UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

ESTUDO EM LARGA ESCALA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CARCINOMAS MAMÁRIOS EM CADELAS

Talita Mariana Morata Raposo Ferreira

Médica Veterinária.

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

ESTUDO EM LARGA ESCALA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CARCINOMAS MAMÁRIOS EM CADELAS

Talita Mariana Morata Raposo Ferreira

Orientador(a): Profª. Drª. Renée Laufer Amorim

Co-orientador: Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi

Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali

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

2016

Raposo-Ferreira, Talita Mariana Morata
R219e Estudo em larga escala da expressão gênica de carcinomas mamários em cadelas/ Talita Mariana Morata Raposo Ferreira. – – Jaboticabal, 2016
xi, 112 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientadora: Renée Laufer Amorim
Coorientador: Andrigo Barboza De Nardi, Geovanni Dantas Cassali
Banca examinadora: Rolando André Rios Villacis, Geórgia Modé Magalhães, Sabryna Gouveia Calazans, Letícia Abrahão Anai
Bibliografia

1. Assinatura gênica. 2. Cão. 3. Carcinoma. 4. Glândula mamária. 5. Potencial metastático I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-006:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: arnold@cnpso.embrapa.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ESTUDO EM LARGA ESCALA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CARCINOMAS MAMÁRIOS EM CADELAS

AUTORA: TALITA MARIANA MORATA RAPOSO FERREIRA
ORIENTADORA: RENEE LAUFER AMORIM
CO-ORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI
CO-ORIENTADOR: GEOVANNI DANTAS CASSALI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA pela Comissão Examinadora:

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

Profa. Dra. GEORGIA MODÉ MAGALHÃES
Departamento de Medicina Veterinária / Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, IFSULDEMINAS - Muzambinho/MG

Pesquisador Dr. ROLANDO ANDRÉ RIOS VILLACIS
Departamento de Genética e Morfologia / Universidade de Brasília - Brasília/DF

Profa. Dra. SABRYNA GOUVEIA CALAZANS
Departamento de Ciência Animal / UNIFRAN - Franca/SP

Pós-doutoranda LETÍCIA ABRAHÃO ANAI
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 22 de agosto de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

TALITA MARIANA MORATA RAPOSO FERREIRA- nascida aos 20 dias de março de 1985, natural de Rio Claro, São Paulo. Gradou-se no curso de Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Câmpus de Araçatuba, no ano de 2008. Durante a graduação, participou de vários cursos, congressos e estágios, sendo a maioria relacionada com as áreas de Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais. No período de agosto a setembro de 2008 realizou estágio curricular na Universidade Técnica de Lisboa (Portugal) nas áreas de Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais. No período de 2009 a 2011 ingressou no programa de aprimoramento profissional da Universidade de Franca (UNIFRAN), sob orientação do Prof. Ms. Daniel Kan Honsho, na área de Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais. Em março de 2011 ingressou no Programa de Mestrado em Clínica Médica Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP de Jaboticabal), sob orientação da Profª. Drª. Renée Laufer Amorim e coorientação da Profª. Drª. Mirela Tinucci Costa, concluindo-o em fevereiro de 2013. Durante o período de 2011 a 2013 foi monitora e aluna do curso de Pós-graduação *Latu sensu* de Oncologia Veterinária do Instituto Bioethicus, Botucatu, SP. Durante este período também participou do atendimento especializado no Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel", da FCAV, UNESP de Jaboticabal, sob a orientação da Profª. Drª. Mirela Tinucci Costa. Em março de 2013 iniciou o Programa de Doutorado em Clínica Médica Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP de Jaboticabal), sob orientação da Profª. Drª. Renée Laufer Amorim e coorientação do Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi e Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali. Durante o período de 2013 a 2015 foi monitora e aluna do curso de Pós-graduação *Latu sensu* de Acupuntura Veterinária, pelo Instituto Bioethicus, Botucatu. De setembro de 2015 a janeiro de 2016 realizou doutorado sanduíche pelo Programa BEPE (Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior) da Fundação de Amparo à Pesquisa dos Estado de São Paulo (FAPESP), junto à *University of Pennsylvania*, *School of Veterinary Medicine*, Filadélfia, EUA, *Department of Clinical Studies*, na área de Oncologia Veterinária, sob orientação da Profª Drª Karin Sorenmo e Drª Susan Volk.

“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo.
E que posso evitar que ela vá à falência.
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.
É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um “não”.
É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.
Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo…”
(Fernando Pessoa)

DEDICO

Aos meus queridos e amados pais, Ana e Darcy

Ao meu marido e companheiro Juarez

Ao meu querido irmão Rodrigo

A minha sobrinha Isabela

A minha avó querida Albertina

In memorian da minha avó Nair e avô Antônio

Amo todos incondicionalmente!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus por ter me abençoado com a maravilhosa família que tenho, sempre presente e me apoiando em todas as minhas decisões e planos de vida, é muito bom tê-los como meu porto seguro! Agradeço também pelo apoio na realização de mais um sonho.

Aos animais que desde cedo fizeram e fazem parte de minha vida e me fizeram despertar para esse dom de ser médica veterinária e de querer estar sempre perto deles, Sapeca, Jack, Átila, Mel, Sol, Nick, Mia e Doroty, além de muitos outros que fizeram minha vida mais feliz.

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

Ao meu coorientador Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi que me fez despertar para o mundo da Oncologia Veterinária, me ajudou a descobrir minha vocação e hoje se tornou um grande amigo, sempre prestativo, de um bom coração e sempre me abrindo portas para novas conquistas.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali por todos os ensinamentos e por todo apoio oferecido para a realização desse trabalho, aprendi muito sobre os tumores de mama com você. Tenho grande admiração pelo profissional e pela pessoa que você é.

À Profª. Drª. Sílvia Regina Rogatto que cedeu seu laboratório para a realização deste trabalho, agradeço também pelos muitos ensinamentos, sua colaboração foi essencial para a concretização desse estudo.

Às Professoras Drª Mirela Tinucci Costa e Drª. Rosemeri De Oliveira Vasconcelos por terem me acolhido tão bem nessa instituição, ambas sempre alegres e dipostas a me ajudarem em todos os momentos que precisei.

À Prof. Drª. Laura Peña pela dedicação com a leitura das lâminas de histologia dos pacientes desse trabalho e pelos seus ensinamentos.

Aos amigos que conquistei durante o período do “sanduíche”, Dr. Susan Volk, Mounica, Lindsay, Becky, Jim e em especial à Profª. Drª. Karin Sorenmo, exemplo de profissional, pesquisadora e de ser humano.

Aos brasileiros que conheci na Filadélfia, Fernanda Boechat, Fernanda Novais, Lucas, Louise, Mariana Bonfim, Mariana Fragoso, Rômulo, Edgar e Joana, vocês fizeram as dificuldades parecerem muito mais leves com a alegria típica brasileira.

Aos meus queridos amigos por permanecerem sempre presentes em minha vida, Julianda Tessália, Hilka Neves, Celina Simões, Analy Ramos, Camila Vieira, Jaquelina Del Vale, Daniel Buso, Flávia Volpato, Paloma, Acácio Duarte, Mariana Jorge, Thatiana Fortuna, Mônica Horr, Renata Bueno, Ana Carolina Leocádio, Maísa Pinheiro, Priscila Pavini, Marianne Dias, Leonardo Dourado, Úrsula Guberman, Heloísa Coutinho, Sofia Cerejo

Aos amigos que tive a felicidade de conhecer durante a pós- graduação e pude crescer junto, que me ajudaram a transformar os dias difíceis em dias mais alegres, os quais compartilhei momentos inesquecíveis, os “oncolegas” Paulo Jark, Rosana Lino, Letícia Anai, Giovanna Rossi, Érika Terra, Lívia Semolin, Sabrina Rodigheri, Marília Ferreira, Sabryna Calazans, Oscar Sierra, Rafaela Viéra, Cecília Bonolo, Karina Castro, Rafael Huppes, Julielton Barata, Jorge Alvarez, Alfredo Calpa, Bruna Firmo, Isabelle Tanjoni, além dos queridos amigos Michelle Avante, Mônica (Bombom), Geórgia Magalhães, Mayara Franzoni, Luís Gabriel, Germana, Mariana Tiai, Caio Bernabe, guardo todos vocês sempre no meu coração!

Aos meus queridos amigos do Laboratório Neogene que tiveram grande contribuição para a concretização deste trabalho e fizeram deste caminho mais leve e prazeroso André Villacis, Luisa Canto, Fábio Severino, Fábio Marchi, Sandra Linde e Márcio de Carvalho.

Aos amigos da Patologia Veterinária da FMVZ, UNESP de Botucatu, agradeço pelos momentos de alegria que passamos juntos.

Aos meus amigos do LBME e agregados, muito obrigada por todo o apoio, aprendi e me diverti muito com vocês, Ivan, Leo, Jason, Carlos, Bruno, Tata, Aninha, Luz, Arruia, Jéssica.

Aos amigos Val, Amauri, Claudinei muito obrigada por toda disposição sempre que precisei.

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

À FAPESP pelo fornecimento da bolsa de estudos e auxílio financeiro necessário para a realização deste trabalho. Processos 2013/03940-4 e 2013/25220-3.

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 007195/13 do trabalho de pesquisa intitulado **"Estudo em larga escala da expressão gênica de Carcinomas mamários em cadelas"**, sob a responsabilidade da Profª Drª Renée Laufer Amorim, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 11 de Abril de 2013.

Jaboticabal, 11 de Abril de 2013.

