterar sua ligação ao DNA ou a outros fatores transcricionais, prejudicando seu papel na célula, além de torná-la extremamente estável e fazendo com que a mesma se acumule nas células neoplásicas (LEVINE, 1997; GOODSELL, 1999).

Assim, se for levado em conta o papel da p53 na interrupção do ciclo celular e na apoptose em resposta à danos genotóxicos nas células, pode-se afirmar que a perda na função da p53 pode permitir que células danificadas sobrevivam e dêem início a um acúmulo de mutações em outros supressores tumorais e proto-oncogenes levando ao aparecimento de neoplasias. No entanto, não deve-se eleger as mutações na p53 como eventos únicos que dão início à carcinogênese, já que somados aos seus efeitos no ciclo celular, os genes regulados pela p53 parecem também estar envolvidos na adesão celular, transdução de sinais, na modulação de microRNAs, migração celular e também em diversas fases do desenvolvimento (STEELE & LANE, 2005; ROGER et al., 2006; SUZUKI et al., 2008; ARAKI et al., 2010).

O gene *TP63* exibe uma elevada homologia sequencial e estrutural com o *TP53*, levando a especulações de que a proteína p63 poderia ter função supressora tumoral similar à da p53, no entanto ela raramente apresenta mutações nos cânceres humanos (COLLAVIN et al., 2010).

Apesar das semelhanças entre p53, p63 e p73, o terceiro membro desta família de proteínas, estudos em camundongos nocaute revelaram uma inesperada diversidade funcional entre elas. Animais nocaute para p63 e p73 exibiram diversas anormalidades no desenvolvimento, sem aumento da susceptibilidade ao câncer. Em adição ao seu importante papel no desenvolvimento, esta proteína é incriminada na manutenção da população de células-tronco em muitos tecidos epiteliais. Embora diferente, a p63 possui funções relacionadas à p53, agindo de forma sinérgica ou interferindo em sua função, já que apresenta mais de 60% de identidade entre as sequências de aminoácidos da região da p53 que se liga ao DNA. Muitos estudos têm

demonstrado que a p63 pode também induzir apoptose (MOLL & SLADE, 2004; WESTFALL & PIETENPOLL, 2004; FLORES, 2007).

Devido à grande variedade de proteínas que podem ser codificadas pelo gene *TP63*, já que o mesmo codifica variações da proteína p63 com dois diferentes terminais N, TA e ΔN, e três diferentes terminais C, α, β e γ, muitos estudos têm sido realizados no sentido de determinar suas vias de sinalização, se esta proteína ativa ou reprime a transcrição gênica e ainda se funciona como um supressor tumoral ou um oncogene (WESTFALL & PIETENPOLL, 2004; FLORES, 2007).

A expressão da p63 é observada no núcleo das células basais do epitélio normal (pele, esôfago, cérvix, vagina e outros) e também em certas populações de células basais em estruturas glandulares da próstata, mama e brônquios. Ela é especificamente expressa nas células mioepiteliais da mama e considerada um marcador específico para estas células no tecido mamário normal (Di COMO et al., 2002; MOLL & SLADE, 2004). Na mulher, ela é expressa de uma maneira decrescente de lesões mamárias benignas para malignas e sua expressão é muito baixa nos carcinomas invasivos, já que o principal critério para classificação de um carcinoma invasivo é a perda das células mioepiteliais. Entretanto, a perda da p63 nas células mioepiteliais dos ductos mamários não pode ser usada como um marcador único de invasividade para os carcinomas ductais *in situ* (RIBEIRO-SILVA et al., 2003; STEFANOU et al., 2004).

Nas décadas passadas, o maior foco das pesquisas no câncer eram as próprias transformações tumorais, enquanto que o papel do microambiente celular na tumorigênese não era largamente explorado. Numerosos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que crescimento, sobrevivência, polaridade e comportamento invasivo das células do câncer de mama podem ser modulados pelas células mioepiteliais e estromais e muitos genes têm sido implicados neste processo. Nas mulheres, as neoplasias mamárias evoluem em uma sequência clínico-patológica de hiperproliferação das células epiteliais para uma lesão *in situ*, invasiva e então para carcinomas metastáticos. O maior critério que os patologistas usam para diferenciar lesões *in situ* de carcinomas invasivos é a presença ou a ausência de uma linha intacta de células mioepiteliais. Entretanto, não se sabe o que leva ao desaparecimento das

células mioepiteliais nos tumores invasivos, se é a eliminação seletiva por apoptose ou ruptura da diferenciação normal das células mioepiteliais e como isso contribui para a progressão tumoral (SHEKHAR et al., 2003; POLYAK & HU, 2005).

A EMT (*Epithelial-mesenchymal transition*)

Desde a fase embrionária, células de origem epitelial e mesenquimal contribuem para a manutenção da estrutura e função dos órgãos em desenvolvimento. Entretanto, estes fenótipos não são sempre permanentes, e às vezes, em condições apropriadas, células epiteliais e mesenquimais são convertidas entre os dois fenótipos (MICALIZZI et al., 2010).

A EMT é um fenômeno fisiológico que ocorre durante a embriogênese, a cicatrização e reparação tecidual e também no câncer, que coordena a transição de células epiteliais em células mesenquimais (HOLLIER et al., 2009).

Esta transição começa com a perda da polaridade ápico-basal, permitindo a mistura dos componentes apicais e baso-laterais da membrana. Junções célula-célula adicionais incluindo as junções aderentes e as junções *gap* começam a se separar e a membrana basal subjacente é degradada. Proteínas de superfície celular como E-caderina e integrinas, que mediam as conexões epiteliais com as células vizinhas e a membrana basal, são substituídas por N-caderina e integrinas de adesão transitória, respectivamente, imprimindo à célula um fenótipo mesenquimal. Adicionalmente, elementos do citoesqueleto são reorganizados e a actina periférica é substituída por fibras de tensão, ao passo que filamentos intermediários de citoqueratina são substituídos por vimentina. Juntas, estas mudanças transformam as células de um formato cuboidal para fusiforme e finalmente, as células adquirem a habilidade de invadir e se mover na matriz extra celular desprovidas de qualquer contato célula a célula (HAY, 1995; HOLLIER et al., 2009, TAYLOR et al., 2010).

Durante o desenvolvimento, a cicatrização e o câncer, as células epiteliais podem atingir graus variados de plasticidade. Estas mudanças permitem uma resposta migratória dinâmica da célula dependendo de sua constituição, de sua expressão gênica e de seu microambiente. Desta forma, a literatura recente tem classificado esta transição em três diferentes subtipos, que são: (1) a que

ocorre na fase embrionária ou durante o desenvolvimento de alguns órgãos; (2) presente na fibrose e/ou reparação tecidual e (3) a ligada ao câncer (KALLURI, 2009).

A indução de uma EMT completa não é o único mecanismo pelo qual as células epiteliais podem se desprender e migrar durante o desenvolvimento. A plasticidade da célula epitelial também tem sido observada em um processo denominado migração coletiva. Neste processo as células estão conectadas fisicamente e funcionalmente formando grupos e o mesmo tem sido identificado como um processo celular crítico na morfogênese da ramificação da glândula mamária durante o desenvolvimento (RORTH, 2009).

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

Muitas vias de sinalização podem induzir o processo da EMT, já que este requer a coordenação de uma complexa rede de sinalizações extra e intra-celulares envolvendo fatores de iniciação e mecanismos de *feedback*. Dentre elas, o FGF, o TGFβ, Wnt/β-catenina, em parte pela regulação de muitos fatores transcricionais são vias incriminadas em sua indução (TOMASKOVIC-CROOK et al., 2009; WRIGHT et al., 2010).

Estudos recentes têm demonstrado que a indução de EMT em células mamárias epiteliais normais e tumorais de ratos e humanos pode resultar na geração de células com propriedades de células-tronco como a auto-renovação, além de demonstrarem que a exposição ao TGFβ resulta na conversão de células epiteliais mamárias humanas de cultura em células

semelhante à células-tronco, também conhecidas como “células iniciadoras tumorais” (MANI et al., 2008; CREIGHTON et al., 2010).

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

O TGFβ e os fatores transcricionais Smad

O fator de crescimento transformador β é membro de uma grande família de citocinas que exerce papéis cruciais no desenvolvimento e na regulação da homeostase no desenvolvimento embrionário e durante a vida adulta. Além destes papéis, ele previne a progressão de tumores incipientes, regulando não apenas sua proliferação, diferenciação, sobrevivência e adesão, mas também o microambiente celular (MASSAGUÉ, 2008; BERNABEU et al., 2009).

O TGFβ possui três ligantes diferentes TGFβ1, TGFβ2 e TGFβ3 que normalmente são encontrados em sua forma latente na matriz extra-celular e podem ser ativados por muitos mecanismos que incluem a expressão de algumas integrinas, catepsina D, matriz metaloproteínase 9, trombospondina-1, dentre outros. Ademais, radiação ionizante e radicais livres de oxigênio têm a habilidade de ativar os complexos latentes de TGFβ na matriz extra-celular (BIERIE & MOSES, 2009).

Após a ativação do TGFβ, duas vias de sinalização podem ser acionadas. Em uma delas, conhecida como via canônica, o TGFβ ativo se liga aos seus receptores transmembrana do tipo II que são fosforilados e ativam os receptores tipo I. Neste momento, proteínas denominadas Smad, mais especificamente, Smad2 e Smad3 (R-Smads) são fosforiladas e se deslocam ao núcleo celular formando um complexo com Smad4, que é um ligante comum à todos os Smads. Estes complexos se acumulam no núcleo e recrutam co-ativadores transcricionais, co-repressores e fatores de remodelamento de cromatina. Através desta interação combinatória com diferentes fatores transcricionais, um estímulo comum do TGFβ pode ativar ou reprimir uma

centena de genes-alvo de uma única vez (SHI & MASSAGUÉ, 2003; ROSS & HILL, 2007; MASSAGUÉ, 2008).

Dentre os vertebrados, existem 5 tipos de R-Smads, Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 e Smad8 e estes são fosforilados em resposta a diferentes tipos de ligantes de TGFβ. Por exemplo, em muitos casos, a indução da via pelos ligantes do TGFβ levam à fosforilação de Smad2 e Smad3, enquanto que a ligação de BMP ou GDF induzem a fosforilação dos Smad1, Smad5 e Smad8. O Smad4 não é um ligante restrito e pode formar complexos com todos R-Smads (ROSS & HILL, 2007).

Na via de sinalização não canônica ou Smad independente, a ligação do TGFβ aos seus receptores pode ativar uma variedade de outros efetores, incluindo NF-κβ, ILK, uma variedade de pequenas GTPases membros da família MAP quinase (ERK1/2, JNK e p38 MAPK), Snail, ZEB, dentre outros, que exercem uma variedade de outras funções nas células. Por exemplo, o aumento da expressão de ILK (quinase ligada à integrina) está associado à diminuição da expressão de E-caderina (TAYLOR et al., 2010).

A via do TGFβ como um todo potencialmente regula a iniciação tumoral, sua progressão e metástase. Anteriormente foi demonstrado que o TGFβ possuía a habilidade de suprimir a tumorigênese pela inibição da progressão do ciclo celular e indução da apoptose. O impacto citostático e apoptótico do TGFβ como supressor tumoral foi estabelecido por observações que demonstraram claramente que ele poderia promover a progressão tumoral por suprimir a vigilância imune e também induzir a EMT, permitindo assim, a invasão e a metástase (MASSAGUÉ, 2008; BIERIE & MOSES, 2009; TAYLOR et al., 2010).

Entretanto, a completa anulação da resposta do TGFβ nas células de carcinoma também pode permitir o aparecimento de metástases *in vivo*. Interessantemente, expressões gênicas associadas com ambas, perda ou ganho de sinalização do TGFβ nestas células mostraram correlação com piores prognósticos. Ainda mais, células epiteliais mamárias que adquiriram resistência às atividades citostáticas do TGFβ, geralmente exibem comportamento oncogênico quando estimuladas pelo mesmo. Esta inversão fenotípica em sua função durante a tumorigênese é conhecida como o “Paradoxo do TGFβ” e representa uma questão ainda sem resposta a respeito

das ações patofisiológicas desta citocina (MASSAGUÉ, 2008; BIERIE & MOSES, 2009; TAYLOR et al., 2010).

A E-Caderina

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

Nas neoplasias humanas, a perda ou redução da expressão protéica de E-caderina pode ocorrer durante ou após a sua transcrição e ser causada por mutações somáticas, deleções cromossômicas, por clivagem proteolítica ou ainda pelo silenciamento de seu gene promotor, o CDH1 (ONDER et al., 2008; YILMAZ & CHRISTOFORI, 2009). Este silenciamento pode ser mediado por uma lista de fatores transcricionais, dentre eles, Snail1, Snail2 (Slug), ZEB1 (δEF1), ZEB2 (Sip1) e Twist, cuja expressão pode ser induzida por uma variedade de estímulos, incluindo a ativação do TGFβ, EGF, Wnt, dentre outros (PEINADO et al., 2007; YILMAZ & CHRISTOFORI, 2009).

Pesquisas recentes têm atribuído um papel crucial à família de microRNA-200 (miR-200) na regulação dos repressores transcricionais de E-caderina, ZEB1 e ZEB2, e na indução de EMT nas células neoplásicas. Este fato foi observado por uma associação entre diminuição da expressão da família miR-200, inibição da expressão de E-caderina e indução de EMT em células neoplásicas, incluindo as mamárias (TRYNDYAK et al., 2009).

A perda ou redução da expressão gênica ou protéica de E-caderina é frequentemente observada durante a progressão tumoral em muitas neoplasias epiteliais, inclusive as mamárias, e é associada com a disseminação metastática, já que promove a desagregação das células neoplásicas. No

entanto, vários trabalhos demonstram que diversas proteínas estruturais associadas com as junções aderentes podem também mediar as funções de sinalização intracelular da E-caderina. Assim, a perda da E-caderina pode resultar na ativação de uma cascata específica de sinalização que, por sua vez, confere características às células neoplásicas que facilitam a conclusão das etapas posteriores da metástase (CLEVERS, 2006; ONDER et al., 2008).

Sua expressão diminuída ou ausente não apenas leva à ruptura mecânica das junções aderentes entre as células, como também libera proteínas do complexo citoplasmático de adesão celular que exercem funções ambivalentes dependendo de sua localização intracelular. Um exemplo destas proteínas é a β-catenina, conhecida por seu duplo papel na adesão celular e na participação na via canônica do Wnt. Nesta via, o “excesso” de β-catenina citoplasmática se desloca ao núcleo, liga-se a fatores transcricionais e interage com a cromatina de diversas formas, por exemplo, mantendo ou ativando a produção de células-tronco, promovendo assim a proliferação celular. Pesquisas recentes têm identificado correlação entre EMT e a indução da produção de células-tronco neoplásicas (CLEVERS, 2006; MANI et al., 2008).

Desta forma, observa-se que a perda ou diminuição da expressão de E-caderina traz grandes consequências transcricionais e funcionais para as células epiteliais, não só pela perda da adesão entre as células, mas também por facilitar a passagem por etapas subseqüentes da cascata de invasão e metástase (ONDER et al., 2008).

A Vimentina

É uma proteína estrutural do citoesqueleto celular que constitui os filamentos intermediários das células mesenquimais. Está associada com as organelas celulares, com elementos do citoesqueleto e adesões de membrana e está presente nos fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, leucócitos e linfócitos, dentre outros. Nos adultos, a expressão de vimentina é vista nos tecidos conjuntivos, constituídos por células mesenquimais, e também nos músculos e sistema nervoso central (KOKKINOS et al., 2007).

Apesar de ser uma proteína característica do fenótipo mesenquimal, sua expressão tem sido descrita em células epiteliais e está envolvida com processos fisiológicos e/ou patológicos (GILLES et al., 1999).

Carcinomas são neoplasias derivadas de células epiteliais e respondem pela maioria dos cânceres humanos. Após sua transformação inicial, as células epiteliais tumorais ficam confinadas em seu sítio primário pela expressão contínua de moléculas de adesão e pela lâmina basal intacta. Entretanto, com a progressão da doença, algumas células da periferia do tumor primário são incriminadas em comandar a EMT, adquirindo assim propriedades mesenquimais que facilitam a invasão das células neoplásicas nos tecidos adjacentes e distantes. Uma quantidade considerável de estudos na literatura atual sugere que um dos mecanismos responsáveis pela progressão do câncer de mama se deva à perda dos padrões epiteliais das células com conseqüente aquisição de propriedades mesenquimais (KOKKINOS et al.,2007; HOLLIER et al., 2009).

A vimentina e a e-caderina (com as cateninas) são bastante reconhecidas por sua expressão seletiva e seu específico papel nos estados celulares mesenquimais e epiteliais, respectivamente. O domínio intracelular das caderinas interage com as cateninas que são ligadas ao citoesqueleto de actina. Esta associação é crítica para junção estável entre as células epiteliais. A expressão de e-caderina, ligada à expressão ausente ou reduzida de vimentina é característica das células de origem epitelial, enquanto o contrário ocorre nas células com fenótipo mesenquimal. Interessantemente, este padrão mesenquimal de expressão é visto em culturas de células tumorais que possuem um fenótipo agressivo e migratório. Desta forma, a superexpressão de vimentina com alteração da expressão ou da localização de e-caderina e cateninas se associam com migração de células neoplásicas (GILLES et al., 2003; KOKKINOS et al., 2007; ONDER et al., 2008).

3. OBJETIVOS

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

- Avaliar e quantificar as expressões de p53, p63, TGFβ, E-caderina, pSmad2 e Vimentina nos tecidos mamários normais e neoplásicos (metastáticos e não-metastáticos) de mama de cadelas pela técnica de imunoistoquímica;
- Comparar os achados com o prognóstico das cadelas envolvidas neste estudo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. 1. Coleta do Material

O presente estudo teve parecer favorável do Comitê de Ética no Uso de Animais (n. 161/2009 – CEUA) e para a composição da pesquisa foram utilizadas 30 cadelas, sem predileção por raça e idade, da casuística do HV da FCAV/Unesp, Jaboticabal, SP.

A inclusão dos animais foi condicionada ao consentimento livre e esclarecido de seus proprietários. Após esclarecimento sobre o protocolo experimental, as cadelas passaram pelo atendimento inicial no Serviço de Oncologia Veterinária (SOV) da FCAV, onde foram feitos exames físicos e laboratoriais iniciais, bem como as radiografias torácicas para o estadiamento clínico da paciente.

As mastectomias foram realizadas no Serviço de Reprodução e Obstetrícia Veterinária do HV da FCAV. O material coletado era levado ao laboratório do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV onde era feita a fixação em formalina tamponada a 10%. Posteriormente, as amostras foram processadas rotineiramente, cortes de 4µ foram feitos, em um total de sete para cada amostra, sendo um para a coloração pelo método de Hematoxilina e Eosina (H.E.) e os demais para a técnica de imuno-histoquímica.

Na análise em microscopia de luz, foi feita a classificação da neoplasia, segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde (MISDORP *et al.* 1999), e avaliou-se também a presença de êmbolos em vasos sangüíneos e linfáticos, a invasão do tecido adjacente e de metástases em linfonodos inguinais e/ou axilares.

Para o monitoramento das cadelas foram obtidas informações de cada paciente como realização de quimioterapia, aparecimento de recidivas e metástases, além do tempo de sobrevida. A média do período de acompanhamento foi de 17 meses (variando de 5 a 30 meses). Estas informações foram obtidas através do Serviço de Oncologia Veterinária do HV da FCAV. O tempo de sobrevida foi contado do momento do diagnóstico até a última consulta do animal ou até a morte devido a progressão da doença. A recidiva foi definida como a ocorrência de outra neoplasia mamária após a

cirurgia. A pesquisa foi desenvolvida no período de agosto de 2008 a maio de 2010.