Andrigo Barboza de Nardi

Prof. Dr. Andrigo Barboza de Nardi
Coordenador - CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n - CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209 2600 - fax 16 3202 4275 - www.fcav.unesp.br

SUMÁRIO

RESUMO.....xiii
ABSTRACT.....xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....xv
LISTA DE TABELAS.....xvi
LISTA DE FIGURAS.....xviii
1 INTRODUÇÃO.....26
2 REVISÃO DE LITERATURA.....28
2.1 Tumores mamários caninos.....28
2.2 Classificação histopatológica dos tumores mamários caninos.....29
2.3 Marcadores prognósticos clínicos.....32
2.4 O cão como modelo de estudo para o desenvolvimento do câncer de mama em humanos.....32
2.5 Estudo em larga escala de tumores mamários caninos.....33
3 OBJETIVOS.....36
3.1 Objetivo geral.....36
3.2 Objetivos específicos.....36
4 MATERIAL E MÉTODOS.....37
4.1 Amostras.....37
4.2 Coleta, processamento e armazenamento das amostras.....38
4.3 Diagnóstico histopatológico.....39
4.4 Técnica de imuno-histoquímica.....39
4.5 Macrodissecção e extração de RNA.....40
4.6 Análise de integridade do RNA total.....41
4.7 Análise do perfil de expressão gênica em larga escala pela técnica de *microarray*.....41
4.8 Análise dos dados de expressão gênica em larga escala.....41
4.9 Classificação funcional.....43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....44
5.1 Seleção de casos.....44

5.2 Dados clínicos e histopatológicos 44
5.3 Análise de qualidade dos resultados em larga escala 49
5.4 Avaliação do perfil de expressão gênica em larga escala.....49
5.4.1 Análise de Componente Principal (Principal Component Analysis – PCA) 49
5.4.2 Análises computacionais de dados de *microarray* 54
5.4.3 Análise clusterizada hierárquica não supervisionada 57
5.5 Seleção de grupos amostrais para análise de expressão gênica em larga escala.....60
5.5.1 Análise entre tumores malignos, benignos e mama normal.....60
5.5.2 Análise entre carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos ..76
6 CONCLUSÃO 94
7 REFERÊNCIAS.....95
APÊNDICES 106
APÊNDICE 1. Técnica de *microarray* (análise em larga escala).....107
APÊNCICE 2. Resultados obtidos durante a avaliação da concentração e qualidade do RNA extraído e de sua integridade pelo NanoDrop™ e Bionalyzer (RIN), respectivamente. 109
APÊNDICE 3. Dados clínicos dos pacientes com carcinomas mamários (N=46). ..111
APÊNDICE 4. Curva de sobrevida entre os carcinomas mamários não metastáticos (linha sólida) e metastáticos (linha pontilhada), pelo método de Kaplan-Meier e significância estatística determinada pelo teste de log-rank com valores de p<0,05 considerados significativos, através do programa GraphPad Prism6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). 112

ESTUDO EM LARGA ESCALA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CARCINOMAS MAMÁRIOS EM CADELAS

RESUMO - Os tumores mamários são os principais tumores que acometem as cadelas, sendo também os tumores mais frequentes em mulheres e, entre ambas as espécies, são observadas semelhanças relacionadas ao comportamento biológico e molecular dessa neoplasia. Assim, as cadelas podem ser um excelente modelo comparativo para o entendimento do processo carcinogênico desta neoplasia. A metástase é uma consequência comum e a principal causa de mortalidade em decorrência dessa enfermidade, em ambas as espécies. O perfil de expressão gênica global permite o melhor entendimento do processo de carcinogênese e de metástases, por permitir a identificação de inúmeros genes que possam estar envolvidos com esses processos. Assim, o objetivo desse estudo foi a realização do estudo em larga escala, através da técnica de *microarray,* em amostras de tecidos mamários caninos, considerando amostras de glândulas mamárias normais, tumores mamários benignos e tumores mamários malignos (carcinomas simples e mistos), além da avaliação de carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos, para identificação de genes diferencialmente expressos entre esses grupos e relacionados com a tumorigênese e o desenvolvimento de metástases dos tumores mamários caninos. Observou-se, aproximadamente 1000 genes diferencialmente expressos entre as amostras tumorais e as glândulas mamárias normais e 465 genes diferencialmente expressos entre os tumores mamários benignos e malignos, sendo observados genes relacionados com o ciclo celular, desenvolvimento da glândula mamária e supressores tumorais. Em relação aos carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos, verificou-se 633 genes diferencialmente expressos. Os genes supressores tumorais, como pertencentes a via de sinalização do *ATM* e do *BRCA1,* sugeriram importante papel tanto na progressão tumoral quanto no desenvolvimento de metástases. Outras vias observadas foram as relacionadas com angiogênese e de organização da matriz extracelular. Portanto, a análise do perfil gênico em larga escala permitiu a identificação de inúmeros genes e vias envolvidas tanto no processo de progressão tumoral como envolvidas com o desenvolvimento de metástases, permitindo a realização de estudos futuros em busca de marcadores prognósticos específicos.

Palavras-chave: Assinatura gênica, cão, carcinoma, glândula mamária, potencial metastático

LARGE-SCALE GENE EXPRESSION STUDY OF MAMMARY CARCINOMA IN FEMALE DOGS

ABSTRACT – Mammary tumors are the main tumors that affect female dogs, as well as in women and in both species, it is observed similarity related to the biological and molecular behavior of this neoplasia. So, female dogs are considered an excellent model for the understanding of carcinogenesis process from mammary tumors. Metastasis occurs frequently and it is the main responsible for the mortality by this neoplasia in both species. Global gene expression profile allows the better understanding of carcinogenesis and metastasis process by the identification of several genes that may be involved with these processes. Therefore, the aim of study was to perform a large-scale study by microarray technique using samples from canine mammary tissues, as normal mammary gland, benign tumors and malignant tumors (simple and mixed carcinomas), beyond metastatic and non-metastatic mammary carcinomas for the identification of differentially expression genes among these groups and related to canine mammary tumors tumorigenesis and metastasis. It was observed next to 1000 differentially expression genes between tumors and normal mammary glands samples and 465 differentially expression genes between benign and malignant mammary tumors mostly related to cell cycle, mammary gland development and tumor suppressors. Related to metastatic and non-metastatic mammary carcinomas was identified 633 differentially expression genes. *ATM* and *BRCA1*, associated with tumor suppressor gene pathway, showed to play an important role in both tumor progression and metastasis development. Other networks observed were related to angiogenesis and extracellular matrix organization. Thus, large-scale gene profile analysis allowed the identification of numerous genes and networks involved with both tumor progression and metastasis, allowing new studies in search of specific prognostic markers.

Keywords: Gene signature, dog, mammary gland, metastatic potencial

LISTA DE ABREVIATURAS

AFIP *Armed Forces Institute of Pathology*

FC *Fold change*

FDR *False Discovery Rate*

GDE Genes diferencialmente expressos

IPA *Ingenuity Pathway Analysis*

M1 Mama torácica cranial

M2 Mama torácica caudal

M3 Mama abdominal cranial

M4 Mama abdominal caudal

M5 Mama inguinal

MMP Matriz metaloproteinase

OH Ovário-histerectomia

OMS Organização Mundial de Saúde

PCA *Principal Component Analysis*

PM *Perfect Match*

RIN *RNA integrity number*

RMA *Robust Multiarray Average*

TAC *Transcriptome Analysis Console*

TNM Tumor, linfonodo e metástase à distância

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Estadiamento dos tumores mamários de cadelas.	29
Tabela 2	Características clínicas das 46 pacientes com carcinomas mamários (idade, raça, tamanho do tumor, mama acometida, status reprodutivo, tamanho tumoral e estadiamento clínico).	46
Tabela 3	Classificação histopatológica das amostras de tumores mamários benignos e malignos de cadelas (N=53).	48
Tabela 4	Vias canônicas relacionadas com os genes diferencialmente expressos entre os tumores mamários benignos e as mamas normais. Programa IPA, p<0,05. Dentre os transcritos encontrados, observou-se o envolvimento de vários genes da família das metaloproteinases (em negrito) envolvidos na via de extravasão de leucócitos.	64
Tabela 5	Principais vias canônicas relacionadas com os genes diferencialmente expressos entre os tumores mamários malignos e benignos, identificadas pelo programa IPA, p<0,05. O gene BRCA1 está presente em várias dessas vias (em negrito).	70
Tabela 6	Lista dos 51 GDEs obtidos pela comparação entre tumores mamários malignos e tumores mamários benignos.	75
Tabela 7	Principais vias canônicas relacionadas aos genes diferencialmente expressos entre as amostras de carcinomas mamários não metastáticos e glândulas mamárias normais, identificadas pelo programa IPA, p<0,05.	79
Tabela 8	Principais vias canônicas associadas aos genes diferencialmente expressos entre as amostras de carcinomas mamários metastáticos e glândulas mamárias normais, identificadas pelo programa IPA, p<0,05.	82
Tabela 9	Principais vias canônicas de sinalização significantemente alteradas entre as amostras de carcinomas mamários	

metastáticos e não metastáticos, dentificadas pelo programa IPA, p<0,05. 86

Tabela 10 Lista dos 57 GDEs encontrados nos carcinomas mamários metastáticos em relação aos carcinomas mamários não metastáticos. 91

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1 Análise de componente principal representativo de assinaturas de expressão gênica entre amostras de tecidos mamários de fêmeas caninas, avaliada pelo software Expression Console. A. Comparação entre amostras de glândula mamária normal, tumor benigno e tumor maligno. B. Comparação entre mama normal, tumor benigno, carcinoma simples e carcinoma misto. Observa-se agrupamento entre as amostras de tecido mamário normal. N = mama normal (N=7), B = tumor benigno (N=7), M = tumor maligno (N=44), CS = carcinoma simples (N=28) e CM = carcinoma misto (N=16). 51

Figura 2 Análise de componente principal representativo de assinaturas de expressão gênica de carcinomas mamários caninos, avaliada pelo software Expression Console. A. Subtipos de carcinomas simples (N=28). B. Subtipos de carcinomas mistos (N=16). TC = carcinoma tubular, PC = carcinoma papilífero, TPC = carcinoma tubulopapilífero, SC = carcinoma sólido, MC = carcinoma micropapilar, AC = carcinoma anaplásico, C = comedocarcinoma, DC = carcinoma ductal, AEC = carcinoma adenoesquamoso, CC = carcinoma complexo, CMM = carcinoma e mioepitelioma maligno, MTC = carcinoma do tipo misto e CBT = carcinoma em tumor misto benigno. 52

Figura 3 PCA representativo de assinaturas de expressão gênica entre características clínicas e histopatológicas relacionadas a amostras de carcinomas mamários caninos, avaliado pelo software Expression Console. A. Status reprodutivo. B. Grau de malignidade tumoral. C. Tamanho tumoral (cm). D. Metástases de carcinomas mamários. Não foi observado agrupamento relacionando nenhum dado clínico e histopatológico. 53

Figura 4 Dendograma representativo das assinaturas de expressão gênica entre as amostras tumorais (tumores benignos e malignos) e as amostras de glândulas mamárias normais de fêmeas caninas. Representação de 911 genes diferencialmente expressos entre ambos grupos. As diferenças relativas de expressão gênica estão representadas pela intensidade de coloração em que o gene se encontra, sendo que o aumento relativo da expressão gênica se apresenta em vermelho e a baixa expressão em azul. O grupo 1 refere-se as amostras tumorais (amarelo) e o grupo 2 as mamas normais (verde). 55

Figura 5 Dendograma representativo das assinaturas de expressão gênica entre amostras de tecidos mamários de fêmeas caninas. **A.** Representação de 1010 genes diferencialmente expressos entre tumor benigno (BT) e mama normal (normal). **B.** Representação de 896 genes diferencialmente expressos entre tumor maligno (MT) e mama normal. Estão representadas as assinaturas específicas de cada grupo com a correspondente barra de intensidade (valores absolutos). Aumento (vermelho) e diminuição (azul) da expressão gênica relativa. 56

Figura 6 Dendograma representativo das 34 assinaturas de expressão gênica entre amostras de tumores benignos e de tumores malignos. Verificam-se diferentes agrupamentos entre essas amostras tumorais, apresentando diferenças no perfil de expressão gênica. O aumento da expressão gênica está representado em vermelho e a diminuição em azul. O grupo 1 refere-se as amostras de tumores benignos (BT), representado em amarelo e o grupo 2, as mamas de tumores malignos (MT), em verde. 57

Figura 7 Esquema de representação de assinaturas de expressão gênica das amostras de glândula mamária normal (N=7), tumor benigno (N=7), carcinoma simples (N=28) e carcinoma misto (N=16) avaliadas de forma não supervisionada. As cores de

cada barra são indicativas de amostras que se agruparam por apresentarem perfil de expressão gênica semelhante. Em verde estão representadas as amostras de glândula mamária normal, em azul as amostras de carcinomas primários mamários metastáticos e, em vermelho e amarelo estão presentes amostras de tumores benignos e malignos que apesar de estarem agrupadas, não apresentam características clínicas e/ou histopatológicas reconhecidas e que justifiquem esse agrupamento. 58

Figura 8 Análise de componente principal representativo de assinaturas de expressão gênica entre amostras de glândulas mamárias normais (N), tumores benignos (B) e tumores malignos (M) de fêmeas caninas. Observa-se agrupamento das amostras de tecidos mamários normais e uma proximidade de expressão gênica entre os tumores benignos, enquanto as amostras de tumores malignos encontram-se dispersas. 61

Figura 9 Dendograma representativo das assinaturas de expressão gênica entre amostras de tecidos mamários de fêmeas caninas. **A.** Representação de 1297 genes diferencialmente expressos entre tumor maligno (MT) e mama normal (Normal). **B.** Representação de 465 genes diferencialmente expressos entre tumor maligno (MT) e tumor benigno (BT). Estão representadas as assinaturas específicas de cada grupo com a correspondente barra de intensidade (valores absolutos), em vermelho está caracterizado o aumento da expressão gênica e em azul, a diminuição da expressão. 62

Figura 10 Principais vias canônicas associadas aos tumores benignos e as mamas normais (azul escuro) e entre os tumores malignos e as mamas normais (azul claro). 63

Figura 11 Principais vias gênicas relacionadas às doenças e funções celulares/biológicas entre os tumores benignos e as mamas

normais (azul escuro) e entre os tumores malignos e as mamas normais (azul claro). 63

Figura 12 Representação das 15 principais vias canônicas relacionadas com amostras de tecidos mamários caninos, identificadas pelo IPA. **A.** Tumores benignos e mamas normais. **B.** Tumores malignos e mamas normais. Interação positiva representada em laranja e interação negativa em azul. 64

Figura 13 Representação esquemática da via de regulação da Tec Kinase. Os genes com expressão diminuída estão representados em azul. A linha azul indica predição de inibição, a laranja indica predição de ativação e a amarela indica achados de interação inconsistentes baseados na literatura. Estão representados também ação de algumas drogas contra determinados alvos presentes nessa via. Os diferentes formatos dos “nós” constituem a classe funcional do produto do gene. 66

Figura 14 Representação esquemática da via de sinalização do gene supressor tumoral *ATM* (participando também da regulação de outros genes supressores tumorais como o *TP53* e o *BRCA1*) entre os tumores malignos e as mamas normais, identificados pelo IPA. Os genes com aumento de expressão estão representados em laranja e os genes com expressão diminuída estão em azul. A linha azul indica predição de inibição, a laranja indica predição de ativação. Os diferentes formatos dos “nós” constituem a classe funcional do produto do gene. 69

Figura 15 Vias canônicas identificadas pelo IPA, através dos genes diferencialmente expressos entre os tumores mamários malignos e os tumores benignos. Interação positiva em laranja e interação negativa em azul. 70

Figura 16 Representação esquemática da via de sinalização do *ATM* (supressor tumoral envolvido com a via de regulação de outros genes supressores tumorais como o *TP53* e o *BRCA1*, entre os

tumores mamários malignos e os tumores mamários benignos, avaliados pelo programa IPA. Os genes com aumento de expressão estão representados em laranja e os genes com transcritos diminuídos estão em azul. A linha azul indica predição de inibição, a laranja indica predição de ativação e a amarela indica achados de interação inconsistentes baseados na literatura. Os diferentes formatos dos “nós” constituem a classe funcional do produto do gene. 71

Figura 17 Diagrama de Venn mostrando o número de genes diferencialmente expressos comuns e exclusivos dos tumores mamários benignos, tumores mamários malignos e das glândulas mamárias normais. Os valores descritos no interior dos círculos indicam o número de genes expressos em cada grupo. A intersecção do diagrama indica os genes diferencialmente expressos em comum entre os grupos. BT = tumor benigno, MT = tumor maligno e N = mama normal. 72

Figura 18 Rede de interação proteica relacionada com genes com expressão aumentada nos tumores mamários benignos em relação as mamas normais. As proteínas em vermelho estão relacionadas com a função biológica de desenvolvimento da glândula mamária. 73

Figura 19 Rede de interação proteica entre os genes com expressão aumentada nos tumores mamários malignos em relação as glândulas mamárias normais. As proteínas em vermelho estão relacionadas com a função biológica de divisão celular. 74

Figura 20 Análise de componente principal representativo de assinaturas de expressão gênica entre amostras de glândulas mamárias normais (amarelo), carcinomas mamários não metastáticos (vermelho) e carcinomas mamários metastáticos (azul). Observa-se agrupamento das amostras de tecidos mamários normais e algumas amostras de carcinomas mamários não

metastáticos, enquanto as amostras de carcinomas mamários metastáticos encontram-se dispersas. 76

Figura 21 Dendograma representativo das assinaturas de expressão gênica entre amostras de tecidos mamários de fêmeas caninas. A. Representação de 1422 genes diferencialmente expressos entre amostras de carcinomas metastáticos (CM) e mama normal (Normal). B. Representação de 633 genes diferencialmente expressos entre carcinomas metastáticos e carcinomas não metastáticos (CNM). Em vermelho está caracterizado o aumento da expressão gênica e em azul a diminuição da expressão. 78

Figura 22 As 15 principais vias canônicas identificadas pelo IPA através dos genes diferencialmente expressos entre amostras de carcinomas mamários não metastáticos e tecidos mamários normais. Interação positiva representada em laranja e interação negativa em azul. 79

Figura 23 Rede de interação gênica identificada pelo IPA, para os genes diferencialmente expressos entre carcinomas mamários não metastáticos e glândulas mamárias normais, com funções relacionadas com ciclo celular, proliferação e crescimento celular e o desenvolvimento do câncer. As linhas entre os genes representam as interações conhecidas, com as linhas sólidas caracterizando as interações diretas e as linhas pontilhadas retratam as interações indiretas. Os diferentes formatos dos “nós” constituem a classe funcional do produto do gene. Genes com expressão aumentada estão representados em vermelho e com baixa expressão em verde, a intensidade da cor reflete a intensidade de expressão gênica. 81

Figura 24 As 15 principais vias canônicas identificadas pelo IPA através dos genes diferencialmente expressos entre as amostras de carcinomas mamários metastáticos e tecidos mamários

normais. Interação positiva representada em laranja e interação negativa, em azul. 82

Figura 25 Rede de interação gênica associadas com as funções celulares/biológicas de ciclo celular, organização e modelagem celular, replicação, recombinação e reparo do DNA, identificadas pelo IPA através dos genes diferencialmente expressos entre carcinomas mamários metastáticos e mamas normais. As linhas entre os genes representam as interações conhecidas, com as linhas sólidas caracterizando as interações diretas e as linhas pontilhadas as interações indiretas. Os diferentes formatos dos “nós” constituem a classe funcional do produto do gene. Genes com expressão aumentada estão representados em vermelho e com baixa expressão em verde, a intensidade da cor reflete a intensidade da expressão gênica. 84

Figura 26 Rede de interação gênica relacionada com os genes diferencialmente expressos entre carcinomas mamários metastáticos e mamas normais, envolvida com câncer, morfologia celular, função e manutenção celular. As linhas sólidas entre os genes representam as interações conhecidas e diretas e as linhas pontilhadas as interações indiretas. Os diferentes formatos dos “nós” constituem a classe funcional do produto do gene. Genes com expressão aumentada estão representados em vermelho e com baixa expressão em verde, a intensidade da cor reflete a intensidade da expressão gênica. 85

Figura 27 As 15 principais vias canônicas identificadas pelo IPA através dos genes diferencialmente expressos entre as amostras de carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos. Interação positiva representada em laranja e interação negativa em azul. 86

Figura 28 Rede de interação gênica envolvida com ciclo celular, desenvolvimento celular, crescimento e proliferação celular, relacionada com os genes diferencialmente expressos entre

carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos. Genes superexpressos estão representados em vermelho e com baixa expressão em verde. 87