4. 2. Grupos Experimentais

Dos animais selecionados, foram formados os seguintes grupos:

G1: dez animais com neoplasias mamárias benignas;

G2: dez animais com neoplasias mamárias malignas sem metástase;

G3: dez animais com neoplasias mamárias malignas com metástase para linfonodos regionais e/ou órgãos distantes.

Para a comparação das reações de imuno-histoquímica, foram selecionadas mamas normais de cadelas sem histórico de neoplasia, dos Serviços de Necropsia da FCAV/Unesp Jaboticabal e da FMVZ/Unesp Botucatu.

4. 3. Imuno-histoquímica

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas no Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – Unesp Botucatu, usando-se os anticorpos da Tabela 1:

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados com especificação de clone, diluição e fabricante.

Anticorpo	Clone	Diluição	Fabricante
anti-p53	CM1	1:500	Novocastra
anti-p63	4A4	1:200	Dako
anti-TGFβ	NCL-TGFβ	1:50	Novocastra
anti-E-caderina	NCH-38	1:50	Dako
anti-Vimentina	V9	1:50	Invitrogen
anti-pSmad2	Ser 465/467	1:300	Chemicon

Após desparafinização e hidratação em uma sequência de xilol e álcool, seguiu-se a recuperação antigênica com solução tampão de citrato 10mM pré-aquecido, pH 6,0 em banho-maria por 20 minutos para o anticorpo anti-p63 e em panela de pressão (*Pascal Dako)*, de acordo com o programa pré-estabelecido pelo fabricante, para os anticorpos anti-p53, anti-E-caderina e anti-Vimentina. Para a recuperação antigênica do anticorpo anti-TGFβ foi

utilizada solução de EDTA pré-aquecida, pH 8,0 e de Tris-EDTA pH 9,0 para o anticorpo anti-pSmad2, ambos em banho-maria por 20 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com solução de água oxigenada 8% em metanol por 20 minutos e, em seguida solução de leite em pó desnatado (Molico®) 3% por 1 hora. As lâminas de p53, TGFβ, E-caderina, Vimentina e pSmad2 foram incubadas com o anticorpo primário *overnight* a 4º C e por 2 horas a 37º C para as do p63.

O complexo secundário utilizado foi o kit EnVision (*Dako K4065*) para os anticorpos anti-p53 e anti-p63 e o Advance HRP (*Dako K4068*) para o anti-TGFβ, anti-E-caderina, anti-Vimentina e anti-pSmad2 e todas as lâminas foram lavadas com solução tampão TRIS pH 7,4 entre as etapas. Para revelação das reações foi empregada solução pronta para uso de cromógeno DAB (*Dako K3468*) por cinco minutos. Todas as lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris por dois minutos, lavadas em água corrente por 10 minutos, desidratadas e montadas.

Como controle positivo para a reação da p53, foi utilizada uma lâmina de carcinoma de células escamosas de cão, para e-caderina foi utilizada amostra de mama normal e para os demais anticorpos, foram utilizados os controles internos como a epiderme da glândula mamária para a p63 e pSmad2, os fibroblastos do tecido mamário para o TGFβ e o tecido mesenquimal para a Vimentina. Em todas as baterias de imuno-histoquímica, uma lâmina foi processada como controle negativo, na qual suprimiu-se o anticorpo primário substituindo-o por controle negativo universal de camundongo (*Dako N1698*) para os anticorpos monoclonais e controle negativo universal de coelho (*Dako N1699*) para os anticorpos policlonais.

A avaliação das amostras foi feita com aumento de 40X, com auxílio do programa de análise de imagens *QWin v. 3.0 Leica* e uma câmera digital *Leica DFC* acoplada a um microscópio *Leica DMLD.* Para análise, foram localizados os focos de cada lesão e atribuídas escalas de marcação que variaram para cada um dos anticorpos utilizados. As marcações para p53, p63, E-caderina, TGFβ e pSmad2 foram avaliadas como negativo (ausência de marcação), com presença de controle positivo interno na lâmina; (1) 1 a 50% de marcação positiva e (2) acima de 50% de marcação positiva. A marcação para o anticorpo anti-Vimentina foi avaliada qualitativamente, ou seja, marcação

positiva ou negativa nas células neoplásicas. Além desta, outra escala de pontuação, foi atribuída para a intensidade de marcação dos anticorpos anti-TGFβ e pSmad2: (I) para intensidade fraca; (II) moderada e (III) forte. Todas as lâminas foram analisadas por dois observadores e os resultados foram discutidos por ambos para a conclusão das leituras, quando houve discordância.

4.4. Forma de Análise dos Resultados

As comparações entre as escalas de marcações para cada anticorpo entre os grupos, exceto a para a Vimentina, foram realizadas pelo Teste do Qui-Quadrado e para a comparação entre as três diferentes intensidades de marcação do anticorpo anti-TGFβ também foi utilizado o mesmo teste. Para avaliar a expressão do anticorpo anti-Vimentina (classificada apenas em positivo ou negativo) foi utilizado o Teste Exato de Fisher. Todas as análises estatísticas consideraram o nível de significância de 5% e o *software* de análise utilizado foi o *Graphpad Prism* versão 4.0.

5. RESULTADOS

5.1. Dados Epidemiológicos

Dos 30 animais que compuseram os grupos, 12 eram animais sem raça definida (SRD), seis da raça Poodle, seis Teckel (*Daschshunds)* e os demais de outras raças. A idade dos animais variou de 3 a 15 anos, com uma maior porcentagem entre 7 e 12 anos (67%).

Os tumores foram classificados por um observador de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (Misdorp et al.,1999). No grupo 1, composto por neoplasias benignas, todas foram classificadas como adenomas mamários. Os tipos histológicos encontrados no grupo 2 foram cinco tumores classificados como carcinoma complexo, três carcinomas simples padrão tubular, um padrão túbulo-papilífero e um padrão sólido. Com relação ao grupo 3, quatro tumores foram classificados como carcinoma simples padrão túbulo-papilífero, três padrão sólido, um padrão tubular, um padrão papilífero e um carcinoma complexo (Figura 1 e 2).

Quanto à evolução dos tumores, no grupo 1, composto por neoplasias benignas, um animal veio a óbito em decorrência de uma recidiva tumoral tendo 13 meses de sobrevida e um está em tratamento quimioterápico devido ao aparecimento de um carcinoma na outra cadeia mamária após quatro meses da primeira cirurgia. Os demais animais permanecem em acompanhamento e sem recidivas.

No grupo 2, três animais morreram pela evolução da neoplasia com uma sobrevida média de 3,8 meses e os demais permanecem em acompanhamento e sem recidivas. Com relação ao grupo 3 todas as cadelas vieram a óbito, duas no momento da cirurgia por complicações cirúrgicas devido a má-condição corporal e estágio avançado da doença e o restante por evolução do tumor e/ou complicações do mesmo levando a uma sobrevida média de 3,9 meses.

Todos os dados epidemiológicos foram compilados na tabela 2.

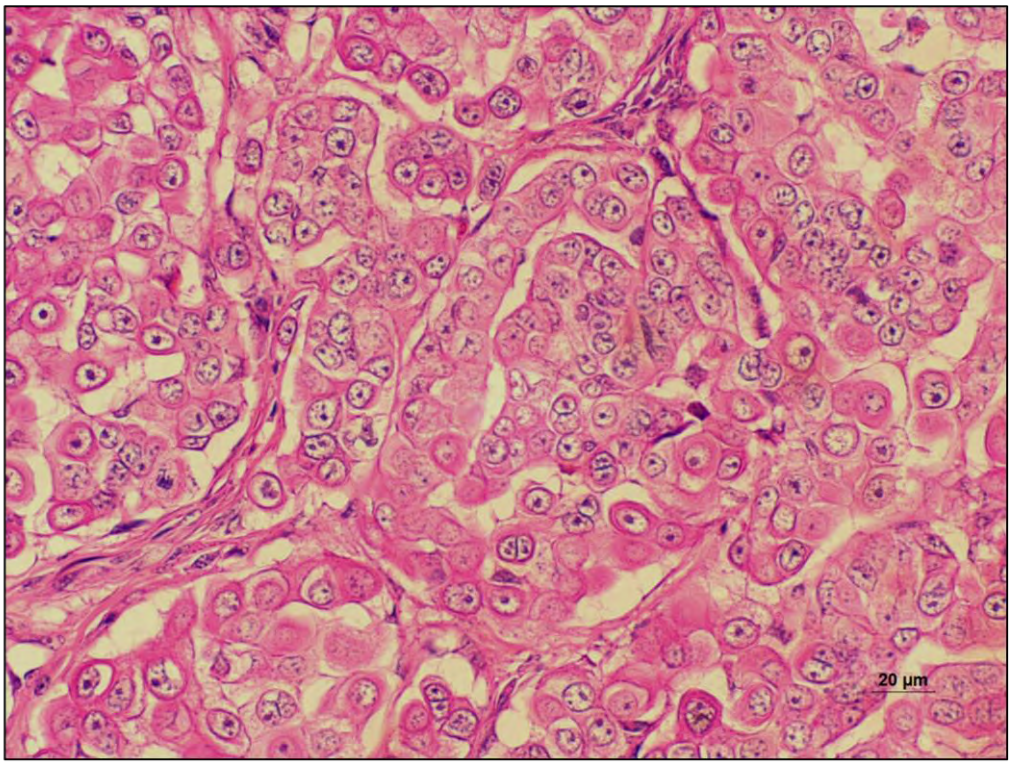


FIGURA 1. Carcinoma mamário simples padrão tubular (grupo 3). Presença de células binucleadas, cromatina grosseira e nucléolos evidentes. Coloração: H.E. Aumento de 400x.

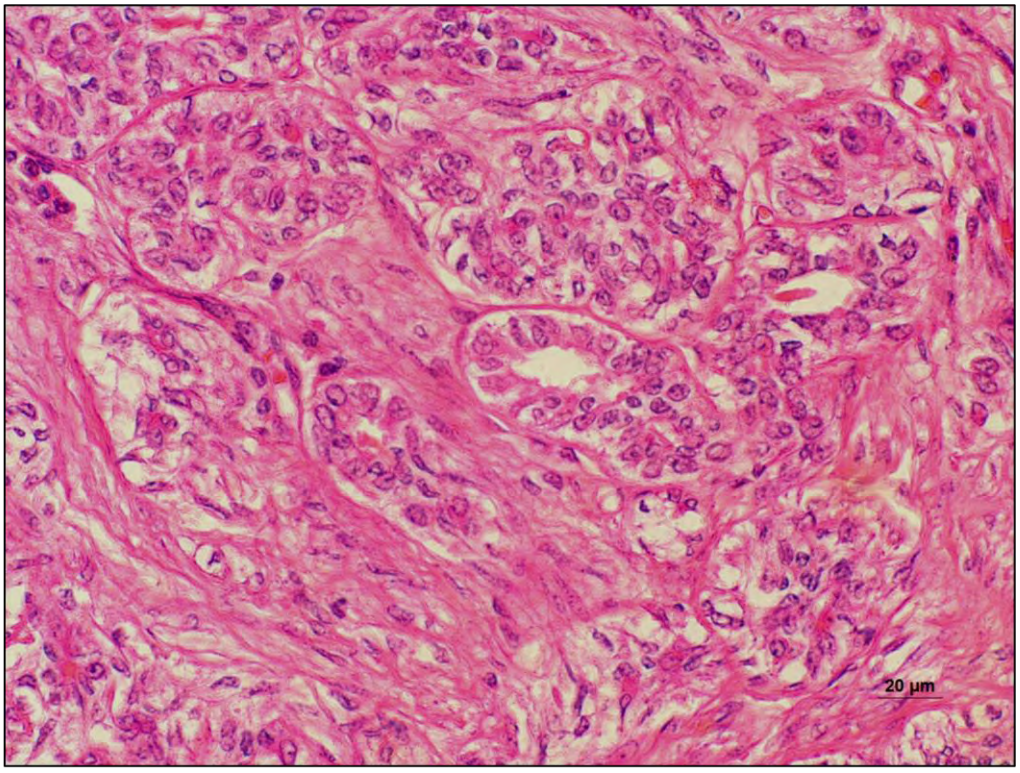


FIGURA 2. Carcinoma mamário complexo (grupo 3). Proliferação do epitélio tubular e das células mioepiteliais. Coloração: H.E. Aumento de 400x.

Tabela 2. Resultados do tipo histológico, idade, raça e tempo de sobrevida de cada um dos animais dos grupos 1, 2 e 3.

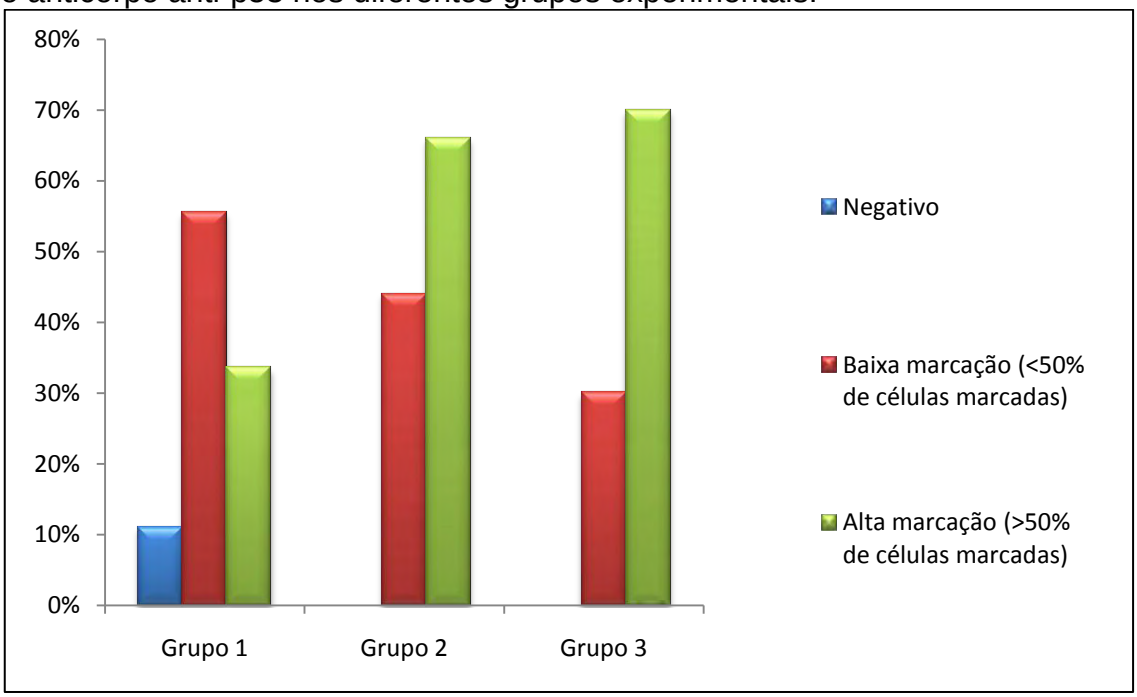
GRUPO 1				
Animal	Tipo Histológico	Idade (anos)	Raça	Tempo de Sobrevida (meses)
1	Ad	10	SRD	13
2	Ad	7	Teckel	mais de 22
3	Ad	9	Poodle	mais de 12
4	Ad	9	Boxer	mais de 10
5	Ad	7	Poodle	mais de 8
6	Ad	13	SRD	mais de 16
7	Ad	7	Teckel	mais de 6
8	Ad	8	Poodle	mais de 6
9	Ad	3	Pointer	mais de 5
10	Ad	8	Cocker	
GRUPO 2				
Animal	Tipo Histológico	Idade (anos)	Raça	Tempo de Sobrevida (meses)
11	CST	7	Teckel	mais de 30
12	CST	8	SRD	
13	CSTP	13	SRD	mais de 21
14	CST	7	SRD	5 meses
15	CSS	8	Pastor	0,3
16	CC	13	SRD	mais de 22
17	CC	10	Poodle	
18	CC	14	Poodle	6 meses
19	CC	12	SRD	mais de 7
20	CC	14	SRD	
GRUPO 3				
Animal	Tipo Histológico	Idade (anos)	Raça	Tempo de Sobrevida (meses)
21	CSP	11	Mastin	3
22	CSS	12	Teckel	2
23	CSTP	13	SRD	22
24	CSS	13	Poodle	6
25	CSTP	9	Teckel	0,5
26	CSTP	9	Boxer	2
27	CSS	12	Teckel	0
28	CC	15	SRD	0
29	CSTP	6	SRD	0,76
30	CST	15	SRD	2

Ad – Adenoma mamário; CST – Carcinoma simples padrão tubular; CSTP – Carcinoma simples padrão túbulo-papilífero; CSS – Carcinoma simples padrão sólido; CSP – carcinoma simples padrão papílifero; CC – Carcinoma complexo.

5. 2. Avaliação imuno-histoquímica

A marcação para o anticorpo anti-p53 foi nuclear (figuras 5 e 6). A ausência de marcação somente foi observada no grupo 1, composto por neoplasias benignas (figura 4). Os maiores percentuais de amostras com níveis altos de marcação (>50% de células marcadas) desta proteína foram observados nos grupos 2 e 3, compostos por neoplasias malignas, conforme a figura 3. Não houve diferença significativa entre os grupos pelo Teste do Qui-Quadrado ($p<0,05$).

Figura 3. Percentuais de amostras negativas, com baixa e alta marcação para o anticorpo anti-p53 nos diferentes grupos experimentais.



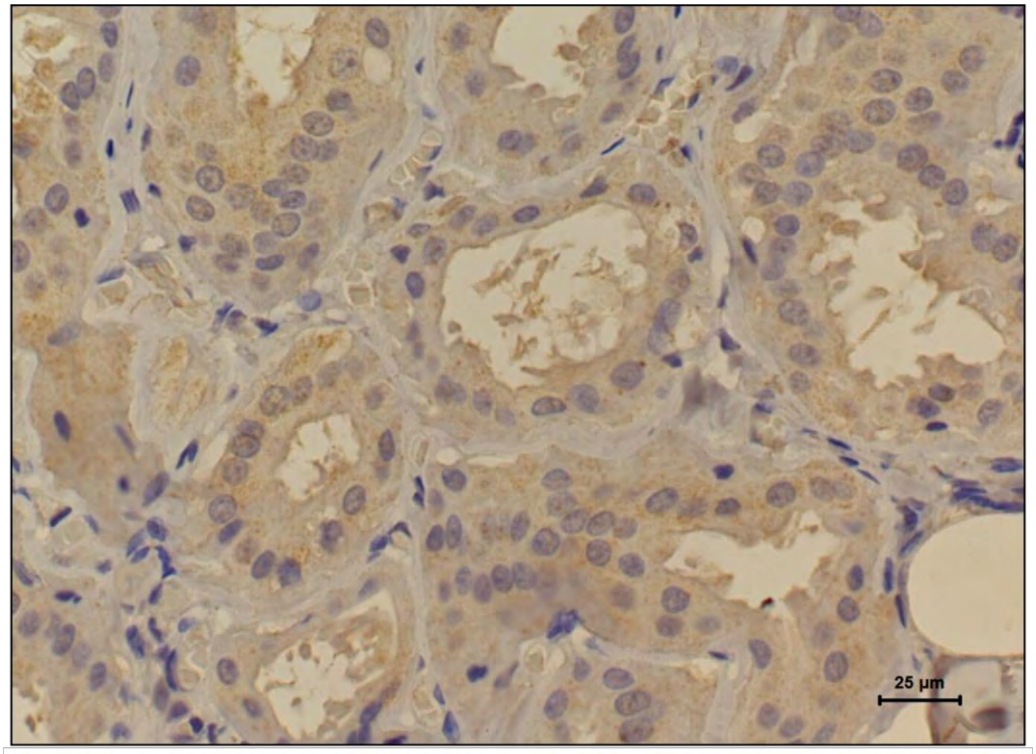


FIGURA 4. Adenoma mamário (Grupo 1). Ausência de marcação nuclear. Imuno-histoquímica, anticorpo primário anti-p53, Envision, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 500x.

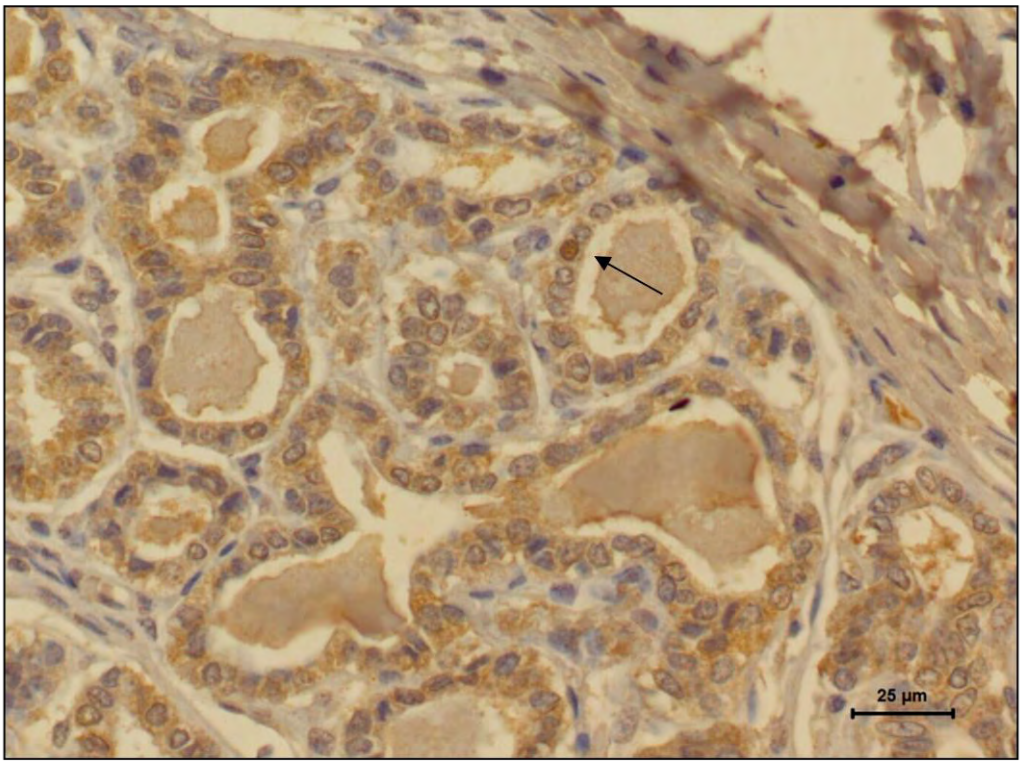


FIGURA 5. Adenoma mamário (Grupo 1). Baixo percentual de marcação nuclear (seta). Imuno-histoquímica, anticorpo primário anti-p53, Envision, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 400x.

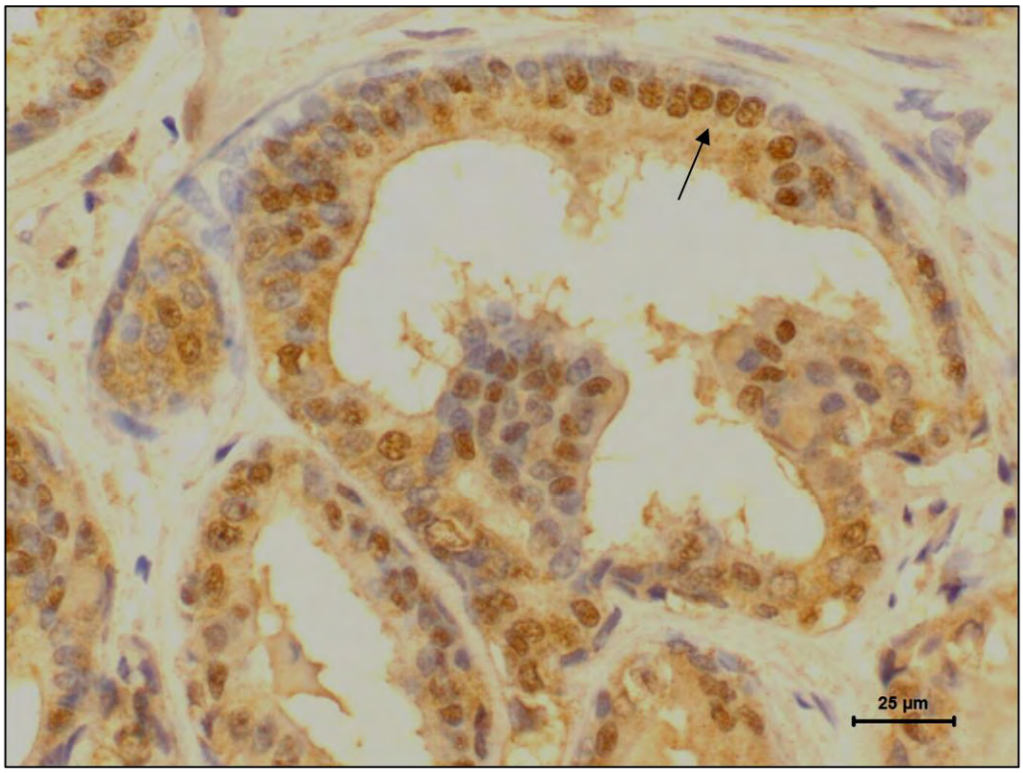
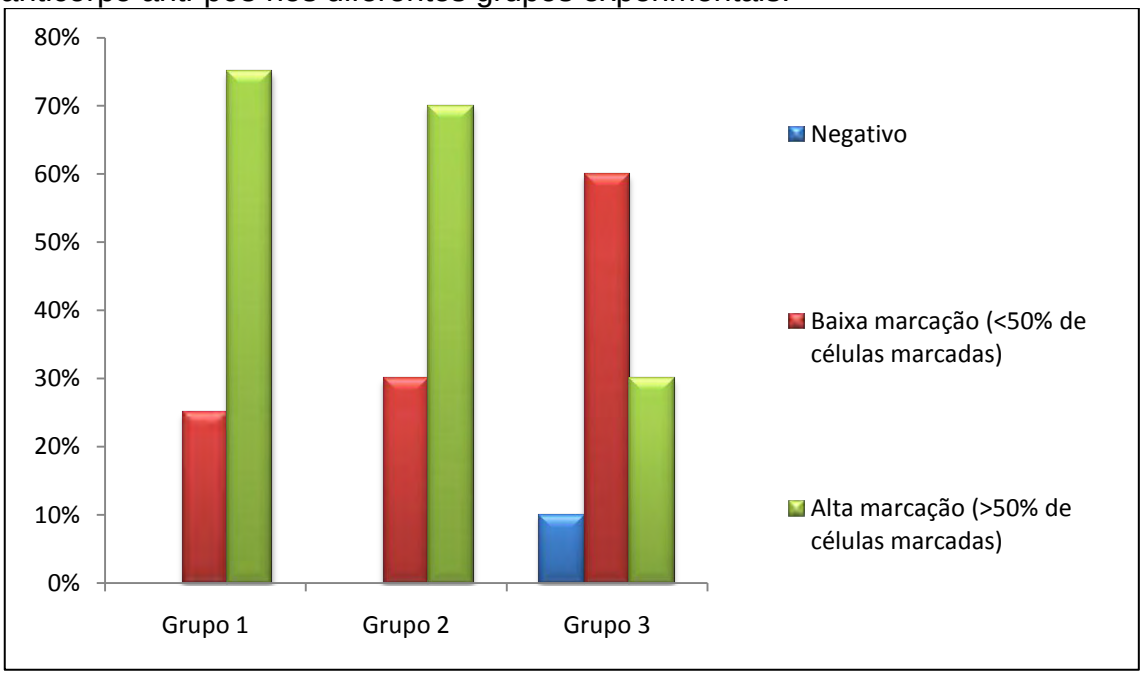


FIGURA 6. Carcinoma mamário complexo (Grupo 2). Alto percentual de marcação nuclear (seta). Imuno-histoquímica, anticorpo primário anti-p53, Envision, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 400x.

A marcação para p63 foi observada no núcleo das células basais do tecido mamário e o percentual de marcação foi decrescente do grupo 1 para os grupos 2 e 3. As menores porcentagens de marcação foram observadas nos grupos constituídos por neoplasias malignas e a ausência de marcação somente foi observada no grupo 3, constituído por neoplasias malignas que já apresentavam metástase no momento do diagnóstico (figura 7). Ademais, no grupo 1 observou-se linhas contínuas de forte marcação das células mioepiteliais ao redor dos alvéolos mamários que diminuíram progressivamente para os grupos 2 e 3. Não houve diferença significativa entre os grupos pelo Teste do Qui-Quadrado ($p<0,05$).

Figura 7. Percentual de amostras negativas, com baixa e alta marcação para o anticorpo anti-p63 nos diferentes grupos experimentais.



Nas figuras 8 e 9 estão apresentadas as imunomarcações para p63 nas neoplasias mamárias sem e com metástase.

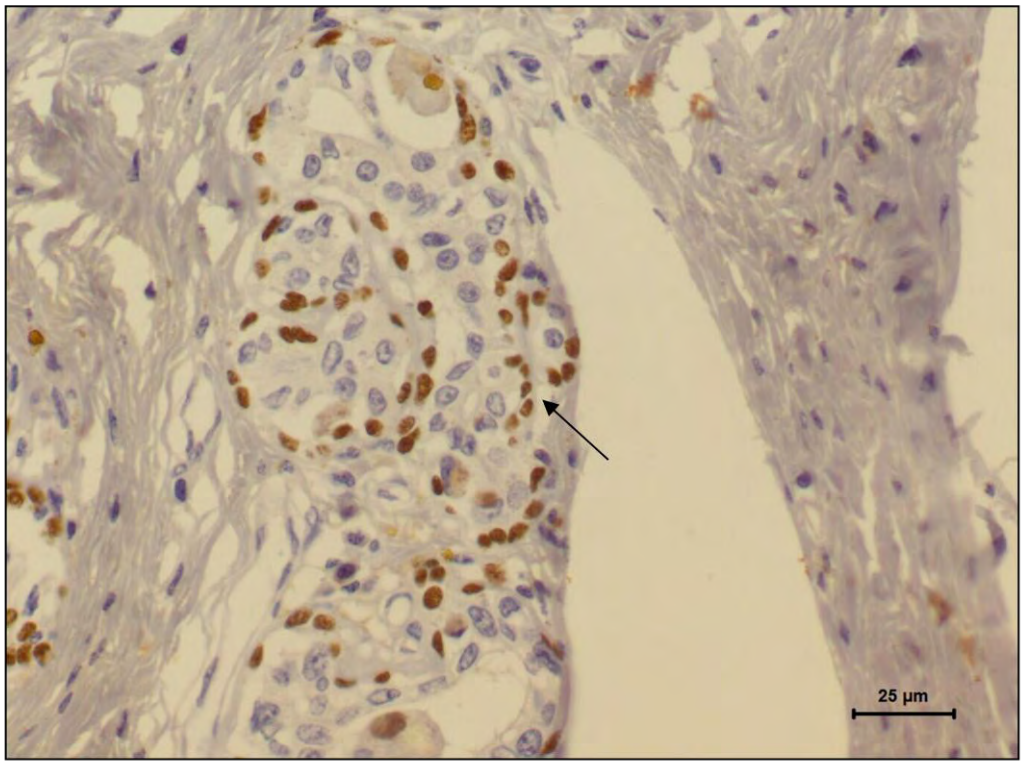


FIGURA 8. Carcinoma mamário simples padrão sólido não-metastático (Grupo 2). Imunomarcação em células basais (seta). Imuno-histoquímica, Envision, anticorpo primário anti-p63, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 400x.

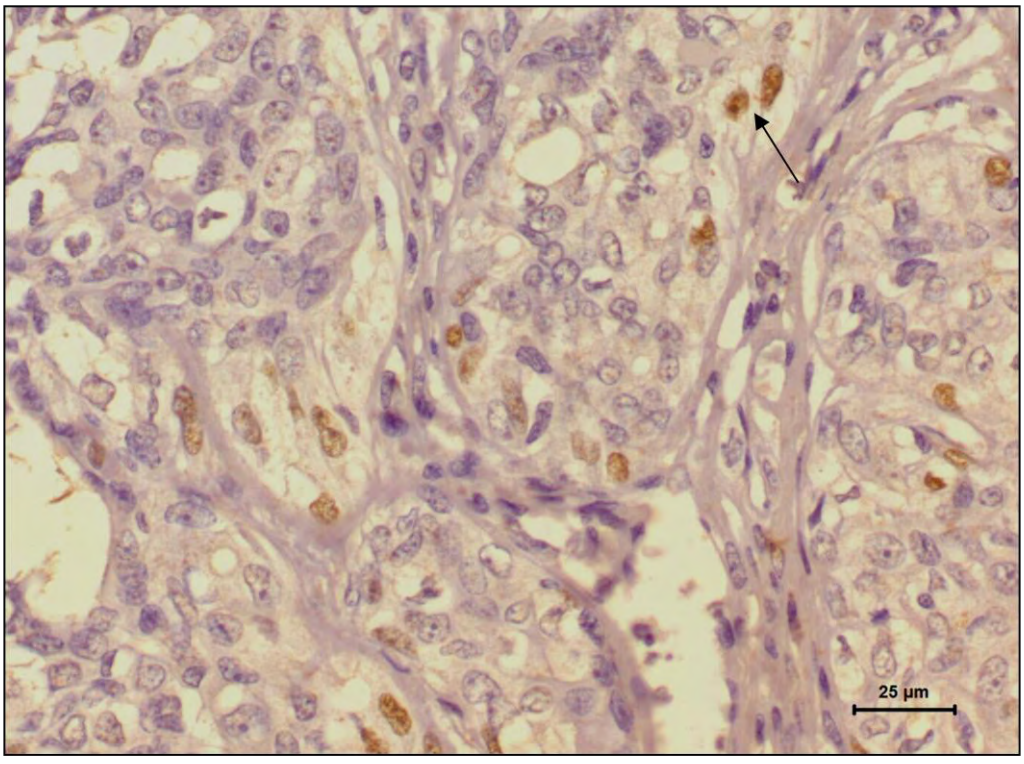
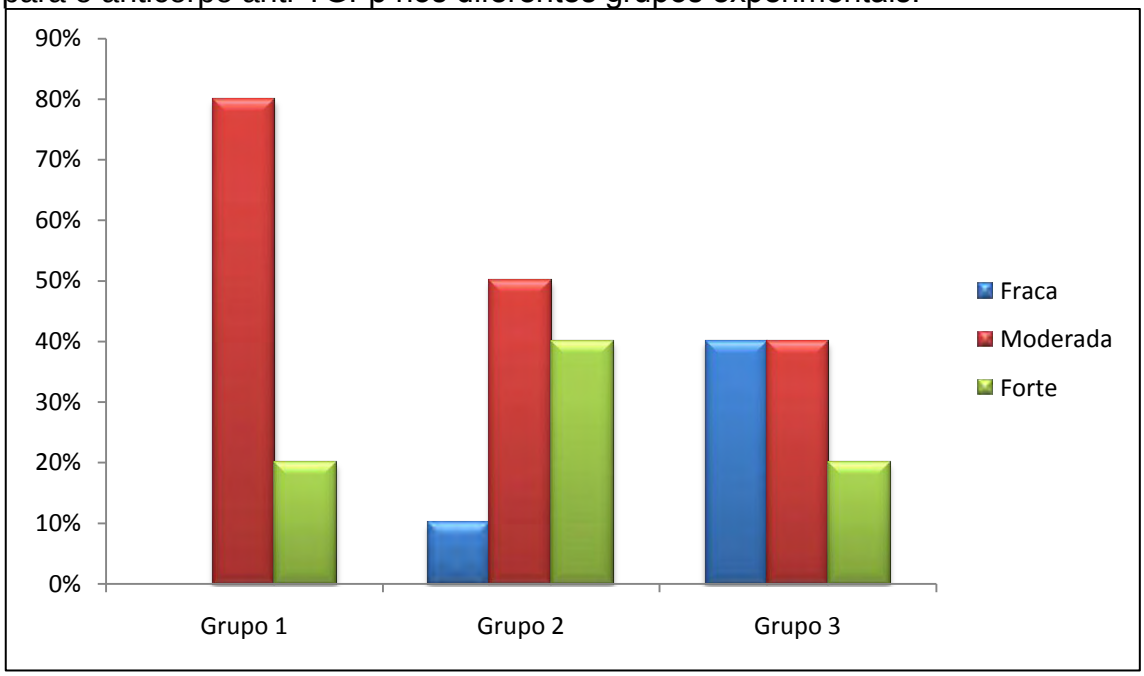


FIGURA 9. Carcinoma mamário simples padrão sólido metastático (Grupo 3). Imunomarcação em células basais (seta). Imuno-histoquímica, Envision, anticorpo primário anti-p63, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 400x.

A marcação para o anticorpo anti-TGFβ foi citoplasmática e não variou com relação ao percentual de marcação entre os grupos, pois todos apresentaram marcação em mais de 50% das células. A variação foi observada com relação à intensidade de marcação que foi classificada em fraca (I), moderada (II) ou forte (III), conforme pode ser observado na figura 10.

Figura 10. Percentual de amostras com intensidade fraca, moderada e forte para o anticorpo anti-TGFβ nos diferentes grupos experimentais.



Com relação à intensidade da marcação pode-se observar que marcações fracas foram observadas nos grupos 2 e 3, sendo mais freqüente no grupo 3. Marcações moderadas e fortes foram observadas em todos os grupos (figuras 11 e 12). Não houve diferença estatística para a intensidade de marcação entre os grupos pelo teste do Qui-Quadrado ($p<0,05$).