Figura 29 Rede de interação gênica relacionada com os genes diferencialmente expressos entre carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos, envolvida com desordens hereditárias, doença metabólica, transporte molecular. Genes superexpressos estão representados em vermelho e com baixa expressão em verde. 88

Figura 30 Diagrama de Venn mostrando os genes diferencialmente expressos comuns e exclusivos dos carcinomas mamários metastáticos e não metastáticas e mamas normais. Os valores descritos no interior dos círculos indicam o número de genes expressos em cada grupo. A intersecção do diagrama indica os genes diferencialmente expressos em comum entre os grupos. CM= carcinoma mamário metastático, CNM = carcinoma mamário não metastático e N = mama normal. 89

Figura 31 Rede de interação proteica relacionada aos genes com aumento de expressão nos carcinomas mamários metastáticos em relação aos não metastáticos. As proteínas em vermelho estão relacionadas com a função biológica de organização da matriz extracelular. 90

Figura 32 Rede de interação proteica relacionada aos genes regulados positivamente nos carcinomas mamários metastáticos em relação aos não metastáticos. As proteínas em vermelho estão relacionadas com a função biológica de desenvolvimento de vasos sanguíneos. 91

1 INTRODUÇÃO

A neoplasia mamária é a principal neoplasia que acomete as fêmeas caninas (SORENMO et al., 2009; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013; CASSALI et al., 2014), correspondendo a aproximadamente 52% dos tumores que ocorrem nessa espécie (QUEIROGA; LOPES, 2002; VASCELLARI et al., 2016). Essa neoplasia acomete principalmente fêmeas sexualmente intactas ou castradas tardiamente por serem tumores hormônio dependentes (SCHNEIDER; DORN; TAYLOR, 1969; SORENMO et al., 2011; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013; CASSALI et al., 2014).

As cadelas com faixa etária entre nove e 11 anos são mais predispostas ao desenvolvimento dessa neoplasia (OLIVEIRA et al., 2003; OLIVEIRA-FILHO et al., 2010; SORENMO et al., 2011; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013). As raças mais acometidas são Poodle, Dachshund, Yorkshire Terrier, Maltês, Cocker Spaniel, Pastor Alemão, Boxer, Pointer, Fox Terrier, além dos animais sem raça definida (OLIVEIRA et al., 2003; OLIVEIRA-FILHO et al., 2010; BORGE; BORRESEN-DALE; LINGAAS, 2011; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013). No entanto, essa incidência pode variar de acordo com a localização geográfica (EGENVALL et al., 2005).

Dados da literatura americana inferem que a incidência de tumores mamários malignos em cães seja em torno de 50% (SORENMO, 2003; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013). Enquanto no Brasil, estima-se que a incidência de tumores malignos seja superior a 70% (OLIVEIRA et al., 2003; OLIVEIRA-FILHO et al., 2010). Nos países da Europa, por sua vez, a incidência de tumores malignos varia dependendo da região. Na Suíça, por exemplo, foi descrita incidência em torno de 47% (GRÜNTZIG et al., 2015), enquanto que na Itália relatou-se uma incidência em torno de 70% (VASCELLARI et al., 2016).

A etiologia do tumor de mama é multifatorial, estando envolvidos fatores genéticos, ambientais, nutricionais e hormonais (PHILIBERT et al., 2003; SORENMO et al., 2011; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013).

Os carcinomas são os tipos histológicos mais diagnosticados em fêmeas caninas (MISDORP, 1999; QUEIROGA et al., 2011). Metástases decorrentes de tumores mamários são a principal causa de mortalidade em cães e os principais locais observados são os linfonodos regionais, pulmão, fígado, baço, pele, encéfalo, ossos e rins (GUPTA et al., 2007; KLOPFLEISCH; GRUBER, 2009; SORENMO et al., 2011; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013).

O desenvolvimento e progressão dos tumores mamários, assim como o desenvolvimento das metástases são dependentes de mecanismos complexos, como diferenciação celular, perda de adesão celular, invasão da matriz extracelular, entre outras funções biológicas (KLOPFLEISCH et al., 2011; VON DEETZEN et al., 2013). Técnicas de análise da expressão gênica global ou em larga escala, permitem o estudo de milhares de genes simultaneamente e a identificação de genes diferencialmente expressos que podem ter um papel relevante na patogênese do câncer (SAIDI et al., 2004).

Assim, nesse estudo objetivou-se avaliar a expressão gênica global através da técnica de *microarray* entre diferentes tipos de tumores mamários (benignos e malignos) e tumores primários metastáticos de fêmeas caninas e identificar possíveis genes relacionados com a progressão tumoral e o desenvolvimento de metástases.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tumores mamários caninos

A glândula mamária é uma glândula sudorípara apócrina modificada constituída por uma rede de ductos envoltos por um estroma fibrovascular e rico em adipócitos (SORENMO et al., 2011). A maioria dos cães desenvolvem cinco pares de glândulas mamárias, sendo denominadas de mama torácica cranial (M1), mama torácica caudal (M2), mama abdominal cranial (M3), mama abdominal caudal (M4) e mama inguinal (M5). Além disso, cada mama apresenta entre sete e 16 aberturas ductais e cada um desses ductos irá eventualmente constituir um lobo da glândula adulta e atuar como unidade funcional independente na glândula (SILVER, 1966; SORENMO et al., 2011).

Os tumores mamários caninos apresentam-se como nódulos circunscritos, de tamanho variado e em cerca de 70% dos casos são observados a presença de mais de uma massa tumoral, presentes em uma ou mais glândulas mamárias, podendo ainda estar envolvendo ambas as cadeias mamárias. Além disso, esses tumores normalmente apresentam diferentes tipos histológicos, sendo tumores primariamente independentes (OLIVEIRA et al., 2003; SORENMO et al., 2009; OLIVEIRA-FILHO et al., 2010; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013). Os pares de glândulas mamárias M4 e M5 são os mais acometidos por essa neoplasia, enquanto as mamas torácicas craniais (M1) dificilmente estão envolvidas na primeira ocorrência dessa enfermidade (BENJAMIN; LEE; SAUNDERS, 1999; TATEYAMA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2003; OLIVEIRA-FILHO et al., 2010; SORENMO et al., 2011).

O estadiamento clínico do tumor de mama de cadelas é determinado pelo sistema TNM, conforme estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), com o objetivo avaliar o tamanho do tumor primário (T), a presença de metástases em linfonodos regionais (N) e metástases à distância (M) (OWEN, 1980) (Tabela 1).

A avaliação de metástases em linfonodos regionais é determinada por meio da avaliação citológica e/ou histopatológica (CASSALI et al., 2014; DE ARAÚJO et al., 2015), enquanto as metástases à distância são avaliadas pelos exames de imagem, através do exame radiográfico de tórax em três projeções (lateral direita e esquerda e

ventro-dorsal) e exame ultrassonográfico abdominal (SORENMO, 2003; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013; CASSALI et al., 2014). Lesões pulmonares menores do 6 mm de diâmetro dificilmente são detectadas pelo exame radiográfico, sendo indicada a avaliação pela tomografia computadorizada para diagnóstico precoce (SORENMO, 2003; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013; CASSALI et al., 2014).

Tabela 1. Estadiamento dos tumores mamários de cadelas.

ESTÁDIO	TAMANHO TUMORAL	*STATUS* NODAL	METASTÁSES À DISTÂNCIA
1	T1: < 3 cm	N0	M0
2	T2: 3 a 5 cm	N0	M0
3	T3: > 5 cm	N0	M0
4	Qualquer T	N1 (positivo)	M0
5	Qualquer T	Qualquer N	M1 (positivo)

Adaptado de (SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013).

A ressecção cirúrgica é considerada o tratamento de eleição dos tumores mamários caninos, podendo ser associada com tratamentos sistêmicos como quimioterapia antineoplásica, radioterapia, uso de coxibes, entre outros (SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013; CASSALI et al., 2014). Os benefícios da castração concomitantemente à mastectomia para a prevenção de aparecimento de novos tumores são controversos (BEAUVAIS; CARDWELL; BRODBELT, 2012). No entanto, a ovário-histerectomia (OH) em conjunto com a remoção tumoral mostrou influência positiva na sobrevida de pacientes caninos (SORENMO; SHOFER; GOLDSCHMIDT, 2000). Estudos recentes demonstraram redução em torno de 50% no aparecimento de novos tumores em cadelas que tiveram tumores benignos e foram castradas no momento da remoção cirúrgica do tumor de mama (KRISTIANSEN et al., 2013). Além disso, a OH também mostrou ser benéfica em cadelas que tiveram tumores mamários grau II, positivos para receptores de estrógenos ou com aumento na concentração sérica de estrógeno dosada antes da cirurgia (KRISTIANSEN et al., 2015).

2.2 Classificação histopatológica dos tumores mamários caninos

Os tumores mamários caninos são bastante heterogêneos, o que dificulta o

diagnóstico e confere pouca informação a respeito do prognóstico pela avaliação histológica (PEÑA et al., 2012). Além disso, há divergência entre patologistas quanto à classificação morfológica dos tumores mamários caninos, principalmente em relação aos tumores mistos (BENJAMIN; LEE; SAUNDERS, 1999; SORENMO, 2003; CASSALI et al., 2014). Várias classificações foram propostas ao longo dos anos e as mais usadas são as de Moulton (1990) e a de Misdorp et al. (1999), publicada pelo Instituto de Patologia das Forças Armadas (AFIP). Recentemente, novas classificações foram sugeridas como a de Goldschmidt et al. (2011) e a classificação brasileira de Cassali et al. (2014).

Os tumores mamários nas cadelas podem ser benignos ou malignos e se originar de diferentes tipos de tecidos da glândula mamária como epitelial, mesenquimal e de tecidos conectivos (MISDORP, 1999; QUEIROGA et al., 2011). A correta identificação de tumores benignos e malignos podem muitas vezes ser um desafio para os patologistas. Os critérios mais utilizados para identificação de malignidade são o tipo tumoral, pleomorfismo nuclear e celular, índice mitótico, presença de necrose, invasão de tecido adjacente e de vasos linfáticos e metástases em linfonodos regionais (GOLDSCHMIDT et al., 2011). Acredita-se que tumores malignos se desenvolvam a partir de lesões benignas pré-existentes, justificando o comportamento indolente de alguns tumores que permanecem pequenos por um longo período de tempo, crescendo rapidamente depois de um determinado tempo (BENJAMIN; LEE; SAUNDERS, 1999; SORENMO et al., 2011).