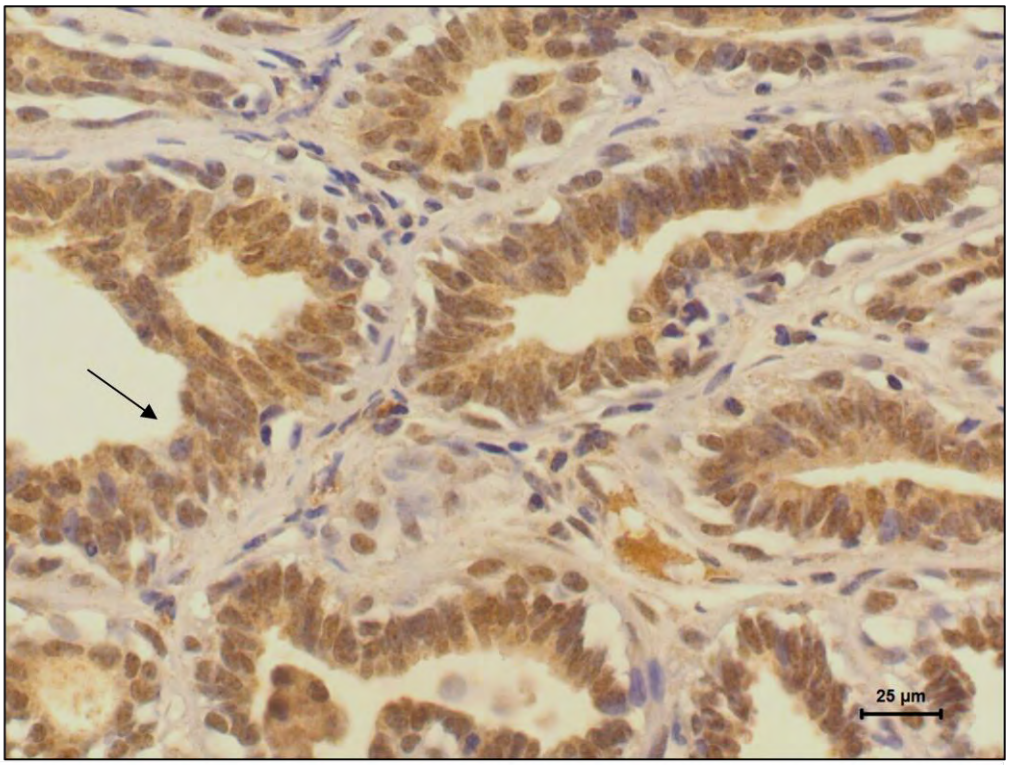


FIGURA 11. Carcinoma mamário simples padrão sólido (Grupo 2). Intensidade moderada de marcação citoplasmática (seta). Imuno-histoquímica, anticorpo primário anti-TGFβ, Advance, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 500x.

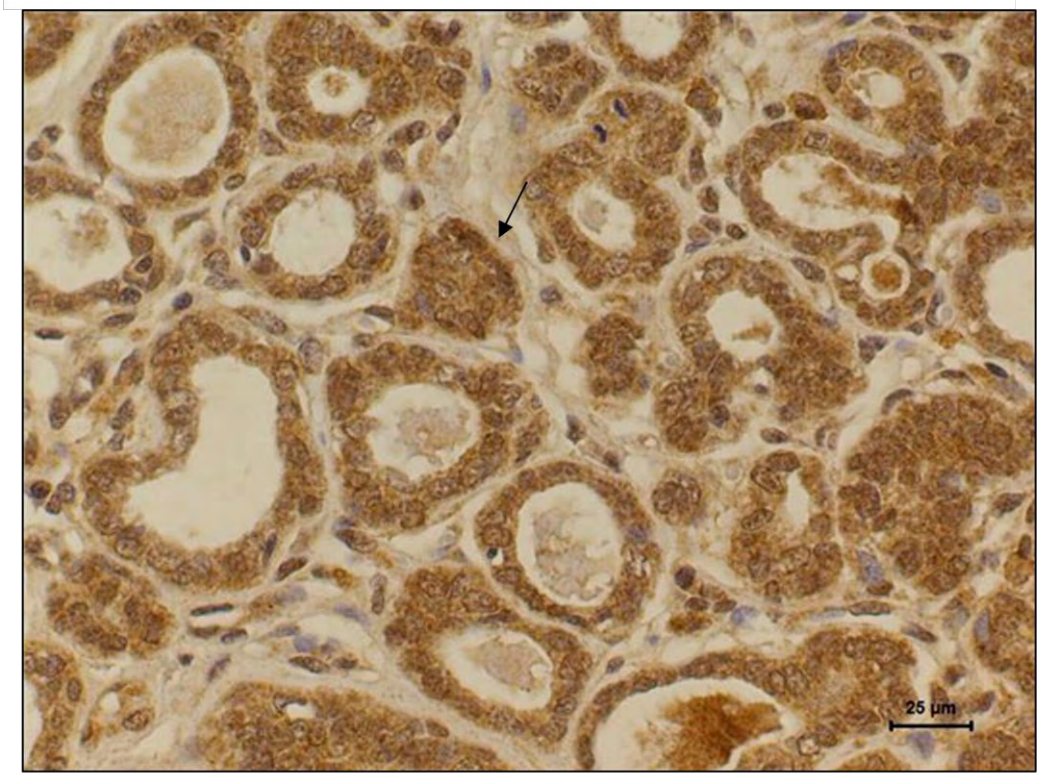
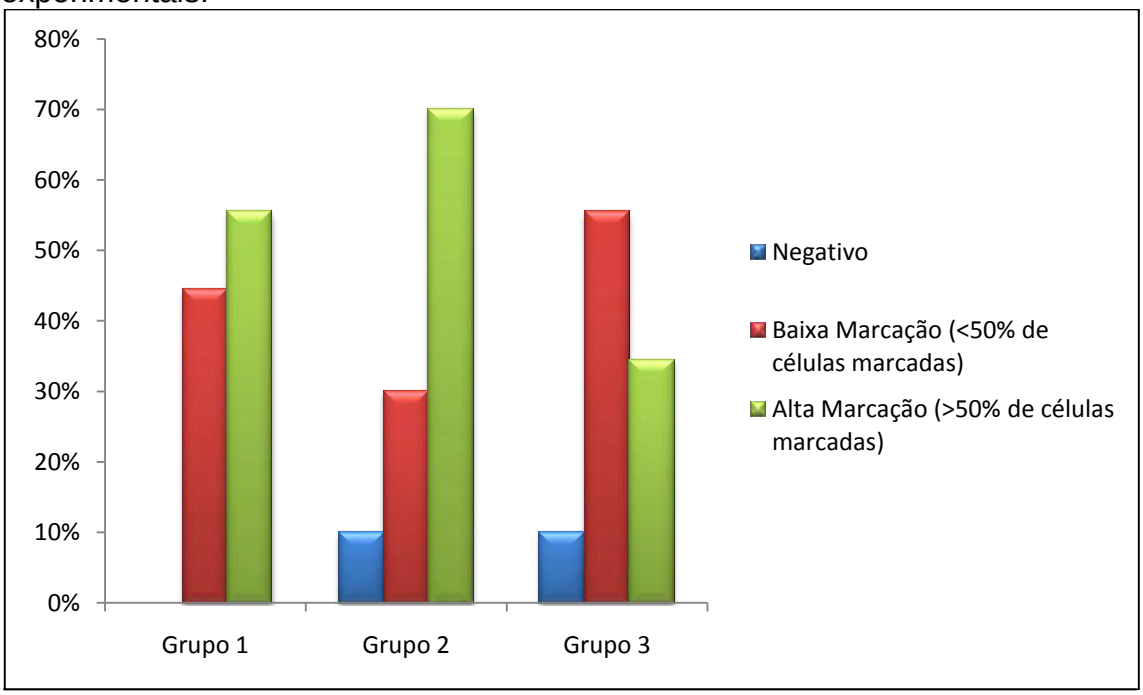


FIGURA 12. Carcinoma mamário simples padrão tubular (Grupo 2). Forte Intensidade de marcação citoplasmática (seta). Imuno-histoquímica, anticorpo primário anti-TGFβ, Advance, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 500x.

A marcação para o anticorpo anti-pSmad2 foi observada no núcleo das células epiteliais neoplásicas e também das células do estroma tumoral e estas marcações foram avaliadas separadamente, de acordo com o percentual de células positivas (figura 13). Com relação à marcação nuclear das células epiteliais tumorais, marcações negativas foram observadas somente nos grupos 2 e 3, compostos exclusivamente por carcinomas. No grupo 3, composto apenas por carcinomas mamários que já apresentavam metástase no momento do diagnóstico houve predomínio de baixas marcações quando comparado aos demais grupos.

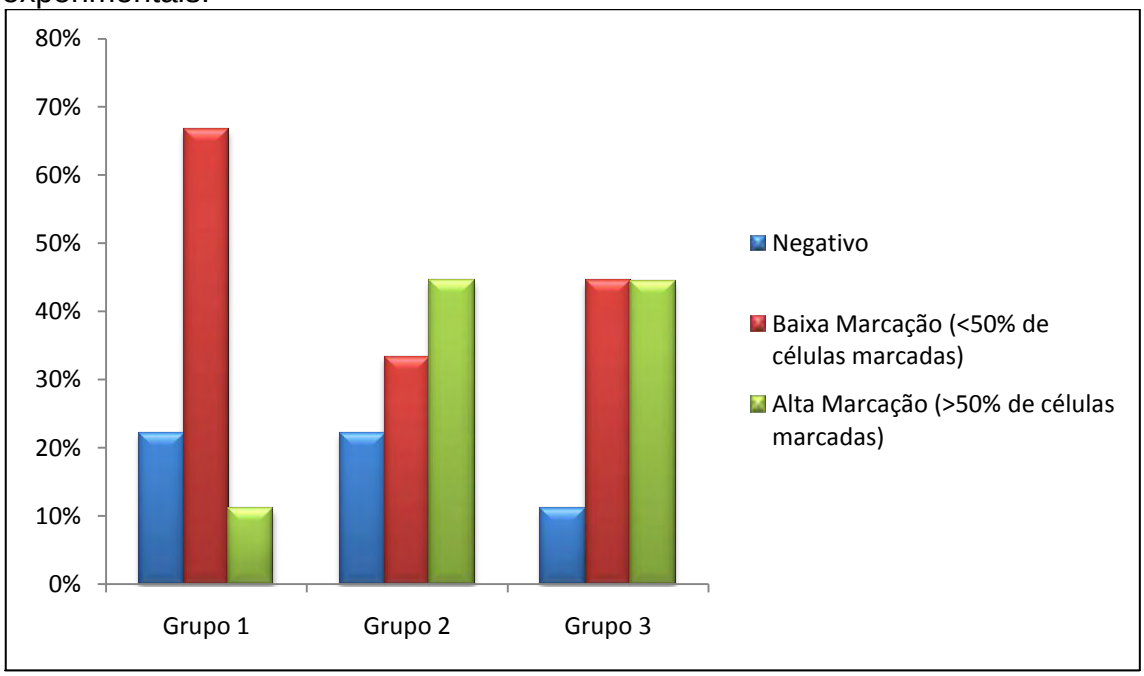
Figura 13. Percentual de amostras negativas, com baixa e alta marcação para o anticorpo anti-pSmad2 nas células epiteliais tumorais nos diferentes grupos experimentais.



Não houve diferença significativa para a positividade de marcação nuclear das células epiteliais tumorais entre os grupos para este anticorpo pelo Teste do Qui-Quadrado ($p<0,05$).

Com relação à marcação no núcleo das células estromais, os resultados estão apresentados na figura 14.

Figura 14. Percentual de amostras negativas, com baixa e alta marcação para o anticorpo anti-pSmad2 no núcleo das células estromais nos diferentes grupos experimentais.



A ausência de marcação foi observada em todos os grupos. A figura 14 mostra maior presença de células marcadas nos grupos 2 e 3. Não houve diferença significativa entre os grupos pelo Teste do Qui-Quadrado ($p<0,05$).

As figuras 15 e 16 mostram os padrões de marcação epitelial e estromal para o anticorpo anti-pSmad2.

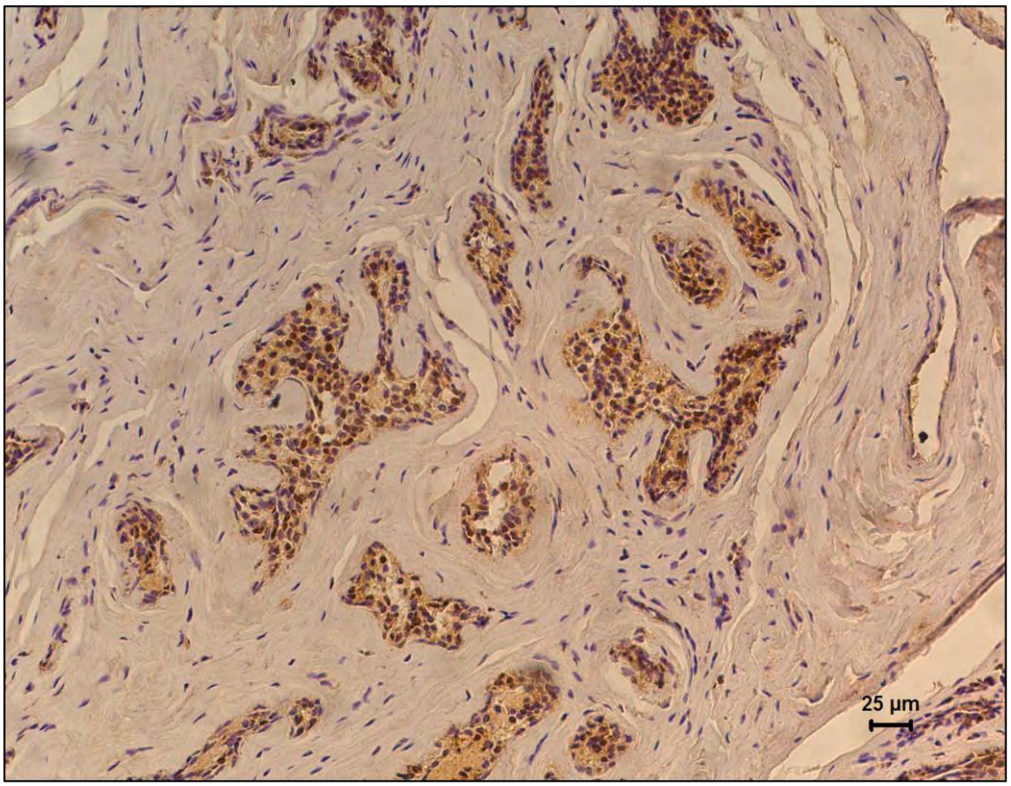


FIGURA 15. Mama normal. Marcação no núcleo das células epiteliais (marrom) e ausência de marcação das células estromais. Imuno-histoquímica, anticorpo primário anti-pSmad2 Advance, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 200x.

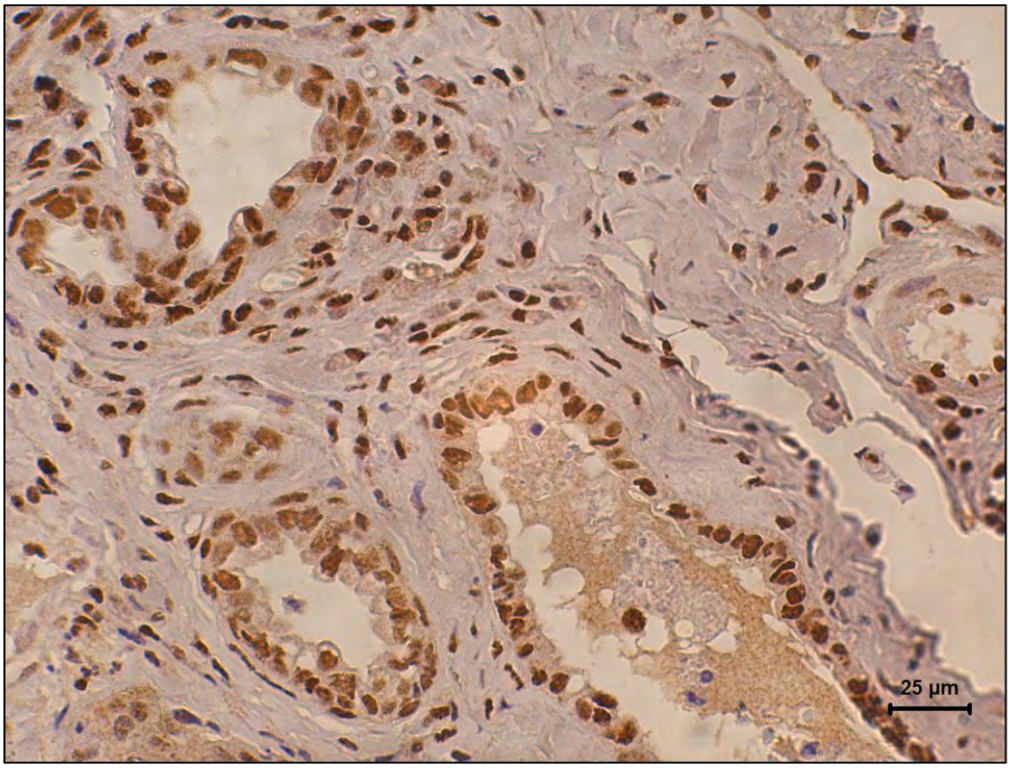
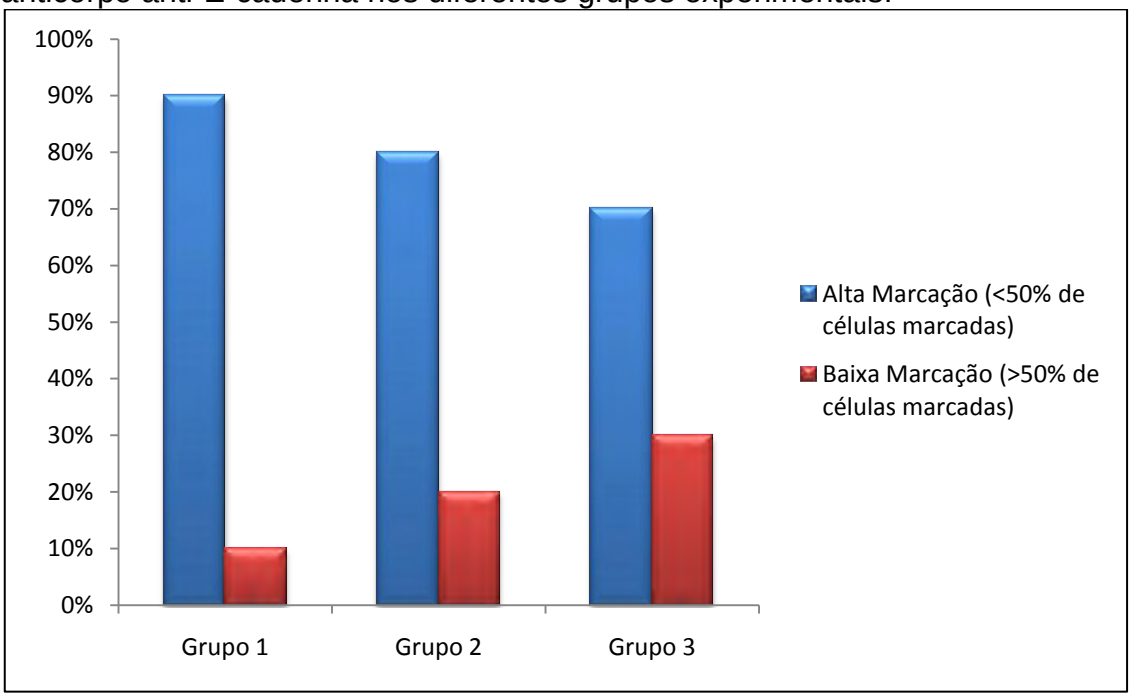


FIGURA 16. Carcinoma mamário simples padrão tubular (Grupo 3). Marcação no núcleo das células epiteliais neoplásicas e das células estromais. Imuno-histoquímica, anticorpo primário anti-pSmad2 Advance, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 400x.

A marcação para o anticorpo anti-E-caderina foi observada na membrana celular e no citoplasma das células epiteliais e foi classificada em percentuais de baixa marcação (<50% de células marcadas) e alta marcação (>50% de células marcadas), ver figuras 18 e 19. Adicionalmente foram encontradas células epiteliais marcadas entremeadas no estroma mamário e também em vasos linfáticos, figuras 20 e 21. Não houve ausência de marcação em nenhum dos casos analisados.