Os termos simples e complexos são comumente utilizados na classificação dos tumores mamários caninos (SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013). A denominação simples está relacionada com tumores que se originam das células epiteliais e apenas esse componente celular está comprometido, enquanto o termo complexo ou misto está relacionado com o comprometimento de células epiteliais e mioepiteliais, podendo inclusive ser observada presença de cartilagem e osso no caso dos carcinomas do tipo misto (GOLDSCHMIDT et al., 2011; PEÑA et al., 2012; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013).

Os tipos histológicos mais comumente diagnosticados nas cadelas são os carcinomas complexos e os carcinomas tubulares e tubulopapilíferos, dentre os subtipos de carcinomas simples (SORENMO, 2003; GOLDSCHMIDT et al., 2011;

VASCELLARI et al., 2016) e, dentre os tumores benignos, os adenomas (simples e complexo), fibroadenomas e os tumores mistos benignos são os mais comumente diagnosticados (SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013; CASSALI et al., 2014).

Os carcinomas sólidos e os carcinomas anaplásicos são considerados tipos histológicos agressivos, relacionados com elevado risco de recidiva precoce e desenvolvimento de metástases (MISDORP, 1999; CASSALI et al., 2014), enquanto os carcinomas mistos apresentam células epiteliais malignas com crescimento infiltrativo, observado pela perda da continuidade da membrana basal/mioepitelial e penetração de células tumorais no estroma, entretanto, também pode ser observada uma proliferação não invasiva (*in situ*) (CASSALI et al., 2014).

Vários sistemas de graduação dos tumores malignos foram propostos para o câncer de mama em mulheres a fim de fornecer informações mais acuradas aos clínicos (TAVASSOLI, 1999). O sistema de Elston & Ellis (1998), adaptado do método de Nottinghan, é o mais utilizado em mulheres e foi empregado nas cadelas ao longo dos últimos anos para a graduação dos tumores de células epiteliais, sendo baseada nas características morfológicas relacionadas com a formação tubular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico (DE OLIVEIRA et al., 2009; ESTRELA-LIMA et al., 2010; SANTOS et al., 2010; PENA et al., 2012). Recentemente, o sistema de graduação de Peña et al. (2012), o qual é uma adaptação do método de Elston & Ellis (1998) para os tumores caninos, vem sendo empregado com o objetivo de ser aplicado tanto para áreas de proliferação epitelial quanto mioepitelial. Nesse método considera-se as características morfológicas de acordo com a respectiva pontuação: formação tubular com valores >75% (1), 10 a 75% (2) e <10% (3); pleomorfismo nuclear discreto (1), moderado (2) e severo(3); índice mitótico avaliado em dez campos de maior aumento, 0-9 figuras de mitose (1), 10-19 figuras de mitose (2) e ≥20 figuras de mitose (3), com pontuação final de 3-5 caracterizando o grau I (baixo grau, tumores bem diferenciados), 6-7 caracterizando o grau II (grau moderado, diferenciação moderada) e 8-9 caracterizando o grau III (alto grau, tumores pobremente diferenciados) (PEÑA et al., 2012). Esse método de graduação mostrou ser útil na determinação do prognóstico dos tumores mamários caninos, facilitando a interpretação dos diagnósticos histológicos pelos clínicos, além de conceder aos patologistas um critério

uniforme para graduação tanto de áreas epiteliais, quanto mioepiteliais dos tumores mistos (PEÑA et al., 2012).

2.3 Marcadores prognósticos clínicos

A sobrevida de cadelas com neoplasias malignas pode ser influenciada por vários fatores como tipo histológico, grau de diferenciação, estádio da doença e tratamento utilizado (SORENMO, 2003; CHANG et al., 2005). Segundo Philibert et al. (2003), o grau de malignidade dos tumores mamários foi relacionado com o tempo de sobrevida, assim, pacientes com tumores grau II apresentaram tempo de vida reduzido. Outros autores, no entanto, consideram a invasão do tumor no tecido adjacente mais importante do que o tipo histológico (MOULTON, 1990).

O tamanho do tumor influencia positivamente o risco de recidiva e de metástases, sendo considerado um fator prognóstico independente, desse modo, tumores ≥ 5 cm estão relacionados com prognósticos piores (SORENMO, 2003; CHANG et al., 2005; SORENMO et al., 2011), enquanto tumores pequenos e bem diferenciados possuem um excelente prognóstico após a remoção cirúrgica (SORENMO, 2003). A presença de metástases em linfonodos regionais também confere um impacto sobre a sobrevida dos pacientes, contribuindo para um prognóstico desfavorável (SORENMO, 2003; DE ARAÚJO et al., 2015). As cadelas que apresentam tumores por mais de seis meses antes da remoção cirúrgica apresentam maior risco de ocorrência de metástase em linfonodos (CHANG et al., 2005). Além disso, pacientes em estádio V, apresentam o pior prognóstico em relação aos animais que apresentam estádios iniciais (YAMAGAMI et al., 1996; CHANG et al., 2005; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013).

Desse modo, a determinação do estadiamento tumoral, assim como do tipo e grau histológico, contribuem com o estabelecimento do prognóstico dessa neoplasia e auxiliam na escolha terapêutica (SORENMO, 2003; GAMA; ALVES; SCHMITT, 2008; SORENMO et al., 2011).

2.4 O cão como modelo de estudo para o desenvolvimento do câncer de mama em humanos

O câncer é a principal causa de morte tanto em humanos como nos cães (PINHO et al., 2012) e, assim como nas cadelas, o câncer de mama é o principal tumor que afeta as mulheres (FERLAY et al., 2010; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013; CASSALI et al., 2014). Estima-se o surgimento de 25% de casos novos a cada ano no Brasil, correspondendo a 57.960 casos para o ano 2016, segundo dados do INCA (2016). Em mulheres, os carcinomas invasivos são os tumores predominantes, tendo como principal representante o carcinoma ductal invasivo (WEIGELT et al., 2008; AKIYAMA; HORII, 2009).

As cadelas são consideradas um importante modelo para estudos comparativos dessa neoplasia devido às semelhanças nas características epidemiológicas, clínicas, biológicas e gênicas observada em ambas as espécies (BOGGS et al., 2008; ANDRADE et al., 2010; QUEIROGA et al., 2011; CASSALI, 2013), apresentando incidência três vezes maior de tumores mamários do que as mulheres (SORENMO, 2003; LORENZOVÁ et al., 2010). Os desafios terapêuticos e na obtenção da cura do câncer de mama em ambas espécies também são similares e as principais causas da falha do tratamento estão relacionados com o desenvolvimento de metástases e resistência as drogas utilizadas no tratamento dessa enfermidade (SORENMO et al., 2009).

Em mulheres sabe-se ainda que um importante fator de risco ao desenvolvimento do câncer de mama está associado à alterações em genes como BRCA1 e BRCA2, TP53, ATM,CHEK2, PTEN, STK11, CDH1, CASP8, CTLA4, NBN, CYP19A1, TERT, XRCC3 e ATM (ZHANG et al., 2014). Mutações no gene *TP53, BRCA1* e *BRCA2* em mulheres foram associadas com um alto risco de desenvolvimento de câncer de mama e com tumores de pior prognóstico (BOZHANOV et al., 2010; LALLOO; EVANS, 2012; KYUNG JIN EOH, HYUNG SEOK PARK, JI SOO PARK; JEONGWOO HAN, JUNG-YUN LEE, SANG WUN KIM, SUNGHOON KIM, YOUNG TAE KIM, 2016; MAESHIMA et al., 2016) O ATM foi considerado como marcador prognóstico independente para o câncer de mama em mulheres, uma vez que a diminuição de expressão desse marcador foi relacionada com o desenvolvimento de metástases e baixa sobrevida global (BUENO et al., 2014).

2.5 Estudo em larga escala de tumores mamários caninos

O câncer é uma doença heterogênea que está relacionado à inúmeros eventos como os envolvidos no crescimento, diferenciação e proliferação celular, invasão e desenvolvimento de metástases. Portanto, acredita-se que a investigação de múltiplas alterações moleculares seja de grande importância no entendimento de sua carcinogênese (BECKMANN et al., 1997; RAKHA et al., 2009; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O estudo de expressão gênica global em que os tumores são classificados de acordo com seus níveis de expressão ou de assinaturas gênicas independentemente de sua morfologia celular ou de características teciduais tem sido empregado tanto em humanos como na medicina veterinária pelas técnicas de *microarray* ou sequenciamento de RNA (MORRIS, 2016).

Em mulheres, a análise de expressão gênica em larga escala possibilitou a identificação de inúmeros genes potencialmente relacionados a características ou fenótipos clínico-patológicos do câncer de mama, o que levou a um melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento e progressão dessa neoplasia (PEROU et al., 2000; SAIDI et al., 2004), bem como no desenvolvimento de terapias alvos específicas, baseada em características moleculares do tumor (PUSZTAI et al., 2003).

A identificação de genes de interesse através do estudo em larga escala, permite que posteriormente sejam realizadas análises gênicas individuais, uma vez que a identificação geral dos genes poderia revelar candidatos que seriam perdidos em abordagem feita apenas individualmente (SAIDI et al., 2004).

Além disso, a identificação de perfis moleculares de tumores individuais pode auxiliar aos clínicos na predição de quais pacientes se beneficiariam com determinadas terapias ou quais tratamentos seriam mais adequados em cada caso (PUSZTAI et al., 2003). A análise de expressão gênica em larga escala também pode ser importante na determinação de genes relacionados a um comportamento biológico mais agressivo, servindo como fator prognóstico (PUSZTAI et al., 2003).

Recentemente foram realizados os primeiros estudos de análise de expressão gênica global em medicina veterinária, através do estudo de linhagens celulares de tumores mamários caninos (RAO et al., 2008; KRÓL et al., 2012). Krol et al. (2009)

utilizaram a técnica de *microarray* para comparar duas linhagens celulares de neoplasias mamárias caninas quanto ao grau de proliferação e inibição da apoptose, permitindo a identificação de diversos genes envolvidos neste processo.

Posteriormente, foram realizados estudos em tecidos mamários caninos, Rao et al. (2009) avaliaram o papel da progesterona no desenvolvimento do tumor de mama em cadelas, comparando o perfil de expressão gênica na hiperplasia mamária induzida pela administração de progestágenos exógenos com a neoplasia mamária espontânea. Wensman et al. (2009) verificaram o perfil gênico de carcinomas, fibrossarcomas e osteossarcomas mamários. Krol et al. (2010) avaliaram adenocarcinomas mamários e suas metástases pulmonares em cadelas e verificaram genes diferencialmente expressos no tumor primário e sua metástase. Klopfleisch et al. (2010) compararam o perfil gênico de carcinomas mamários metastáticos caninos com o perfil do câncer de mama em mulheres e observou semelhança em um terço dos genes com expressão diferencial no grupo metastático.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Os objetivos desse estudo foram avaliar o perfil de expressão gênica global pela técnica de *microarray* entre tumores mamários caninos, a fim de identificar genes diferencialmente expressos que possam estar relacionados com a progressão tumoral e o desenvolvimento de metástases.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar o perfil de expressão gênica global em amostras de tumores mamários benignos, malignos e glândulas mamárias normais de cadelas.
- Identificar os genes diferencialmente expressos entre carcinomas simples e carcinomas mistos.
- Identificar os genes diferencialmente expressos entre carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos e comparar com tecido mamário normal.
- Selecionar genes candidatos para validação em estudos futuros.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

Este estudo teve aprovação da comissão de ética no uso de animais (CEUA) sob protocolo de número 007195/13.

Foram coletadas 71 amostras de neoplasias mamárias de cadelas, provenientes de pacientes atendidos no Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, FCAV, UNESP de Jaboticabal e dez amostras de mamas normais coletadas de cadelas provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Araçatuba, SP, sem histórico de tumores mamários e confirmada pela avaliação histopatológica.

Durante a consulta foram realizados exame clínico geral da paciente através da avaliação minuciosa das cadeias mamárias verificando localização, tamanho e número de tumores mamários; consistência, coloração, presença de aderência e/ou ulceração desses tumores; avaliação dos linfonodos periféricos; realização de exames hemamatológicos (hemograma completo) e perfil bioquímico sérico para avaliação da função renal (ureia e creatinina) e hepática (alanina aminotransferase e fosfatase alcalina), além de exames de imagem, como exame radiográfico de tórax em três projeções (lateral direita e esquerda e ventro-dorsal), e exame ultrassonográfico abdominal para pesquisa de metástase. Posteriormente, foi determinado o estadiamento clínico das pacientes conforme estabelecido pela OMS (SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013).

As pacientes foram submetidas à mastectomia unilateral como tratamento das neoplasias mamárias. Na presença de mais de um nódulo em ambas cadeias mamárias, a cirurgia foi realizada em duas etapas, com intervalo de 60 dias e, quando detectada presença de metástase a distância no momento do diagnóstico do tumor mamário, foi realizada apenas nodulectomia para fins de diagnóstico. Antes da mastectomia foi realizada a OH dos animais intactos e durante o procedimento também foi feita a remoção dos linfonodos regionais, em geral do linfonodo inguinal e

quando aumentado de volume, o axilar também foi removido para avaliação histopatológica de metástases e determinação do estadiamento.

Pacientes que apresentavam prognóstico reservado a ruim, avaliado pelo tipo histológico, grau de malignidade do tumor e estadiamento clínico, indicou-se tratamento quimioterápico adjuvante com diferentes protocolos, de acordo com cada caso.

Os animais desse estudo tiveram seguimento clínico de no mínimo 18 meses, com reavaliações trimestrais no primeiro ano, a cada seis meses no segundo ano e posteriormente, os acompanhamentos foram realizados por telefone ou por consulta quando havia sido detectado recidiva tumoral ou aparecimento de novos tumores pelo proprietário. Pacientes que foram submetidos ao tratamento quimioterápico adjuvante foram reavalidos durante cada sessão, conforme o protocolo quimioterápico utilizado e, ao término do tratamento, tiveram um acompanhamento semelhante às cadelas que não foram tratadas com quimioterapia.

Em cada retorno foram feitas avaliações minuciosas das cadeias mamárias para verificação de recidiva tumoral e/ou aparecimento de novos tumores, avaliação dos linfonodos regionais e exames de imagem, radiográfico de tórax em três projeções, e ultrassonográfico abdominal para pesquisa de metástases regional e à distância, respectivamente, e avaliação laboratorial, exame hematológico e bioquímica sérica, para avaliação do estado de saúde do paciente.

4.2 Coleta, processamento e armazenamento das amostras

Imediatamente após a mastectomia, foi coletado um ou mais fragmentos de 1x1x1 cm^3 de cada tumor, os quais foram armazenados em criotubo estéril, livre de RNAse, previamente autoclavado, com a identificação do animal e da localização da mama e congelados em nitrogênio líquido a -196ºC. Para as coletas dos tumores foram utilizadas luvas de procedimento sem talco, lâminas de bisturi estéril (nº 24) e os tumores foram cortados sobre uma superfície coberta com papel alumínio. Todo o material foi trocado para cada tumor coletado, mesmo sendo do mesmo paciente para que não houvesse contaminação. Posteriormente, as amostras foram estocadas em freezer a -80ºC até seu processamento para análises moleculares.

Além disso, um ou mais fragmentos de cada tumor, inclusive do linfonodo regional removido cirurgicamente, foram coletados e fixados em formalina tamponada a 10% durante 24 horas, seguida pela fixação em álcool 70%, para avaliação histopatológica e realização da técnica de imunohistoquímica.

4.3 Diagnóstico histopatológico

As amostras incluídas em parafina foram cortadas na espessura de 5 µm em micrótomo, coradas pela Hematoxilina e Eosina e analisadas em microscopia de luz. O diagnóstico histopatológico foi realizado segundo a classificação de Goldschmidt et al. (2011) e a graduação dos tumores de acordo com Peña et al. (2012). Assim, foi avaliado a formação tubular, pleomorfismo nuclear e contagem de figuras de mitose para determinação do grau histológico. Além disso, também foi verificado se havia presença de êmbolos metastáticos em vasos sanguíneos e linfáticos e presença de metástases em linfonodos.

Na presença de mais de uma massa tumoral, foi utilizado nesse estudo o tumor de pior prognóstico, baseado no tipo e grau histológico e no tamanho tumoral.

4.4 Técnica de imuno-histoquímica

Para avaliação de micrometástases e confirmação de macrometástases nos linfonodos regionais, foi realizado a técnica de imuno-histoquímica e avaliação do marcador de células epiteliais pancitoqueratina. Essa técnica foi feita no Laboratório de Imuno-histoquímica, do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ, UNESP – Campus de Botucatu.

As amostras parafinizadas foram seccionadas em cortes de 5 □m de espessura e montadas em lâminas de vidro carregadas eletricamente. Estes cortes foram submetidos à desparafinização e reidratação. A recuperação antigênica feita com tampão Citrato pH 6,0 em panela de pressão (Pascal, DAKO), o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado a partir de uma solução a 8% de peróxido de hidrogênio a 30 volumes (Dinâmica) em metanol absoluto (Dinâmica), durante 20 minutos. Após esta etapa, procedeu-se com o bloqueio de reação inespecífica com

solução de leite em pó a 3% (Molico) durante uma hora, em temperatura ambiente. A seguir, os cortes foram incubados em câmara úmida com o anticorpo primário (AE1/AE2, DAKO), em diluição de 1:300, a 4ºC, durante 18 horas. A seguir as lâminas foram lavadas em solução tampão (Tris, pH 7,4) e usado o polímero EnVision (DAKO) durante 1 hora a temperatura ambiente. Foi utilizado 3,3′-Diaminobenzidina (DAB, DAKO) como cromógeno, durante 3 minutos, a temperatura ambiente.

Os cortes foram contra corados com Hematoxilina de Harris e, posteriormente, desidratados, montados com resina e observados em microscópio óptico. A observação das células foi realizada em microscópio de luz acoplado a câmera digital, através do programa de análise de imagens QWin 3.0 (Leica). As amostra que exibiram células com marcação citoplasmática foram consideradas positivas.

4.5 Macrodissecção e extração de RNA

As técnicas de macrodissecção das amostras e extração do RNA foram realizadas no laboratório Neogene da FMB, Campus de Botucatu.

As amostras de tecido congelado foram cortadas no criostato (Leica) através de cortes em congelamento sequenciais de 5 µm. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina e analisadas em microscópio de luz (Leica). Foram selecionadas para esse estudo, as amostras que apresentavam mais de 80% de células epiteliais neoplásicas.

Posteriormente, as amostras congeladas que foram selecionadas para o estudo foram submetidas à clivagem através de tubos com *bids* magnéticas, pelo equipamento Precellys R (BioAmerica Inc, Florida, EUA), seguida pela extração do RNA com Trizol® (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante. Após purificação do RNA, foram avaliadas a concentração e a pureza do RNA de cada amostra pelo espectrofotômetro (Nanodrop™ ND-8000, Thermo Scientific). A qualidade avaliada pelo NanoDrop™ fornece informações se houve contaminação com proteína ou algum agente químico utilizado no protocolo de extração do RNA (trizol®, clorofórmio e/ou álcool). A avaliação de possíveis contaminações foi obtida pela avaliação da fração 260/280 e 260/230, quando uma amostra de boa qualidade deve apresentar valores entre 1,8 a 2,0 e igual ou superior a 2,0, respectivamente,

sendo que a primeira fração avalia contaminação por proteína e a segunda por substâncias químicas. Portanto, para a realização do estudo, foram utilizadas amostras com valores da fração 260/280 e 260/230 próximos ao recomendado.