Apesar de não ter havido diferença significativa entre os grupos pelo Teste do Qui-Quadrado ($p<0,05$), pela figura 17 observa-se que os altos percentuais de marcação foram decrescentes do grupo 1 para os demais grupos.

Figura 17. Percentual de amostras com baixa e alta marcações para o anticorpo anti-E-caderina nos diferentes grupos experimentais.



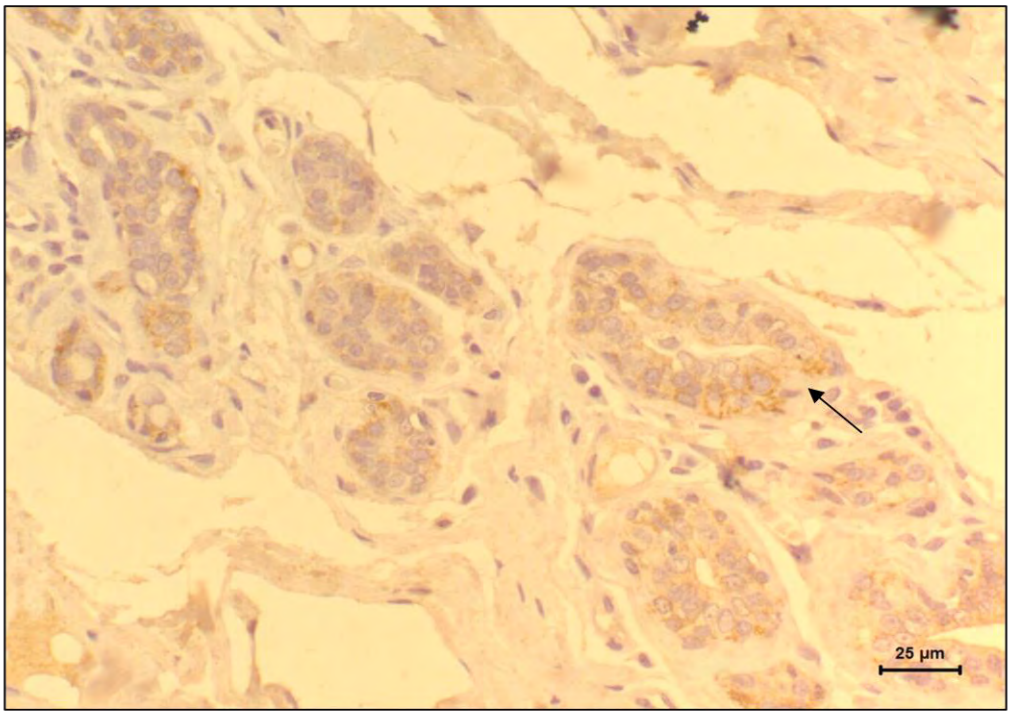


FIGURA 18. Carcinoma mamário complexo (Grupo 2). Baixo percentual de marcação em membrana citoplasmática (seta). Imuno-histoquímica, anticorpo primário anti-E-caderina, Advance, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 400x.

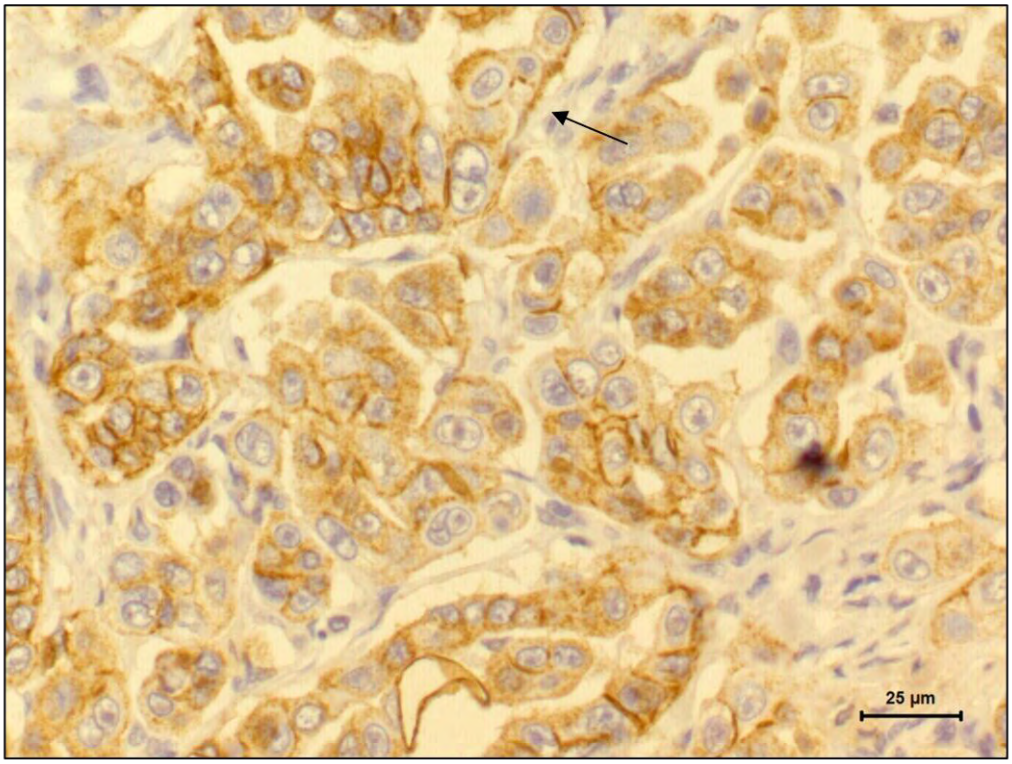


FIGURA 19. Carcinoma mamário simples padrão tubular (Grupo 3). Alto percentual de marcação em membrana citoplasmática (seta). Imuno-histoquímica, anticorpo primário anti-E-caderina, Advance, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 500x.

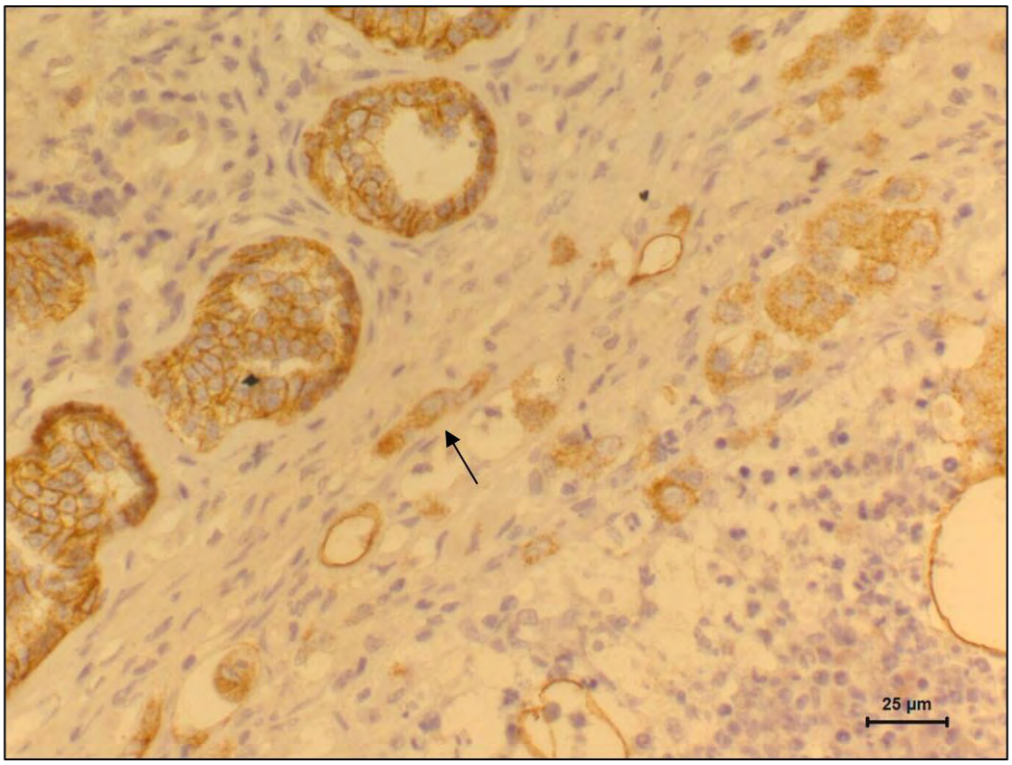


FIGURA 20. Carcinoma mamário simples padrão sólido (Grupo 3). Presença de células marcadas entremeadas no estroma mamário (seta). Imuno-histoquímica, anticorpo primário anti-E-caderina, Advance, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 400x.

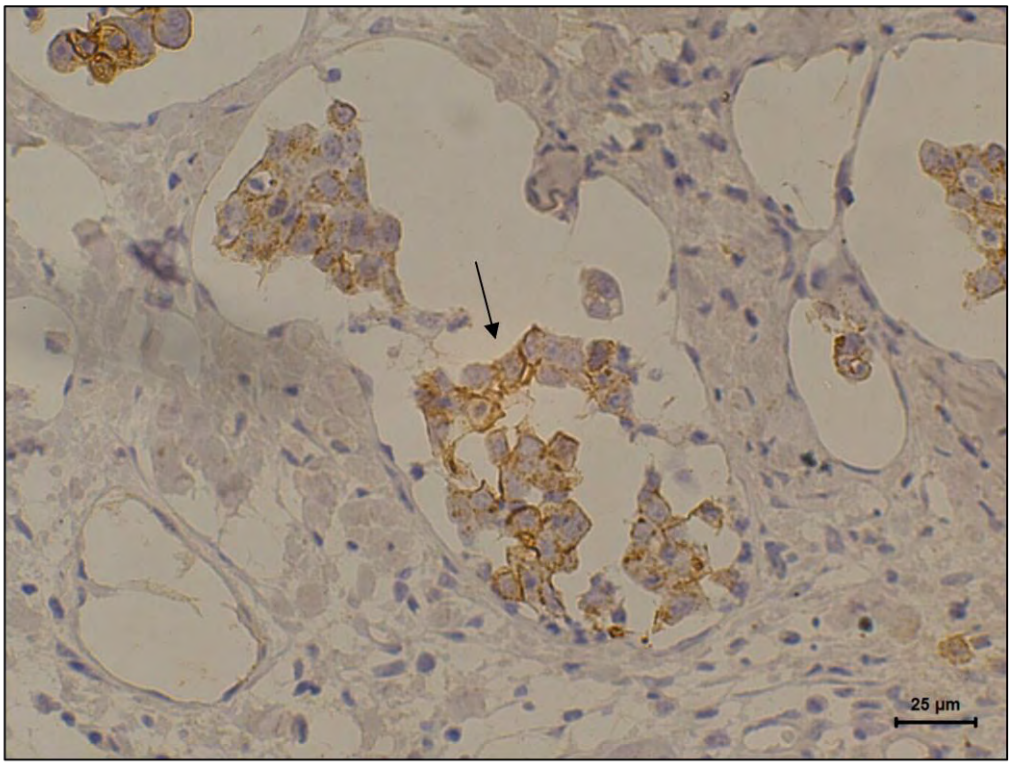


FIGURA 21. Carcinoma mamário simples padrão sólido (Grupo 3). Presença células neoplásicas marcadas para E-caderina em vaso linfático (seta). Imuno-histoquímica, anticorpo primário anti-E-caderina, Advance, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 400x.

A marcação para o anticorpo anti-Vimentina foi observada no citoplasma das células e apenas foram consideradas positivas as células epiteliais neoplásicas marcadas, desconsiderando a marcação das células basais, ver figuras 19 a 22. As marcações foram classificadas em negativa e positiva.

Na avaliação deste anticorpo houve diferença estatística entre neoplasias mamárias benignas e malignas pelo Teste Exato de Fisher ($p<0,05$). Não houve diferença significativa entre as neoplasias mamárias malignas com e sem metástase.

Os resultados obtidos da leitura do anticorpo Vimentina estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Percentual de amostras positivas e negativas para a marcação imunoistoquímica com Vimentina.

Vimentina	Adenomas mamários (G1)	Carcinomas sem metástase (G2)	Carcinomas com metástase (G3)
Negativa	$71,5^{a}$	0^{b}	10^{b}
Positiva	$28,5^{a}$	100^{b}	90^{b}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha significam diferença estatística (Teste Exato de Fisher, $p<0,05$)

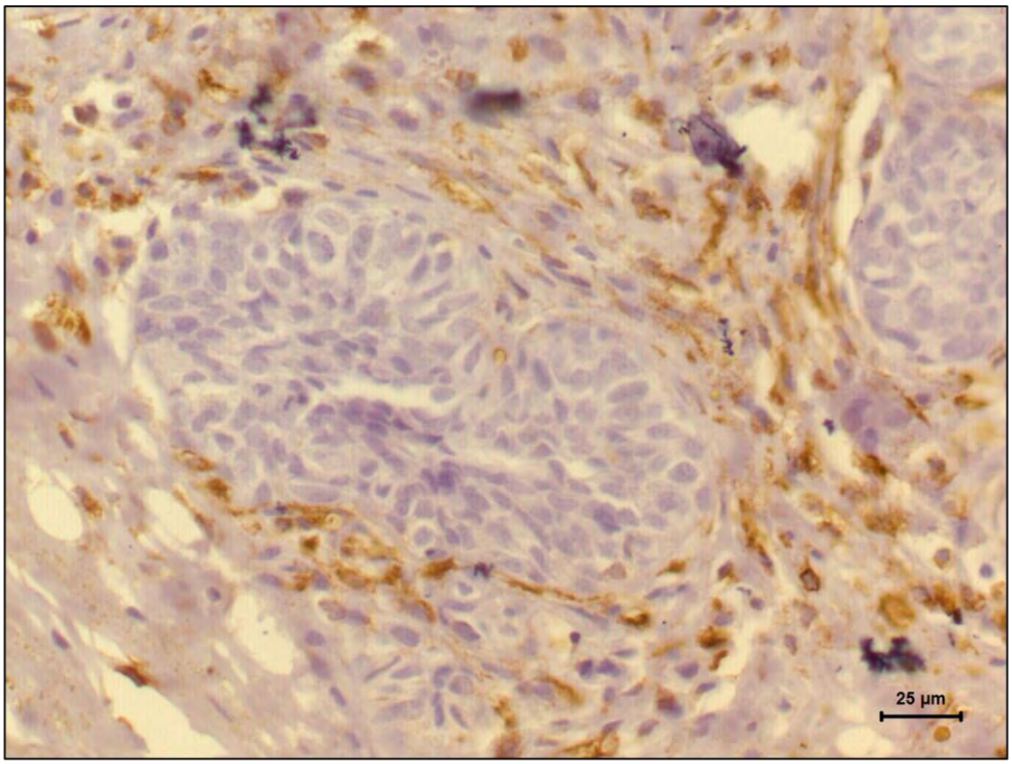


FIGURA 22. Adenoma mamário (Grupo 1). Ausência de marcação citoplasmática nas células epiteliais neoplásicas. Imuno-histoquímica, anticorpo primário anti-Vimentina, Advance, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 400x.

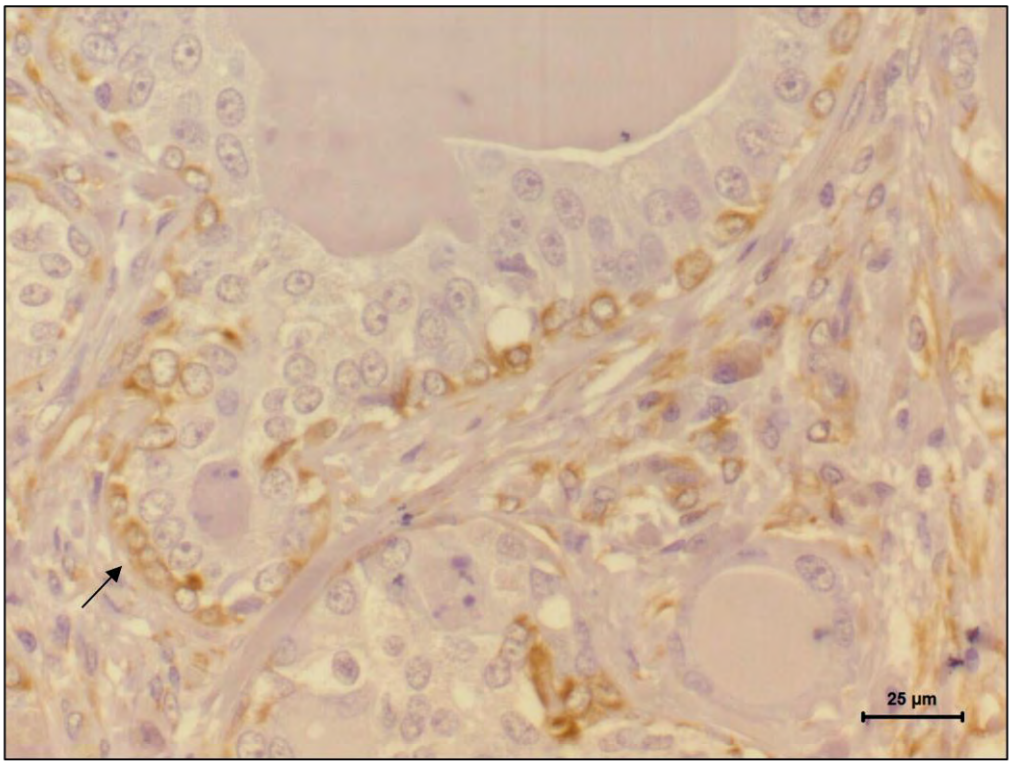


FIGURA 23. Carcinoma mamário complexo (Grupo 2). Presença de marcação em células basais e ausência de marcação nas células epiteliais (seta). Imuno-histoquímica, anticorpo primário anti-Vimentina, Advance, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 500x.

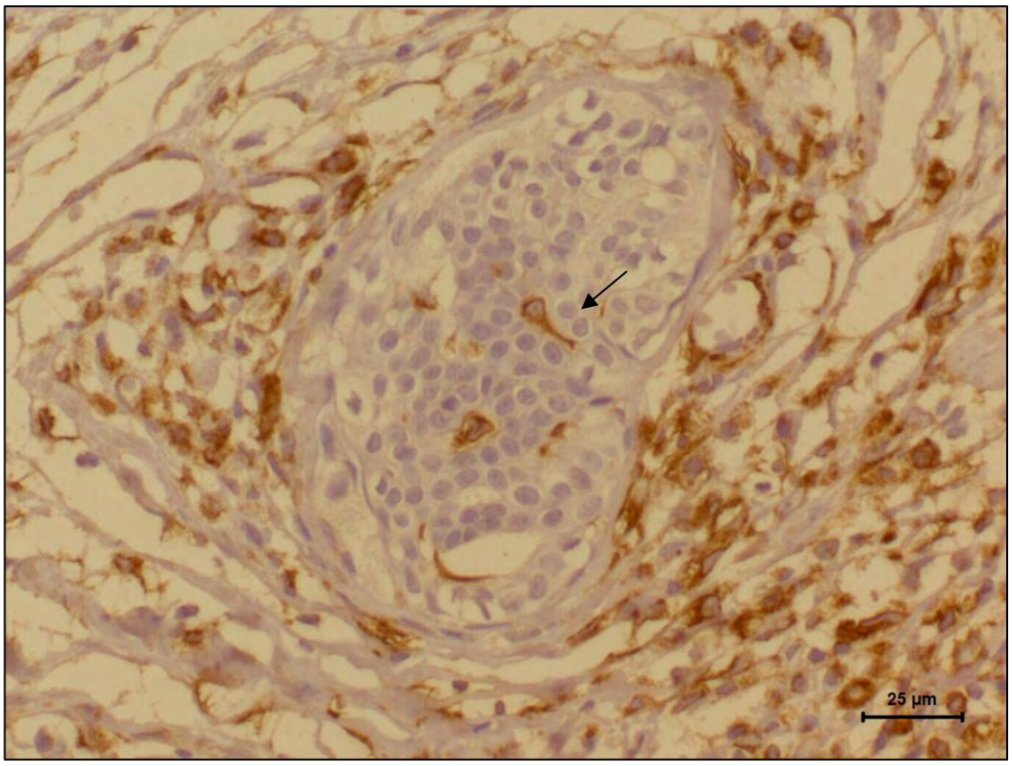


FIGURA 24. Carcinoma mamário simples padrão sólido (Grupo 3). Marcação citoplasmática em células epiteliais neoplásicas (seta). Imuno-histoquímica, anticorpo primário anti-Vimentina, Advance, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 500x.

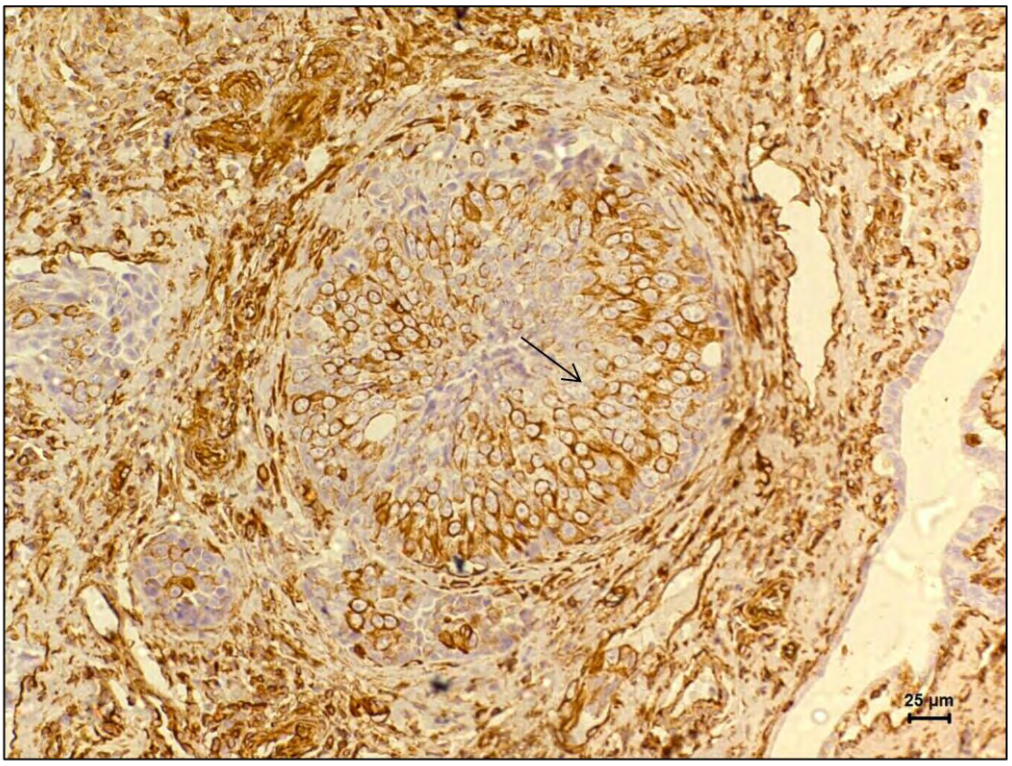


FIGURA 25 Carcinoma mamário simples padrão sólido (Grupo 3). Intensa marcação no citoplasma das células epiteliais neoplásicas (seta). Imuno-histoquímica, anticorpo primário anti-Vimentina, Advance, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Aumento de 200x.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo observou-se que a faixa etária de 7 a 12 anos foi a mais acometida pelas neoplasias mamárias, o que concorda com LANA et al. (2007) e DE NARDI et al. (2008), que apontam esta mesma faixa etária como a de maior incidência de neoplasias mamárias em cadelas.

No grupo composto por neoplasias mamárias benignas, houve um predomínio de animais mais jovens com média de 8,1 anos. Esta observação concorda com o trabalho de Sorenmo et al. (2009) no qual houve uma predominância de animais mais velhos com neoplasias mamárias malignas quando comparadas às benignas. Da mesma forma, entre as mulheres, há uma alta predominância de tumores benignos entre as mulheres jovens (MEISNER et al., 2008). No entanto, em ambas as espécies, neoplasias mamárias malignas podem ocorrer entre as fêmeas jovens, e estas normalmente são mais agressivas e de pior prognóstico (CHUNG et al., 1996; DE NARDI et al., 2008).

Com relação às raças dos animais que compuseram o presente trabalho, a maioria eram animais SRD, seguida de Poodle e Teckel (*Daschshund*) e outras em menor quantidade. Este trabalho foi desenvolvido em um hospital escola que atende proprietários com baixo poder aquisitivo e que possui uma elevada casuística de animais SRD, o que justifica o alto percentual destes animais nos grupos, além de haver predomínio dos cães mestiços em nosso país como um todo (ZUCCARI, 1999; FERREIRA & CASSALI, 2003).

No entanto, Sorenmo (2003) relata que algumas raças possuem um risco mais elevado para o desenvolvimento de neoplasias mamárias, citando inclusive Teckel e Poodle como raças predispostas, embora, segundo o próprio autor, as raças possam variar de acordo com o estudo e a região geográfica. Além disto, o mesmo autor sugere que o fato de certas raças serem mais predispostas pode revelar um possível envolvimento genético na etiologia da neoplasia mamária em cadelas. Assim, um dado importante deste trabalho é que dois animais do grupo 3 possuíam parentesco de mãe e filha (ambas da raça Teckel), pertenciam à mesma proprietária e estavam submetidas às mesmas condições nutricionais e ambientais, o que também pode sugerir um componente hereditário no aparecimento da neoplasia mamária.

Quanto ao tipo histológico, excluindo o grupo 1 que foi composto apenas por adenomas mamários, no grupo 2, composto de neoplasias malignas sem metástase, haviam cinco carcinomas mamários simples (com suas subdivisões) e cinco carcinomas complexos. No grupo 3, composto de neoplasias mamárias com metástase, o carcinoma simples foi o mais freqüente, sendo que apenas um animal foi diagnosticado com carcinoma complexo. Se forem consideradas as subdivisões do carcinoma simples, a mais comum foi o carcinoma simples padrão túbulo-papilífero. Sorenmo (2003) relata que os carcinomas mamários tubulares são os mais comuns nas cadelas. Esta referência difere de nossos dados, uma vez que o carcinoma túbulo-papilífero foi o mais comum. No entanto, poucos trabalhos são encontrados na literatura com relação à predominância de cada um dos tipos histológicos de neoplasias mamárias dentro da classificação da OMS.

Em uma visão geral, podemos notar que a idade para o aparecimento das neoplasias mamárias em cadelas já está sedimentada e assim, é necessário que trabalhos de prevenção sejam feitos em idades inferiores a estas, com estimulação da OSH (ovariossalpingohisterectomia) precoce e atenção aos fatores ambientais e nutricionais aos quais estes animais são expostos, no sentido de diminuir o número de cadelas acometidas por neoplasias mamárias. Além destas observações, vê-se que a classificação da OMS para as neoplasias mamárias de cadelas, apesar de existir há alguns anos, ainda é pouco utilizada, dando lugar muitas vezes à classificação utilizada para mulheres.

No grupo 1, dois animais tiveram diagnóstico de carcinoma algum tempo depois da ressecção de um adenoma mamário e um deles veio a óbito por evolução da recidiva neoplásica. Este fato concorda com o trabalho de Sorenmo et al. (2009), no qual estes autores sugerem que neoplasias benignas podem evoluir para neoplasias malignas e que tumores malignos podem ser o estágio final de uma evolução histológica. Estas informações nos chamam a atenção para um maior cuidado com as neoplasias benignas, que muitas vezes são subestimadas pelos clínicos e oncologistas veterinários.

Com relação à sobrevida média dos grupos, observa-se que a sobrevida dos animais dos grupos compostos por neoplasias malignas foi menor que a dos animais do grupo de neoplasias benignas. Estes dados concordam com a

literatura que cita que animais com neoplasias mamárias malignas possuem uma sobrevida mais curta do que aqueles com neoplasias mamárias benignas (PEREZ-ALENZA et al., 2000). Além disto, a sobrevida dos animais com metástase é menor quando comparada àqueles sem metástase, e de fato, a metástase é uma característica que influencia diretamente no prognóstico da paciente e no seu tempo de sobrevida (KHANNA & HUNTER, 2005; HOLLIER et al., 2009).

Embora a literatura cite que a sobrevida dos animais com neoplasias mamárias malignas em 2 anos esteja entre 25% a 40%, o presente estudo não pôde apresentar dados fiéis a estes pois o período de acompanhamento médio dos animais foi de 17 meses (SORENMO, 2003). Além disto, este trabalho resultou da casuística do HV da FCAV, o que fez com que os animais entrassem em datas diferentes na pesquisa. No entanto, nosso grupo de pesquisa, em trabalhos anteriores, encontrou resultados semelhantes aos da literatura (HATAKA, 2004).

A imunomarcação para p53 em neoplasias mamárias de cadelas já foi demonstrada por diversos pesquisadores (GAMBLIN et al., 1997; LEE et al., 2004; BERTAGNOLLI et al., 2009) sendo sempre identificada em altas quantidades nas neoplasias malignas. Neste trabalho, concordando com a literatura, apesar de não haver diferença estatística entre os grupos, sua expressão também foi maior nos grupos compostos por animais com neoplasias malignas.

No grupo das neoplasias benignas, três animais apresentaram mais de 50% de células positivas para p53. Destes, dois animais já haviam realizado mastectomias prévias, sem diagnóstico histopatológico, sendo as neoplasias envolvidas neste estudo consideradas como recidivas. A terceira cadela estava em sua primeira cirurgia, no entanto, pelo seu monitoramento, pudemos diagnosticar também uma recidiva 4 meses após esta mastectomia, com laudo histopatológico de carcinoma.

Bertagnolli et al. (2009) estudando neoplasias mamárias benignas mistas sugeriram que a presença de p53 mutante possa ser um evento molecular precoce na tumorigênese ou que pode indicar um potencial para a transformação maligna destes tumores. Rohan et al. (1998) concluíram que a marcação para p53 em neoplasias mamárias benignas humanas foi associada

com aumento do risco do desenvolvimento de câncer de mama no futuro. As duas primeiras cadelas citadas estão bem e em acompanhamento, sem sinal de recidivas. A terceira cadela concluiu o tratamento quimioterápico há 1 mês e também está em acompanhamento.

A cadela citada no início da discussão que veio a óbito em decorrência de uma recidiva agressiva do tumor apresentou baixa, porém positiva marcação para p53. Juntos, estes fatos podem nos levar a sugerir que a marcação positiva para p53 em neoplasias benignas possa realmente ser um indício de que aquele animal merece ser monitorado com relação ao aparecimento de recidivas.

Lee et al. (2004) compararam a mutação gênica com a expressão protéica de p53 nas neoplasias mamárias malignas caninas e concluíram que ambos são bons fatores prognósticos.

A marcação para p63 foi encontrada no núcleo das células basais do epitélio glandular, de acordo com Di Como et al. (2002) e Ribeiro-Silva et al. (2003). A diminuição da intensidade e da continuidade de marcação das neoplasias benignas para as malignas, e dentre estas, das sem para as com metástase pode indicar destruição da camada basal conforme a progressão da lesão. Ribeiro-Silva et al. (2003) e Stefanou et al. (2004) observaram baixos percentuais de marcação para p63 nas neoplasias mamárias malignas humanas e concluíram que a expressão de p63 pode ser usada como um diferencial de lesões *in situ* para invasivas. Resultados semelhantes foram encontrados por Bertagnolli et al. (2009) em um estudo com neoplasias mamárias mistas de cadelas. Ademais estes achados suportam a hipótese de que a camada mioepitelial normal serve como “supressora tumoral natural”, já que estas células se tornam mais escassas conforme o tumor se torna mais invasivo (POLYAK & HU, 2005).

Guo et al. (2009) utilizando modelos experimentais em ratos demonstraram que a isoforma com terminal N TA da p63 é essencial para indução da senescência celular e que a sua deficiência aumenta a proliferação e permite a oncogênese *in vivo.* Como no presente estudo as neoplasias mamárias malignas apresentaram diminuição da expressão de p63 e o anticorpo utilizado marca as duas isoformas da proteína (TA e ΔN), pode-se

sugerir que as outras isoformas da p63 também podem ter participação na supressão tumoral.

Recentemente, Adorno et al. (2009), em um estudo utilizando linhagens celulares específicas demonstraram que em presença de p53 mutante as células neoplásicas mamárias humanas adquiriram a habilidade de migrar, invadir e metastatizar em ensaios *in vivo* e *in vitro*. Assim, comparando as afirmações de que a p53 e a p63 são indutoras de apoptose em resposta à danos no DNA com os dados deste trabalho, temos que estes dois mecanismos podem estar contribuindo para a progressão tumoral, dentre outros meios, inibindo a apoptose e permitindo a migração celular.

A transição de células epiteliais em mesenquimais tem sido bastante estudada nos anos recentes em neoplasias, inclusive nas mamárias (TOMASKOVIC-CROOK et al., 2009; MICALIZZI et al., 2010; TAYLOR et al, 2010). Nesta transição as células perdem as suas propriedades juncionais com as células adjacentes e adquirem fenótipo mesenquimal, que possibilita a migração e a metástase (MICALLIZI et al., 2010).

Na literatura estudada, o TGFβ aparece como um potente indutor desta transição. Neste trabalho foi avaliada a expressão imuno-histoquímica deste fator de crescimento e observou-se que o percentual de células marcadas não variou entre os grupos. A variação observada foi com relação à intensidade de marcação nas células e apesar de não ter havido diferença significativa entre os grupos, houve uma maior concentração de amostras com menor intensidade entre as neoplasias malignas.

Em geral, o TGFβ possui um efeito inibitório sobre o crescimento neoplásico nos estágios precoces da carcinogênese, no entanto, ele muda para uma função pro-oncogênica durante a progressão tumoral (MASSAGUÉ, 2008). Bierie & Moses (2009) afirmaram que o ganho ou a perda da sinalização do TGFβ nas neoplasias malignas pode promover metástase. Klopfleisch et al. (2009) encontraram diminuição da expressão de TGFβ tanto em adenomas como em carcinomas mamários caninos e sugeriram que esta diminuição pode exercer efeito estimulatório para o crescimento celular nas neoplasias mais avançadas, sendo associada ao aumento da atividade proliferativa destas células. Neste trabalho, considerando-se a intensidade de marcação das células, pode-se observar que houve também diminuição da expressão do

TGFβ nas neoplasias malignas e, dentre estas, das sem metástase para as com metástase, concordando com os autores acima citados.

Kim et al. (2007) demonstraram que o TGFβ1 é capaz de induzir EMT em células epiteliais alveolares *in vitro* em uma maneira concentração-dependente, com o início da transição ainda em baixas concentrações deste fator de crescimento. O anticorpo utilizado para marcar o TGFβ neste trabalho, marca seus três ligantes (TGFβ1, 2 e 3), desta forma, mesmo tendo encontrado diminuição da expressão do TGFβ nas células, ela pode não necessariamente se referir ao TGFβ1. Ademais, de acordo com este autor, a transição pode ser iniciada ainda em baixas concentrações do marcador o que pode sugerir que esta perda na expressão do TGFβ pode não ter influenciado em seu potencial de induzir a EMT.

O TGFβ possui duas vias de ação, a via canônica e a não-canônica. Na via canônica, ele fosforila os Smads 2 e 3 que vão ao núcleo e agem como fatores transcricionais. Desta maneira, a atividade dos Smads reflete a atividade do TGFβ (SHI & MASSAGUÉ, 2003). No presente estudo, os menores percentuais de marcação para o pSmad2 foram encontradas no grupo de carcinomas com metástases, no qual também foram encontradas as menores intensidades de marcação para o TGFβ, o que revela uma concordância entre a atividade do pSmad2 e do TGFβ e corrobora os achados de Klopfleisch et al. (2009), já citados anteriormente.

Ganapathy et al. (2010) avaliando carcinomas de células escamosas da pele de humanos, observaram que a diminuição da expressão de pSmad2 no núcleo das células neoplásicas correlacionou-se com a perda da diferenciação e sugeriram associação deste fenótipo com a diminuição da atividade do TGFβ e o aparecimento de metástases. Apesar de não ter havido diferença estatística entre os grupos, houve uma tendência de que as menores marcações no núcleo das células epiteliais neoplásicas ficassem concentradas no grupo 3, composto apenas por carcinomas metastáticos, concordando com estes autores.

Liapis et al. (2007) investigaram o padrão de expressão do pSmad2 em carcinomas mamários de mulheres e sua correlação com marcadores de proliferação e invasão previamente estabelecidos. Os autores observaram que além das células epiteliais neoplásicas foi marcado também o núcleo das

células do estroma tumoral e sugeriram que o pSmad2 pode exercer um papel duplo de acordo com sua distribuição. Ainda de acordo com estes autores, a localização no núcleo das células epiteliais revelaria um fenótipo menos agressivo, enquanto que a localização estromal foi associada com maior potencial invasivo destas neoplasias.

Com relação às marcações estromais, nossos dados também concordam com Liapis et al. (2007), uma vez que os maiores percentuais de marcação em células estromais foram igualmente observados nos grupos formados por neoplasias mamárias malignas. Apesar da falta de diferença estatística entre os grupos observa-se que baixas marcações epiteliais acompanham marcações estromais mais elevadas e tendem a se relacionar com fenótipos mais agressivos.

Um segundo passo importante na transição epitelial-mesenquimal é a perda das moléculas de adesão entre as células epiteliais como a E-caderina, e a aquisição de Vimentina (MICALIZZI et al., 2010). No presente estudo, foram avaliadas as expressões de E-caderina e Vimentina nas neoplasias mamárias.

Com relação à E-caderina, mesmo não tendo havido diferença significativa entre os grupos, houve diminuição progressiva na expressão desta proteína das neoplasias benignas para as malignas e dentre estas, das sem para as com metástase. Estes dados concordam com Onder et al. (2008) no sentido de que esta redução em sua expressão protéica é frequentemente observada durante a progressão das neoplasias mamárias e pode estar associada com a disseminação metastática, já que promove a desagregação das células neoplásicas. A ausência de diferença significativa entre os grupos pode se justificar pelo reduzido número amostral deste trabalho.

Restucci et al. (1997) e Matos et al. (2006), demonstraram que a expressão de e-caderina estava relacionada ao tipo histológico das neoplasias mamárias de cadelas, encontrando baixas expressões desta proteína entre os carcinomas sólidos e comparativamente alta entre os túbulo-papilíferos. Em nosso estudo, dos quatro carcinomas sólidos apenas um apresentou baixas marcações para e-caderina e dentre os cinco túbulo-papilíferos, dois apresentaram expressões reduzidas para a proteína, mostrando uma possível inversão dos resultados. Entretanto, o baixo número amostral neste trabalho

não nos permite inferir qual tipo histológico está mais associado à perda ou redução da expressão de e-caderina.