4.6 Análise de integridade do RNA total

A integridade do RNA foi determinada pelo equipamento Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, Califórnia, EUA). Esse equipamento fornece um número de integridade do RNA (RNA Integrity Number, RIN) que varia de 1 a 10, onde 1 refere-se a um RNA degradado e 10 a um RNA totalmente íntegro. Assim para as amostras de RNA total, são esperados valores altos de RIN (> 7,0) e para as amostras fragmentadas, valores menores (em torno de 2,0). Desse modo, foram utilizadas nesse estudo amostras que apresentaram valores de RIN > 7, ou muito próximo a esse valor.

4.7 Análise do perfil de expressão gênica em larga escala pela técnica de *microarray*

O perfil de expressão gênica global foi realizado no Laboratório Neogene do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE, AC Camargo), através da plataforma da Affymetrix, utilizando chip canino (Canine Gene 1.0 ST Array). Nesse chip estão presentes cerca de 18.000 transcritos e mais de 20.000 genes preditos para a espécie canina. Os procedimentos de marcação das amostras, hibridação e detecção foram baseados nas recomendações do fabricante (disponível em: http://media.affymetrix.com/support/downloads/manuals/wtplus_reagentkit_assay_manual.pdf). A técnica de *microarray* utilizada está descrita no APÊNDICE 1.

4.8 Análise dos dados de expressão gênica em larga escala

A captura das imagens correspondentes à intensidade de sinal da hibridação foi realizada pelo aparelho *GeneChip Scanner 7G*, operado com o auxílio do software *GeneChip Command Console*. O software Expression Console (Affymetrix) foi utilizado para a determinação da qualidade de hibridação. Os GeneChips foram

escaneados (Affymetrix GeneChip Scanner 3000) e detectados os valores de intensidade de sinal resultante da hibridação. Toda a área do chip foi inspecionada com o objetivo de identificar a presença de artefatos, como manchas ou riscos. Outros parâmetros foram verificados, tais como a hibridação do Oligo B2 que, além de servir como controle positivo da hibridação, é utilizado pelo software para localizar a “grade” que define a área de cada spot. Foram considerados chips de qualidade satisfatória aqueles que apresentaram o contorno, os cantos e o nome do chip visíveis, pois essas são as principais regiões relacionadas a hibridação desse controle.

A porcentagem de genes presentes para cada amostra inclui os controles positivos, os quais também funcionam como parâmetros para a verificação da qualidade do ensaio. Dentre esses, os controles positivos da hibridação (BioB, BioC, BioD e Cre) e os de amplificação, que consistem em controles externos (Dap, Lys, Phe e Thr). Além do Oligo B2, outras moléculas de RNA amplificado e biotinilado são adicionados como uma mistura (20X Eukarytoc Hybridization Control) nas amostras a serem hibridizadas, que correspondem aos genes BioC e BioD (E. coli) e Cre (bacteriófago P1). Os controles de amplificação externos foram moléculas de RNA correspondentes aos genes Dap, Lys, Phe, Thr (espécie *B. subtilis*) que, por serem adicionados durante o preparo das amostras, são utilizados para monitorar todo o processo de amplificação e marcação do RNA mensageiro.

Os dados foram inseridos e analisados usando o *software Expression Console 2.0* da *Affymetrix*, para gerar arquivos de sumarização de conjuntos de sondas (CHP) a partir de dados de intensidade característica (CEL). Assim, foram realizadas as análises de normalização e etapas de sumarização. A normalização visa eliminar o viés técnico, enquanto a sumarização estabiliza os valores por meio da média dos valores de intensidade de sinal para cada *probe set.* O *software Expression Console 2.0* (Affymetrix) usa o método RMA (Robust Multiarray Average) (IRIZARRY; ET AL, 2003), sendo calculados os valores de intensidade de sinal para cada *probe set*, baseado em *median polish*, considerando apenas os valores de intensidade das sondas PM (*Perfect Match*). Esta análise consiste basicamente em quatro etapas: (1) correção de background, (2) análise logarítmica (conversão em log2), (3) normalização de *quantiles* (valores de uma variável que divide uma distribuição de

frequências em grupos iguais), onde são classificados os valores de todos os grupos pela sua intensidade de sinal para cada *probe set* e (4) sumarização.

Posteriormente, os dados de expressão dos transcritos foram plotados no gráfico de Análise de Componente Principal (*Principal Component Analysis* – PCA), do programa *Expression Console* 2.0 da *Affymetrix* para avaliação da variância nos dados e identificação da forma de agrupamento segundo o perfil de expressão gênica das amostras de tecido mamário normal e tecidos tumorais e de parâmetros clínicos. As amostras foram plotadas no PCA de acordo com os valores normalizados.

A análise de genes diferencialmente expressos foi realizada com o *software Transcriptome Analysis Console* (TAC) versão 3.0, canfam2, da *Affymetrix*, pela análise denominada *Gene Level Differential Expression Analysis*. Foi utilizado o teste ANOVA (Análise de Variância), com significância estatística para $p<0,05$ e FDR de 5%. As diferenças nas expressões foram avaliadas por meio de análises comparativas e pareadas entre os grupos desejados, sendo considerado valores de FC ≤ -2 e ≥ 2.

4.9 Classificação funcional

As análises funcionais *in silico* foram realizadas pelos programas IPA (Ingenuity Pathway Analysis - http://www.ingenuity.com/), String (SZKLARCZYK et al., 2015) e Diagrama de Venn (HEBERLE et. al., 2015). Foram considerados os parâmetros *default Molecules per Network* e identificadas redes de interação gênica entre os genes diferencialmente expressos dos grupos de interesse pelo IPA. Foram utilizados os bancos de dados *Ingenuity Expert Information* e a nova versão *Ingenuity Expert Assist Findings.*

Os genes diferencialmente expressos entre as amostras de tecidos mamários caninos foram submetidos à análise de redes, vias gênicas, doenças relacionadas e função celular e/ou molecular e vias de interação pela utilização do *software* IPA. O IPA é uma base de dados humanos bem completa e de alto custo e, as informações obtidas nesse programa estão bem fundamentadas para o câncer de mama na mulher. No entanto, nem todas as informações encontradas nesse programa, foram previamente avaliadas na espécie canina.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção de casos

Após avaliação do percentual de células epiteliais neoplásicas (≥80%) dos cortes congelados, das 71 amostras coletadas, foram selecionadas 53 amostras para o estudo, sendo sete amostras de tumores benignos e 46 de carcinomas mamários (29 carcinomas simples e 17 carcinomas mistos), além das dez amostras de tecido mamário normal. Os resultados obtidos pelo *NanoDrop* 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) e pelo *Bionalyzer* destas amostras estão demonstrados no APÊNDICE 2.

5.2 Dados clínicos e histopatológicos

Os dados clínicos de cada paciente desse estudo com tumores malignos como idade, raça, *status* reprodutivo, mama acometida e estadiamento clínico estão representados na Tabela 2. Informações complementares dos dados clínicos e histopatológicos estão representados no APÊNDICE 3.

A idade média dessas cadelas foi de 10,45± 2,48 anos, sendo que a idade mínima foi de um ano e meio anos e a máxima foi de 15 anos. A faixa etária média corrobora com o verificado em outros estudos (OLIVEIRA et al., 2003; EGENVALL et al., 2005; OLIVEIRA-FILHO et al., 2010; SORENMO et al., 2011; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013; CASSALI et al., 2014; VASCELLARI et al., 2016). A presença de tumores mamários malignos em cadelas antes dos cinco anos de idade é rara (PEREZ ALENZA , PEÑA L, DEL CASTILLO N, 2000; VASCELLARI et al., 2016). Assim, a paciente desse estudo com a idade mínima (um ano e meio), apresenta uma incidência incomum de neoplasia mamária maligna.

As raças mais acometidas foram as cadelas sem raça definida (19 casos, 41,3%), seguida pelo Poodle (9 casos, 19,6%) e Cocker e Teckel (5 casos cada um, 10,9%). Essas raças fazem parte das raças descritas como de alto risco ao

desenvolvimento das neoplasias mamárias (OLIVEIRA-FILHO et al., 2010; BORGE; BORRESEN-DALE; LINGAAS, 2011; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013).

Trinta e sete cadelas (80,4%) não eram castradas e, esse alto indicie é justificado pela influência positiva dos fatores hormonais no desenvolvimento da neoplasia mamária (SCHNEIDER; DORN; TAYLOR, 1969; SORENMO et al., 2011; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013; CASSALI et al., 2014). Vinte casos (43,5%), apresentavam histórico de pseudociese e duas (4,4%) haviam feito uso de contraceptivo oral. Outros estudos identificaram uma alta porcentagem de pseudociese relacionada às neoplasias malignas (OLIVEIRA et al., 2003; OLIVEIRA-FILHO et al., 2010).

As mamas mais afetadas foram mama inguinal (15 casos, 32,6%), seguida pela mama abdominal caudal (11 casos, 23,9%) e abdominal cranial (10 casos, 21,7%), concordando também com dados da literatura (BENJAMIN; LEE; SAUNDERS, 1999; TATEYAMA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2003; OLIVEIRA-FILHO et al., 2010; SORENMO et al., 2011). Dos tumores mamários avaliados, 24 (52,2%) estavam presentes na cadeia mamária direita, 19 (41,3%) na cadeia mamária esquerda e 3 (6,5%) em ambas cadeias mamárias. Não foi encontrado na literatura revisada dados referentes à prevalência de tumores mamários caninos em uma determinada cadeia mamária.

Quase metade dos animais desse estudo (21 casos, 45,7%) apresentavam mais de um nódulo mamário no momento do diagnóstico. Apesar da alta incidência de nódulos mamários múltiplos observados nesse estudo, essa incidência ainda é inferior ao descrito na literatura, superior a 70% (OLIVEIRA et al., 2003; SORENMO et al., 2009). No entanto, de forma semelhante ao relatado em outros trabalhos, a maioria dos tumores avaliados nesse estudo, apresentavam distintos tipos histológicos, caracterizando-se como tumores primariamente independentes (OLIVEIRA et al., 2003; SORENMO et al., 2009; OLIVEIRA-FILHO et al., 2010; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013).

A presença de tumores acima de 5cm (T3) foi encontrada em18 casos (39,1%). A alta incidência de tumores grandes, pode ser decorrente de diagnósticos tardios devido ao longo de tempo que muitos proprietários levam para procurar por um atendimento médico e, esse fator poderia estar contribuindo com a elevada incidência

de tumores malignos no Brasil, cerca de 70%, sendo maior que o descrito na literatura americana (MISDORP, 1999; MISDORP et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2003; SORENMO, 2003; OLIVEIRA-FILHO et al., 2010; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013).