Knudsen & Wheelock (2005), comparando diferentes tipos histológicos do carcinoma de mama de mulheres, relataram que os carcinomas ductais invasivos, apesar de agressivos, expressam e-caderina. Esta expressão pode ser reduzida ou sua localização pode ser anormal na célula, fora dos sítios de adesão às células vizinhas, como as marcações citoplasmáticas encontradas neste trabalho. Estes autores referem que não só a diminuição da expressão, mas também um padrão heterogêneo de marcação para esta proteína, podem ser indicadores de prognóstico desfavorável.

A imunomarcação para vimentina foi avaliada nas células epiteliais neoplásicas da glândula mamária e houve diferença significativa para positividade destas células das neoplasias benignas para as malignas. Isto mostra que a aquisição de um fenótipo mesenquimal possa ser realmente um passo importante no desenvolvimento de neoplasias mais agressivas com capacidade para a formação de metástases. Sarrió et al. (2008) sugerem que a ativação das vias de EMT com a diminuição da expressão protéica de e-caderina e expressão de vimentina, se correlacione com o grau histológico do tumor, sendo mais frequente nas neoplasias mamárias mais agressivas como as do subtipo basal em mulheres, o que se assemelha aos resultados deste trabalho. Além destes, pode-se sugerir que a vimentina pode ser um marcador diagnóstico, diferenciando os carcinomas dos adenomas mamários de cadelas e também prognóstico, já que neoplasias sob EMT possuem comportamento mais agressivo.

Foram encontradas células marcadas para E-caderina no estroma tumoral e também em êmbolos neoplásicos nos vasos linfáticos. Estes achados se equivalem ao que ocorre na migração coletiva, definida pela migração de um grupo de células sem a perda de suas proteínas de adesão intercelulares, como a e-caderina. Como a EMT completa geralmente resulta no movimento de células sozinhas, assim, a migração coletiva só pode ser observada na ausência de EMT ou quando esta é incompleta (RORTH, 2009).

Diante do exposto, verifica-se que a EMT parece estar envolvida na evolução e na progressão das neoplasias mamárias caninas, uma vez que neoplasias mais agressivas apresentaram menores expressões de e-caderina

e foram, em sua maioria, positivas para vimentina. O TGFβ pode ser realmente um indutor de EMT nestas células e que, além da EMT, a migração coletiva também parece ocorrer simultaneamente nas neoplasias mamárias durante a invasão e a metástase.

Outros autores têm estudado o papel da EMT nas neoplasias mamárias humanas (TRIMBOLI et al., 2008; SARRIÓ et al., 2008), no entanto, nosso trabalho é pioneiro no estudo do papel desta transição nas neoplasias mamárias de cadelas.

7. CONCLUSÕES

Diante dos resultados providos pelo presente trabalho, pode-se concluir que a expressão da p53, apesar de ter seu papel estabelecido em neoplasias malignas, deve ser também investigada no que diz respeito ao comportamento das neoplasias mamárias benignas de cadelas.

A p63 é um marcador específico também para as células mioepiteliais mamárias caninas, uma vez que não houve marcação em outros tipos celulares da mama de cadelas. A presença de uma camada de células basais intacta pode ser indicativa de melhor prognóstico, já que a mesma parece estar diminuída ou ausente nas neoplasias mamárias malignas com metástase.

Existe a evidência de que a EMT e a migração coletiva estejam envolvidas na disseminação metástatica das neoplasias mamárias caninas e que a expressão de vimentina pode ser um indicador de mau prognóstico nos carcinomas espontâneos de cadelas.

A presença de pSmad2 no núcleo das células epiteliais tumorais pode refletir a atividade do TGFβ nestas neoplasias e há uma tendência de que a localização da marcação do pSmad2 na neoplasia seja correlacionada com seu potencial invasivo.

A EMT pode estar sendo induzida pelo TGFβ mesmo em baixas concentrações, no entanto, mais estudos são necessários nesta área para firmar resultados que comprovem o papel de cada um destes marcadores na progressão dos carcinomas mamários de cadelas.

De uma maneira geral, baixas expressões de p63, e-caderina TGFβ e pSmad2 no núcleo das células epiteliais e elevadas expressões de p53 mutante e vimentina (no citoplasma das células epiteliais tumorais) parecem estar relacionadas à prognósticos desfavoráveis, uma vez que estas foram mais freqüentes nos grupos compostos por carcinomas. No entanto, apesar da tendência do arranjo destes marcadores desta forma, estudos com um maior número amostral devem ser realizados para comprovar a relação dos mesmos com o prognóstico das neoplasias mamárias de cadelas.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho abre as portas para uma nova linha de pesquisa em oncologia veterinária, já que a EMT é uma área recente que vem sendo estudada na medicina humana.

A partir daqui pretendemos realizar estudos com um número maior de animais e também investigar outros marcadores envolvidos no processo de EMT, além da aplicação de novas técnicas diagnósticas como a PCR, o Western blot, dentre outros. Assim, poderemos ter maiores informações a respeito da progressão e da formação das metástases nas neoplasias mamárias de cadelas.

9. REFERÊNCIAS

ADORNO, M., CORDENONSI, M., MONTAGNER, M., DUPONT, S., WONG, C., HANN, B., et al. A mutant-p53/Smad Complex Opposes p63 to Empower TGFβ-induced metastasis. *Cell*, v. 137, p. 87-98, 2009.

ARAKI, S.; EITEL, J. A.; BATUELLO, C. N.; BIJANGI-VISHEHSARAEI, K.; XIAN-JIN, X.; DANIELPOUR, D.; et al. TGFβ-1-induced expression of human Mdm2 correlates with late-stage metastatic breast cancer. *The Journal of Clinical Investigation,* v. 120, n. 1, 2010.

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

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

BERNABEU, C.; LOPEZ-NOVOA, J. M.; QUINTANILLA, M. The emerging role of TGF-β superfamily coreceptors in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta,* doi: 10.1016/j.bbadis.2009.07.003, 2009.

BERTAGNOLLI, A. C.; CASSALI, G. D.; GENELHU, M. C. L. S.; COSTA, F. A.; OLIVEIRA, J. F. C.; GONÇALVES, P. B. D. Immunohistochemical expression of p63 and ΔNp63 in mixed tumors of canine mammary glands and its relation with p53 expression. *Veterinary Pathology,* v. 46, p. 407-415, 2009.

BIERIE, B.; MOSES, H. L. Gain or loss of TGFβ signaling in mammary carcinoma cells can promote metastasis. *Cell Cycle,* v. 8, n. 20, p. 3319-3327, 2009.

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

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

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

CHUNG, M.; CHANG, H. R.; BLAND, K. I.; WANEBO, H. J. Younger women with breast carcinoma have a poorer prognosis than older women. *Cancer,* v. 77, n. 1, p. 97-103, 1996.

COLLAVIN, L.; LUNARDI, A.; DEL SAL, G. p53-family proteins and their regulators: hubs and spokes in tumor suppression. *Cell death and differentiation,* v. 17, p. 901-911, 2010.

CREIGHTON, C. J.; CHANG, J. C.; ROSEN, J. M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in tumor-initiating cells and its clinical implications in breast

cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia,* v. 15, n. 2, p. 253-260, 2010.

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

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; ROCHA, N. S.; FERNANDES, S. C. Neoplasias Mamárias. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. (Eds.) *Oncologia em Cães e Gatos,* 1ª Edição. São Paulo: Roca, 2008, cap. 25, p. 372-383.

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

Di COMO, C. J.; URIST, M. J.; BABAYAN, I.; DROBNJAK, M.; HEDVAT, C. V.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; et al. p63 expression profiles in human and normal tissues. *Clinical Cancer Research***,** v. 8, p. 494-501, 2002.

FERREIRA, E.; CASSALI, G. D. Levantamento dos tumores mamários em cadelas no hospital veterinário da EV/UFMG. In: XI Encontro Nacional de Patologia Veterinária – Botucatu – SP, 2003. Anais, p. 258.

FLORES, E. R. The roles of p63 in cancer. *Cell Cycle,* v. 6, n. 3, p. 300-304, 2007.

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

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

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

GAMBLIN, R. M.; SAGARTZ, J. E.; COUTO, C. G. Overexpression of p53 tumor suppression protein in spontaneously arising neoplasms of dogs. *American Journal of Veterinary Research,* v. 58, n. 8, p. 857-863, 1997.

GANAPATHY, A.; PATERSON, I. C.; PRIME, S. S.; EVESON, J. W.; PRING, M.; PRICE, N.; THREADGOLD, S. P.; DAVIES, M. TGFβ inhibits metastasis in late stage human squamous cell carcinoma of the skin by a mechanism that does not involve Id1. *Cancer Letters,* v. 198, p. 107-118, 2010.

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

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

GOODSELL, D. S. The molecular perspective: p53 tumor suppressor. *The Oncologist,* v. 4, n. 2, p. 138-139, 1999.

GUO, X.; KEYES, W. M.; PAPAZOGLU, C.; ZUBER, J.; LI, W.; LOWE, S. W.; et al. Tap63 induces senescence and suppresses tumorigenesis in vivo. *Nature cell biology,* v. 11, n. 12, p. 1451-1457, 2009.

HANAHAN, D., WEINBERG, R. A., The hallmarks of cancer. *Cell,* v. 100, p. 57-70, 2000.

HATAKA, A. Citologia aspirativa com agulha fina e histopatologia: valor e significado para o diagnóstico e prognóstico do câncer de mama de cadelas. Botucatu, 2004, 90p., Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

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

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

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

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. Estimativa 2010 – Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf. Acesso em: 9 de março de 2010.

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

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

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

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

KLOPFLEISCH, R., SCHÜTZE, M.; GRUBER, A. D. Downregulation of transforming growth factor β (TGFβ) and latent TGFβ binding protein (LTBP)-4 expression in late stage canine mammary tumours. *The Veterinary Journal (2009),* doi: 10.1016/j.tvjl.2009.09.014

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

KNUDSEN, K. A.; WHEELOCK, M. J. Cadherins and the mammary gland. *Journal of cellular biochemistry,* v. 95, p. 488-496, 2005.

KOKKINOS, M. I.; WAFAI, R.; WONG, M. K.; NEWGREEN, D. F.; THOMPSON, E. W.; WALTHAM, M. Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer – observations *in vitro* and *in vivo. Cells Tissues Organs,* v. 185, p. 191-203, 2007.

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

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,* v. 5, n. 1, p. 63-69, 2004.

LEVINE, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell,* v. 88, n. 3, p. 323-331, 1997.

LEVRERO, M.; DE LAURENZI, V.; CONSTANZO, A.; SABATINI, S.; GONG, J.; WANG, J. Y. J.; et al. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *Journal of Cell Science,* v. 113, n. 10, p. 1661-1670, 2000.

LIAPIS, G.; MYLONA, E.; ALEXANDROU, P.; GIANNOPOULOU, I.; NIKOLAOU, I.; MARKAKI, S.; KERAMOPOULOS, A.; NAKOPOULOU, L. Effect of the different phosphorylated Smad2 protein localizations on the invasive breast carcinoma phenotype. *APMIS,* v. 115, p. 104-114, 2007.

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

MANI, S. A.; GUO, W.; LIAO, M. J.; EATON, E. N.; AYYANAN, A.; ZHOU, A. Y.; et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell,* v. 133, p. 704-715, 2008.

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

MASSAGUÉ, J. TGFβ in cancer. *Cell,* v. 134, p. 215-230, 2008.

MEISNER, A. L.; FEKRAZAD, M. H.; ROYCE, M. E. Breast disease: benign and malignant. *The Medical Clinics of North America,* v. 92, p. 1115-1141, 2008.

MICALIZZI, D. S.; FARABAUGH, S. M.; FORD, H. L. Epithelial-Mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.* DOI 10.1007/s10911-010-9178-9, 2010.

MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, T.P. *Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat.* 2.ed. v.7. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1999.

MOLL, U. M.; SLADE, N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Molecular cancer research,* v. 2, n. 7, p. 371-386, 2004.

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

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

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

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

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

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

PEREZ-ALENZA, M. D.; PEÑA, L.; DEL CASTILLO, N.; NIETO, A. I. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumors. *Journal of Small Animal Practice,* v. 41, n. 7, p. 287-291, 2000.

POLYAK, K.; HU, M. Do myoepithelial cells hold the key for breast tumor progression? *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia,* v. 10, n. 3, p. 231-247, 2005.

RESTUCCI, B.; PAPARELLA, S.; DE VICO, G.; MAIOLINO, P. E-cadherin expression in normal and neoplastic canine mammary gland. *Journal of Comparative Pathology,* v. 116, p. 191-202, 1997.

RIBEIRO-SILVA, A.; RAMALHO, L. N. Z.; GARCIA, S. B.; ZUCOLOTO, S. The relationship between p63 and p53 expression in normal and neoplastic breast tissue. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine,* v. 127, p. 336-340, 2003.

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

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,* v. 90, n. 17, 1998.

ROGER, L.; GADEA, G.; ROUX, P. Control of cell migration: a tumor suppression function for p53? *Biology of the cell,* v. 98, p. 141-152, 2006.

RORTH, P. Collective Cell Migration. *Annual review of cell and development biology,* v. 25, p. 407-429, 2009.

ROSS, S.; HILL, C. S. How the Smads regulate transcription. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology,* v. 40, p. 383-408, 2008.

SARRIÓ, D.; RODRIGUEZ-PINILLA, S. M.; HARDISSON, D.; CANO, A.; MORENO-BUENO, G.; PALACIOS, J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Research,* v. 68, n. 4, p. 989-997, 2008.

SHEKHAR, M. P. V.; PAULEY, R.; HEPPNER, G. Extracellular matrix-stromal cell contribution to neoplastic phenotype of epithelial cells in the breast. *Breast cancer research,* v. 5, n. 3, p. 130-135, 2003.

SHI, Y., MASSAGUÉ, J., Mechanisms of TGFβ signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell,* v. 113, p. 685-700, 2003.

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

SORENMO, K. U.; KRISTIANSEN, V. M.; COFONE, M. A.; SHOFER, F. S.; BREEN, A. M.; LANGELAND, M.; et al. Canine mammary gland tumors: a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Veterinary and Comparative Oncology,* v. 7, n. 3, p. 162-172, 2009.

STEELE, R. J.; LANE, D. P. p53 in cancer: a paradigm for modern management of cancer. *Surgeon,* v. 3, n. 3, p. 197-205, 2005.

STEFANOU, D.; BATISTATOU, A.; NONNI, A.; ARKOUMANI, E.; AGNANTIS, N. J. p63 expression in benign and malignant breast lesions. *Histology and Histopathology,* v. 19, p. 465-471, 2004.

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

SUZUKI, H. I.; YAMAGATA, K.; SUGIMOTO, K.; IWAMOTO, T.; KATO, S.; MIYAZONO, K. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature,* v. 460, p. 529-534, 2009.

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

TOMASKOVIC-CROOK, E.; THOMPSON, E. W.; THIERY, J. P. Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer. *Breast cancer research,* v. 11, n. 213 (doi:10.1186/bcr2416), 2009.

TRIMBOLI, A. J.; FUKINO, K.; BRUIN, A.; WEI, G.; SHEN, L.; TANNER, S. M.; et al. Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer research,* v. 68, n. 3, p. 937-945, 2008.

TRYNDYAK, V. P.; BELAND, F. A.; POGRIBNY, I. P. E-cadherin transcriptional down-regulation by epigenetic and microRNA-200 family alterations is related to mesenchymal and drug-resistant phenotypes in human breast cancer cells. *International Journal of cancer,* v. 126, p. 2575-2583, 2010.

VOUSDEN, K. H.; PRIVES C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell,* v. 137, n. 3, p. 413-431, 2009.

WESTFALL, M. D.; PIETENPOL, J. A. p63: molecular complexity in development and cancer. *Carcinogenesis,* v. 25, n. 6, p. 857-864, 2004.

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

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

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

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

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

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

ZUCKERMAN, V.; WOLYNIECK, K.; SIONOV, R. V.; HAUPT, S.; HAUPT, Y. Tumor suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *Journal of Pathology,* v. 219, p. 3-15, 2009.

10. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo enviado para a revista *Brazilian Journal of Veterinary Pathology.*

BJVP
Brazilian Journal of Veterinary Pathology

Associação Brasileira de Patologia Veterinária

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

O *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* publica trabalhos originais, artigos de revisão à convite, *short communications,* relatos de caso, cartas ao editor e ponto de vista do editor. Com exceção das cartas ao editor e do ponto de vista do editor, todos os manuscritos serão revisados por dois ou mais revisores. A revista pode publicar também resumos de encontros científicos na área de Patologia Veterinária.

Trabalhos originais: devem ser redigidos em inglês e devem conter título, nome dos autores e filiação, resumo, palavras-chave, introdução, material e métodos, resultados, discussão, agradecimentos e referências. Resultados e discussão poderão ser combinados.

Os manuscritos deverão ser salvos em arquivos *Word* com 20mm de margem em todos os lados (papel carta), fonte *Times New Roman 10,* texto justificado e espaçamento simples. Tabelas deverão ser incluídas no arquivo *Word;* as figuras em alta qualidade (300 dpi) deverão ser enviadas em arquivos separados.

Os arquivos deverão ser enviados por e-mail para submisson@bjvp.org.br

Os autores são encorajados a procurar nativos da língua inglesa para revisar o manuscrito antes da submissão.

Estudos experimentais envolvendo animais devem ter a aprovação de um comitê institucional e as normas de ética devem ser encaminhadas à revista pelos autores.

Os autores devem concordar com a transferência da cópia para o BJVP.

Immunohistochemical expression of p53 and p63 in adenomas and carcinomas of canine mammary glands

Terra, EM[1]., Rodrigues, MMP[2], Magalhães, GM[3]., Tinucci-Costa, M[4]., Laufer-Amorim, R[1]., Rocha, NS[1].

[1] Veterinary Clinics Department, São Paulo State University – UNESP, Botucatu, SP.
[2] Obstetrics and Ginecology Department, São Paulo State University – UNESP, Botucatu, SP.
[3] Pathology Veterinary Department, São Paulo State University – UNESP, Jaboticabal, SP.
[4] Veterinary Clinics Department, São Paulo State University – UNESP, Jaboticabal, SP.[1]

ABSTRACT

The immunohistochemical expression of p53 and p63 was studied in benign tumors and carcinomas of the canine mammary gland (10 benign, 10 non-metastatic carcinomas and 10 metastatic carcinomas) to determine the role and the correlation between these proteins in development and progression of this kind of canine tumors. p53 was observed at the nuclei of the neoplastic epithelial cells with increased positivity from benign to malignant. p63 was expressed in myoepithelial cells of all tumors, with loss of continuous cell layers and expression from benign to malignant, and non-metastatic to metastatic. Despite the fact it was not observed correlation between p53 and p63 no significant differences were observed, our data support the notion that these proteins may be important in the development and progression of canine mammary neoplasms.
Keywords: bitches, mammary tumor, p53, p63

INTRODUCTION

Mammary tumors are often diagnosed in bitches and represent approximately 25-50% of all tumors diagnosed in these female dogs, and 41-53% of these tumors are malignant (6, 9, 22), with an incidence of two or three times than the observed among women (3).

Despite the progresses, breast oncogenesis continues to be a process of several steps connected to more than one molecular alteration (30). The malignant transformation of normal cells requires an accumulation of autonomous mutations in DNA resulting in cell proliferation, escape of the cell cycle control and resistance to apoptosis (2, 12, 14).

Metastasis and invasion are biological features of malignant tumors that have direct influence on treatment and prognosis of breast cancer patients (13).

During years, veterinary pathologists have focused on histopathological grade to determine the prognosis. However, the increased availability of antibodies for immunohistochemical studies has allowed additional criteria to be evaluated. As genetic alterations are responsible for many tumor types, the expression of inumerous oncogenes and tumor suppressor genes has been determined in different histological types of breast tumors and associated with increased malignancy and poor prognosis (19).

TP53 gene is a tumor suppressor and the more frequent site of genetic alterations in human malignancies. The p53 protein, a product of the TP53 gene, controls the expression of a variety of genes involved in cell cycle regulation. Hypoxia and DNA damages are some events that can activate the p53 downstream (11, 16, 17).

The majority of mutations on TP53 gene are *missense* that changes only one aminoacid from one protein to another. This may alter the binding of the protein to DNA or to transcriptional factors, corrupting the signal from p53 to the cellular machinery or it may unnaturally increase the stability of the protein, corrupting the delicate balance of synthesis and degradation that controls the levels of p53 in the cell (11, 16).

Thus, if considering the role of p53 in the cell cycle arrest and apoptosis in response to genotoxic damages in cells, it can be stated that the loss of p53 function may allow damaged cells to survive and proliferate without control (1, 25, 27).

The TP63 gene displays a high sequence and structural homology with TP53. It´s gene transcription is based on two distinct promoters and alternative splicings responsible for two protein classes (TA and ΔN). Despite their structural homology, they apparently have different functions and at least 6 isoforms. The three TA isoforms contain a transcription domain similar to p53 (4). Many studies

[1] erikamterra@hotmail.com

have shown that p63 can also induces apoptosis, however, this protein rarely shows mutation in human cancers (5, 8, 18, 29).

p63 expression is observed in the nuclei of basal cells of normal epithelia (skin, esophagus, cervix, vagina and others) and also in certain populations of basal cells of glandular structures. It is specifically expressed in myoepithelial cells of breast and considered a specific marker for these cells in normal breast tissue (7, 18).

In women it is expressed in a decreasing manner in benign to malignant breast lesions and its expression is too low in invasive carcinomas, since the main criteria to classify an invasive carcinoma is the loss of myoepithelial cells.

However, p63 loss in breast myoepithelial cells cannot be used as a single marker of invasiveness for *in situ* carcinomas (21, 26). However, it is unclear what leads to the disappearance of myoepithelial cells in invasive tumors, it may be through selective elimination by apoptosis, or by disruption of normal differentiation of myoepithelial cells and how this contributes to tumor progression (20, 24).

Given the high incidence of mammary neoplasms in dogs and the evidence of involvement of these proteins in the development and neoplastic progression, this study aimed to investigate the immunohistochemical expression of the p53 and p63 proteins in adenomas and carcinomas with and without metastasis and the correlation between then.

MATERIALS AND METHODS

The study protocol was approved by the Ethics Border on Animal Experimentation (CEEA). Thirty cases of canine mammary gland tumors with no breed or age predilection, were retrieved from the Department of Veterinary Pathology of São Paulo State University, Jaboticabal campus.

The animals were allotted in three groups: (G1) 10 benign tumors; (G2) 10 mammary carcinomas without metastasis at the diagnoses and (G3) 10 metastatic mammary carcinomas.

All dogs were females, ranging from 3 to 15 years of age.

Immunohistochemical staining

All tissue samples were routinely fixed in 10% neutral formalin and embedded in paraffin. Sections of 4 µm were cut from one representative block of each case and collected onto glass slides. The slides were deparaffined, rehydrated in graded alcohols and submitted to heat-induced antigen retrieval with citrate 10 mM, pH 6,0 in water bath during 20 minutes for *p63* and in pressure cooker (*Pascal Dako)*for *p53*. Endogenous peroxidase acitivity block was performed with 8% hydrogen peroxide in methanol.

Primary antibodies were diluted in phosphate-buffered saline and incubated for 60 minutes at 37^{o} C (anti-p63) and for 18 hours at 4^{o} C (anti-p53). Primary antibodies used for immunohistochemical evaluation included a monoclonal anti-human *p63* (1:200, clone 4A4, Dako) and an anti-human polyclonal *p53* antibody (1:500, clone CM1, Novocastra).

The secondary complex used was the EnVision (Dako). Diaminobenzidine (DAB) was used as a chromogen. Slides were counterstained with Mayer´s hematoxilin, washed in running water for 5 minutes, dehydrated, and mounted in a synthetic medium. Adjacent normal tissue was used as positive control for *p63* and canine mammary tumors previously known to express high levels of p53 were used as positive controls. Negative controls were obtained by omission of primary antibodies.

Evaluation of immunohistochemical data and Statistical analysis

The number of *p53* and *p63* reactive cells were assessed semiquantitatively by two different pathologists using a score system: 0 = no staining, 1 = between 1 and 50% of stained cells (low staining) and 2 = tumors with > 50% stained cells (high staining).

Statistical analysis was performed using the Graph Pad Prism v.4 software. The comparisons between different groups and *p53* and *p63* expression were analyzed by Fisher´s Exact test. To determine the correlation between antibodies, data was analyzed by Spearman´s correlation test.

RESULTS AND DISCUSSION

According to literature p53 staining was nuclear (see figure 2). No staining was observed only in G1 (Group 1), composed by benign neoplasms. High levels of staining were observed in G2 and G3, composed by malignant tumors (See figure 1A). No statistical difference was found for *p53* staining between experimental groups ($p<0,05$).

p53 staining in mammary tumors has been demonstrated by several authors (4, 10, 15), and always identified in high staining in malignant neoplasms. In the present study, despite no statistical difference between experimental groups, p53 staining was higher in malignant than benign tumors.

However, there were also samples with high staining in the group of benign neoplasms. This study differs from data derived from similar immunohistochemical analysis of canine mammary tumors, which showed that the incidence of the p53 positive staining in carcinomas was significantly higher in benign tumors. In a study with benign mixed tumors, the authors suggested that the overexpression of p53 may indicate a higher malignant potential of these tumors and that this positivity may be an early molecular event on mammary tumorigenesis (4). In human benign neoplasms, some researchers concluded that p53 staining was associated with increasing risk of developing a breast cancer in the future (23). In our study, an animal that showed higher staining for p53 in G1, showed recurrence and is being treated with chemotherapy, due to a carcinoma.

p63 staining was observed at the nuclei of basal cells of mammary tissue surrounding the alveoli and the percentage of staining was decreasing from group 1 to group 2 and group 3, in agreement with previous reports (7, 21). Lower levels of staining were observed in malignant tumors and no staining was found on metastatic carcinomas (G3), see figure 1B.

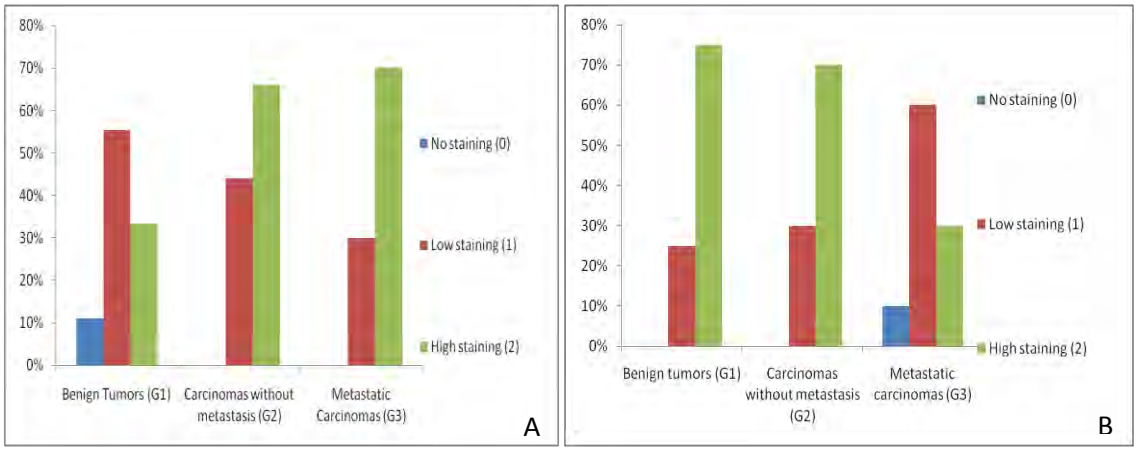


Fig. 1. Percentage of negative, low and high staining for *p53*(A) and *p63*(B) in different experimental groups.

Despite there was no significant difference between groups ($p<0.05$), graph B shows that the lower staining for p63 was observed in G3, composed by metastatic carcinomas. In addition, in G2 and G3, a discontinuous layer of staining was observed (see figure 3). The myoepithelial cells play an important role in the distinction of tumors *in situ* when compared to invasive tumors. The later shows loss of myoepithelial cells and discontinuous myoepithelial cell layers. In the present study, myoepithelial cells showed a progressive loss of immunoreactivity for p63 as tumors developed from benign to malignant. Similar findings were found in human mammary tumors and by other authors in mammary tumors of bitches (4, 21, 26). In addition, these findings support the hypothesis that normal myoepithelial layer acts as "natural tumor suppressor", once these cells become more scarce as the tumor become more invasive (20).

Based on the evidence that *in vitro* studies suggested that mutant forms of p53 may interact with p63 and, thus, change its stability (10), we investigated a possible association between the p63 and p53 expression and no correlation was observed.

Although mutations in p53 generally leads to formation of a defective protein that accumulates in the nuclei of cells and can be detected by immunohistochemistry, the lack of concordance between immunohistochemical overexpression and mutations was demonstrated (28). In this study an increase in mutant p53 staining and a decrease in positivity for p63 was observed according to neoplastic progression. If compared with previous reports wich say that p53 and p63 are capable of inducing apoptosis due to DNA damage (8,17), these findings support the idea that a decrease in these proteins expression may be due to an apoptosis inhibition wich leads to the progression of canine mammary carcinomas.

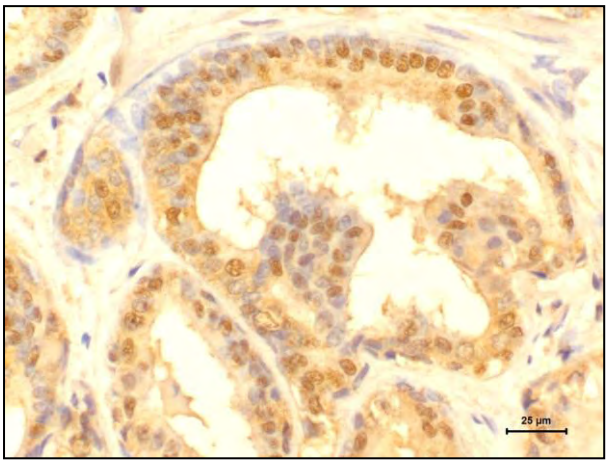


Fig. 2. Complex carcinoma (G2). High nuclear staining of p53. Immunohistochemistry, 500x.

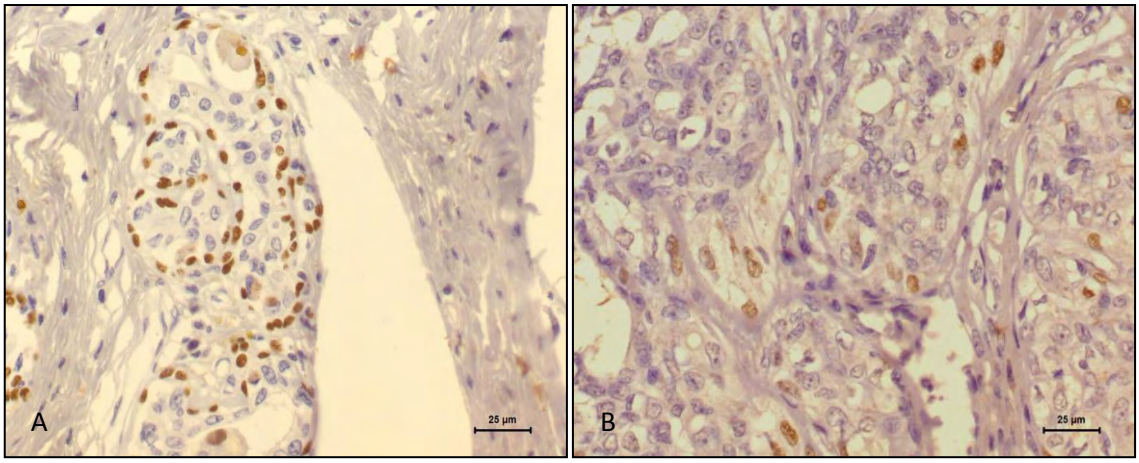


Fig. 3. Non-metastatic solid carcinoma (A) and Metastatic solid carcinoma (B). See the loss of imunoreactivity and the discontinuous myoepithelial cell layers for A to B. Immunohistochemistry, 400x.

In conclusion, the expression of p53 is higher in malignant then in benign tumors and the opposite happens with p63. This may be related to the development and progression of benign and malignant tumors. Thus, p63 can act as a tumor suppressor and may be present in different ways in *in situ* and invasive tumors. High expression of p53 in benign tumors may be due to a malignant potential of this neoplasms. However, further studies are needed to confirm this data and establish the real prognostic value of these markers, isolated or associated, in the veterinary medicine diagnostic routine.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

1. ARAKI, S., EITEL, JA., BATUELLO, CN., BIJANGI-VISHEHSARAEI, K.., XIAN-JIN, X., DANIELPOUR, D., POLLOK, KE., BOOTHMAN, DA., MAYO, LD. TGFβ-1-induced expression of human Mdm2 correlates with late-stage metastatic breast cancer. J Clin Invest, 2010, 120(1), 290-302.

2. ARGYLE, DJ., KHANNA, C. Tumor Biology and Metastasis. WITHROW, S. J., VAIL, D. M. Eds. Small Animal Clinical Oncology. St. Louis: Elsevier, 2007: 31-53.

3. BRODEY, RS., GOLDSCHIMIDT, MH., ROSZEL, JR. Canine mammary gland neoplasms. J Am Anim Hosp Assoc, 1983, 19, 61-9.

4. BERTAGNOLLI, AC., CASSALI, GD., GENELHU, MCLS., COSTA, FA., OLIVEIRA, JFC., GONÇALVES, PBD. Immunohistochemical expression of p63 and ΔNp63 in mixed tumors of canine mammary glands and its relation with p53 expression. Vet Pathol, 2009, 46, 407-15.

5. COLLAVIN, L., LUNARDI, A., DEL SAL, G. p53-family proteins and their regulators: hubs and spokes in tumor suppression. Cell Death Differ, 2010, 17, 901-11.

6. DALECK, CR., FRANCESCHINI, PH., ALESSI, AC., SANTANA, AE., MARTINS, MIM. Aspectos clínico e cirúrgico do tumor mamário canino. Ciência Rural, 1998, 28, 95-100.

7. Di COMO, CJ., URIST, MJ., BABAYAN, I., DROBNJAK, M., HEDVAT, CV., TERUYA-FELDSTEIN, J., POHAR, K., HOOS, A., CORDON-CARDO, C. p63 expression profiles in human and normal tissues. Clin Cancer Res, 2002, 8, 494-501.

8. FLORES, ER. The roles of p63 in cancer. Cell cycle, 2007, 6(3), 300-4.

9. FONSECA, CS., DALECK, CR., Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovariohisterectomia como terapia adjuvante. Ciência Rural, 2000, 30(4), 731-5.

10. GAIDDON, C., LOKSHIN, M., AHN, J., ZHANG, T., PRIVES, CA. A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. Mol Cell Biol, 2001, 21, 1874-87.

10. GAMBLIN, RM., SAGARTZ, JE. COUTO, CG. Overexpression of p53 tumor suppression protein in spontaneously arising neoplasms of dogs. Am J Vet Res, 1997, 58(8), 857-63.

11. GOODSELL, DS. The molecular perspective: p53 tumor suppressor. Oncologist, 1999, 4(2), 138-9.

12. HANAHAN, D., WEINBERG, RA. The hallmarks of cancer. Cell, 2000, 100, 57-70.

13. HOLLIER, BG., EVANS, K., MANI, SA. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cells: A coalition against cancer therapies. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2009, 14, 29-43.

14. KLOPFLEISCH, R., GRUBER, AD. Differential expression of cell cycle regulators p21, p27 and p53 in metastasizing canine mammary adenocarcinomas versus normal mammary glands. Res Vet Sci, 2009, 87, 91-6.

15. LEE, CH., KIM, WH., LIM, JH., KANG, MS., KIM, DY. KWEON, OK. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. J Vet Sci, 2004, 5(1), 63-9.

16. LEVINE, AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell, 1997, 88(3), 323-31.

17. LEVRERO, M., DE LAURENZI, V., CONSTANZO, A., SABATINI, S., GONG, J., WANG, JYJ., MELINO, G. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. J Cell Sci, 2000, 113(10), 1661-70.

18. MOLL, UM., SLADE, N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. Mol Cancer Res, 2004, 2 (7), 371-86.

19. MORRIS, J. Improving the diagnoses and treatment of canine mammary tumors: immunohistochemical markers as prognostic tools. Vet J, 2010, 184, 3-4.

20. POLYAK, K., HU, M. Do myoepithelial cells hold the key for breast tumor progression? J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2005, 10(3), 231-47.

21. RIBEIRO-SILVA, A., RAMALHO, LNZ., GARCIA, SB., ZUCOLOTO, S. The relationship between p63 and p53 expression in normal and neoplastic breast tissue. Arch Pathol Lab Med, 2003, 127, 336-40.

22. RODASKI, S., PIEKARZ, CH. Epidemiologia e Etiologia do Câncer. DALECK, CR., DE NARDI, AB., RODASKI, S. Eds. Oncologia em Cães e Gatos. São Paulo: Roca, 2008, 1-22.

23. ROHAN, TE., HARTWICK, W., MILLER, AB., KANDEL, RA. Immunohistochemical detection of c-erbB-2 and p53 in benign disease and breast cancer risk. J Natl Cancer Inst, 1998, 90(17), 1247-8.

24. SHEKHAR, MPV., PAULEY, R., HEPPNER, G. Extracellular matrix-stromal cell contribution to neoplastic phenotype of epithelial cells in the breast. Breast Cancer Res, 2003, 5(3), 130-5.

25. STEELE, RJ., LANE, DP. p53 in cancer: a paradigm for modern management of cancer. Surgeon, 2005, 3(3), 197-205.

26. STEFANOU, D., BATISTATOU, A., NONNI, A., ARKOUMANI, E., AGNANTIS, NJ. p63 expression in benign and malignant breast lesions. Histol Histopathol, 2004, 19, 465-71.

27. SUZUKI, HI., YAMAGATA, K., SUGIMOTO, K., IWAMOTO, T., KATO, S., MIYAZONO, K. Modulation of microRNA processing by p53. Nature, 2009, 460, 529-34.

28. WAKUI, S., MUTO, T., YOKOO, K., YOKOO, R., TAKAHASHI, H., MASAOKA, T., HANO, H., FURUSATO, M. Prognostic status of p53 gene mutation in canine mammary carcinoma. Anticancer Res, 2001, 21, 611-6.

29. WESTFALL, MD., PIETENPOL, JA. p63: molecular complexity in development and cancer. Carcinogenesis, 2004, 25(6), 857-64.

30. WIDAKOWICH, C., AZAMBUJA, E., GIL, T., CARDOSO, F., DINH, P., AWADA, A., PICCART-GEBHART, M. Molecular targeted therapies in breast cancer: Where are we now? Internatl J Biochem Cell Biol, 2007, 39, 1375-87.