Dentre os estádios tumorais, o estádio 1 e estádio 5 foram predominantes, 13 (28,3%) e 12 (26,1%) dos casos, respectivamente. Em relação ao tratamento quimioterápico, sete pacientes foram submetidos a algum tipo de protocolo.

Tabela 2. Características clínicas das 46 pacientes com carcinomas mamários (idade, raça, tamanho do tumor, mama acometida, *status* reprodutivo, tamanho tumoral e estadiamento clínico).

IDADE (ANOS)	RAÇA	MAMA ACOMETIDA	*STATUS* REPRODUTIVO	ESTADIAMENTO CLÍNICO
11	Teckel	M2E	Inteira	1
12	Cocker	M3D	Castrada	1
10	Rottweiler	M4E	Inteira	3
10	Pitbull	M5D	Castrada	1
11	Poodle	M3 a 5 D/E	Inteira	5
1,5	Pinscher	M5D	Inteira	2
13	Pinscher	M5E	Castrada	1
12	Poodle	M5D	Inteira	1
15	SRD	M4D	Inteira	3
12	SRD	M3D	Castrada	3
12	SRD	M4D	Inteira	2
12	Poodle	M2E	Inteira	2
10	Pitbull	M4 e 5D	Castrada	5
10	Poodle	M5D e E	Inteira	2
10	Cocker	M3E	Inteira	3
9	Pinscher	M3E	Inteira	4
9	Cocker	M4 e 5D/E	Inteira	5
6	SRD	M3D	Inteira	4
11	Pastor Belga	M5D	Inteira	5
14,7	SRD	M3 a 5E	Castrada	5
7	Beagle	M4E	Inteira	1
12	SRD	M3 e 4E	Inteira	1
10	Teckel	M3D	Inteira	3
10	SRD	M4D	Inteira	2
12	Teckel	M5E	Inteira	5
13	Poodle	M5D	Castrada	1

10	SRD	M5D	Inteira	1
7	Cocker	M2D	Inteira	2
7	SRD	M4D	Castrada	2
14	SRD	M3D	Inteira	5
11	Pastor Alemão	M3D	Castrada	3
13	Lhasa Apso	M4E	Castrada	1
12	SRD	M5D	Castrada	1
11	Poodle	M1 e 2D	Castrada	5
7	SRD	M3 e 4E	Inteira	5
11	SRD	M3D	Inteira	2
9	Teckel	M5E	Inteira	3
9	Poodle	M4D	Inteira	1
12	Poodle	M4 e 5D	Castrada	2
12	Akita	M5E	Inteira	5
13	Poodle	M4 e 5E	Inteira	2
7	Rottweiler	M3E	Inteira	5
10	Teckel	M5E	Inteira	2
8	Rottweiler	M5E	Inteira	3
11	SRD	M5D	Inteira	5
12	Cocker	M2 e 3E	Castrada	1

Das amostras de tumores benignos (N=7), o tipo histológico predominante foi o adenoma complexo (5 casos, 71,4%), corroborando com dados da literatura como um dos tipos predominantes de neoplasia mamária benigna (SORENMO, 2003; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013; CASSALI et al., 2014).

A neoplasia mamária mais prevalente foi o carcinoma simples (29 casos, 54,7%), tendo como os subtipos mais observados o carcinoma tubular (9 casos, 31%), o carcinoma papilífero (6 casos, 20,7%) e o carcinoma tubulopapilífero (4 casos, 13,8%), e, dos tumores mistos, os subtipos predominantes foram o carcinoma complexo (8 casos, 47%) e o carcinoma e mioepitelioma maligno (5 casos, 29,4%) (Tabela 3). Os diagnósticos histopatológicos predominantes desse estudo corroboram com o observado em outros estudos, tenho como os carcinomas complexos e os carcinomas tubulares, os tipos histológicos mais diagnosticados (SORENMO, 2003; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013; VASCELLARI et al., 2016).

Em relação ao grau histológico, foi observado 22 amostras (47,8%) sendo grau I, 16 (34,8%) como grau II e 8 (17,4%) como grau III.

Tabela 3. Classificação histopatológica das amostras de tumores mamários benignos e malignos de cadelas (N=53).

DIAGNÓSTICO	N (%)
Tumores benignos	**7**
Adenoma complexo	4 (57,1)
Hiperplasia, ectasia ductal e papilomatose	1 (14,3)
Adenoma simples	1 (14,3)
Adenoma complexo	1 (14,3)
Carcinomas simples	**29**
Carcinoma tubulopapilífero	4 (13,8)
Carcinoma tubular	9 (31)
Carcinoma papilífero	6 (20,7)
Carcinoma micropapilar	2 (7)
Carcinoma adenoesquamoso	1 (3,4)
Carcinoma sólido	3 (10,3)
Carcinoma anaplásico	1 (3,4)
Comedocarcinoma	2 (7)
Carcinoma ductal	1 (3,4)
Carcinomas mistos	**17**
Carcinoma complexo	8 (47)
Carcinoma e mioepitelioma maligno	5 (29,4)
Carcinoma em tumor misto benigno	2 (11,8)
Carcinoma do tipo misto	2 (11,8)

Metástases decorrentes de carcinomas mamários foram observadas em 14 animais (30,4%), sendo detectadas em linfonodos regionais (inguinal, axilar), pulmão, fígado, baço, coluna vertebral, pele e glândula adrenal. Observou-se que dentre essas 14 amostras de carcinomas mamários metastáticos, quatro delas apresentavam grau de malignidade III (28,6%), oito tinham grau II (57,1%) e duas, grau I (14,3%), sendo que dessas duas amostras, uma era T2 e outra T3. Em relação ao tamanho tumoral, quatro desses tumores mediam entre 3 a 5 cm (28,6%) e dez apresentavam tamanho superior a 5 cm (71,4%). Além disso, oito tumores (57,1%) foram classificados como carcinomas simples, associados aos subtipos comedocarcinoma, carcinoma micropapilar, carcinoma sólido, carcinoma anaplásico, carcinoma tubular, carcinoma papilífero e carcinoma adenoesquamoso; enquanto seis tumores (42,9%) eram carcinomas mistos, sendo observado os subtipos: carcinoma complexo, carcinoma

em tumor misto benigno, carcinoma e mioepitelioma maligno e carcinoma do tipo misto.

A sobrevida média dos pacientes que tiveram carcinomas não metastáticos foi de 907,6±342,5 dias. Os animais que desenvolveram metástases decorrentes de carcinomas mamários apresentaram sobrevida média de 355,8±403 dias ($p<0,0001$) (APÊNDICE 4). Esta diferença estatisticamente significante entre os grupos metastáticos e não metastáticos é esperada, uma vez que a metástase é uma característica que está relacionada diretamente com o prognóstico e tempo de sobrevida das pacientes, sendo a principal causa de mortalidade relacionada com os tumores mamários caninos (YAMAGAMI et al., 1996; CHANG et al., 2005; GUPTA et al., 2007; KLOPFLEISCH; GRUBER, 2009; KLOPFLEISCH et al., 2010, 2011; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013).

5.3 Análise de qualidade dos resultados em larga escala

A qualidade dos resultados obtidos com a técnica de *microarray* foi avaliada pelo *software Expression Console 2.0 (*Affymetrix). Após essa análise, algumas amostras tiveram que ser excluídas do estudo por não apresentarem qualidade satisfatória, sendo uma amostra de carcinoma misto, uma de carcinoma simples e três amostras de tecido mamário normal. Assim, as análises a seguir foram realizadas com 58 amostras, sendo 44 amostras de tumores malignos, 28 amostras de carcinomas simples e16 amostras de carcinomas mistos, sete amostras de tumores benignos e sete amostras de glândulas mamárias normais.

5.4 Avaliação do perfil de expressão gênica em larga escala

5.4.1 Análise de Componente Principal (*Principal Component Analysis* – PCA)

Verificou-se que as amostras de mamas normais se apresentaram agrupadas, mostrando perfil gênico semelhante, enquanto as amostras de tumores benignos, embora agrupadas, mostraram perfil gênico semelhante a algumas amostras de tumores malignos (Figura 1A). Quando comparada as amostras de carcinomas

simples com carcinomas mistos, também não foi observado agrupamento característico para esses subtipos, mostrando agrupamentos semelhantes entre algumas amostras (Figura 1B). Assim, esses resultados sugeriram que a classificação de acordo apenas com as características morfológicas não foi suficiente para definir o padrão de perfil gênico dos tumores mamários caninos.

Posteriormente, os subtipos carcinomas simples e carcinomas mistos foram avaliados separadamente, a fim de verificar se havia presença de perfil de expressão gênica associada com cada subtipo. Dentre os carcinomas simples, os carcinomas papilíferos foram os subtipos que mais se apresentaram agrupados (Figura 2). Os resultados sugeriram que algumas amostras de carcinomas simples, como papilífero, tubular e tubulopapilífero tenham um perfil molecular parecido, apresentando comportamento semelhante ao observado na rotina clínica. Ao contrário, outros subtipos como carcinoma sólido, carcinoma anaplásico, carcinoma micropapilar e comedocarcinoma mostraram perfil gênico divergentes. Esses tumores apresentam comportamento mais agressivo e, estão associados a maior incidência de recidivas e metástases (MISDORP, 1999; GOLDSCHMIDT et al., 2011; GAMBA et al., 2013; CASSALI et al., 2014).

Em relação aos carcinomas mistos, os carcinomas complexos apresentaram perfil de expressão gênica mais similar, no entanto, de forma geral todos os subtipos avaliados apresentaram um perfil de expressão gênica parecido com o apresentado pelos carcinomas complexos, com exceção de algumas amostras. Os carcinomas mistos apesar de terem o envolvimento do componente mioepitelial, além do epitelial, normalmente estão associados com comportamento menos agressivo do que os carcinomas simples (SORENMO, 2003; GOLDSCHMIDT et al., 2011; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013; CASSALI et al., 2014; RASOTTO et al., 2014).

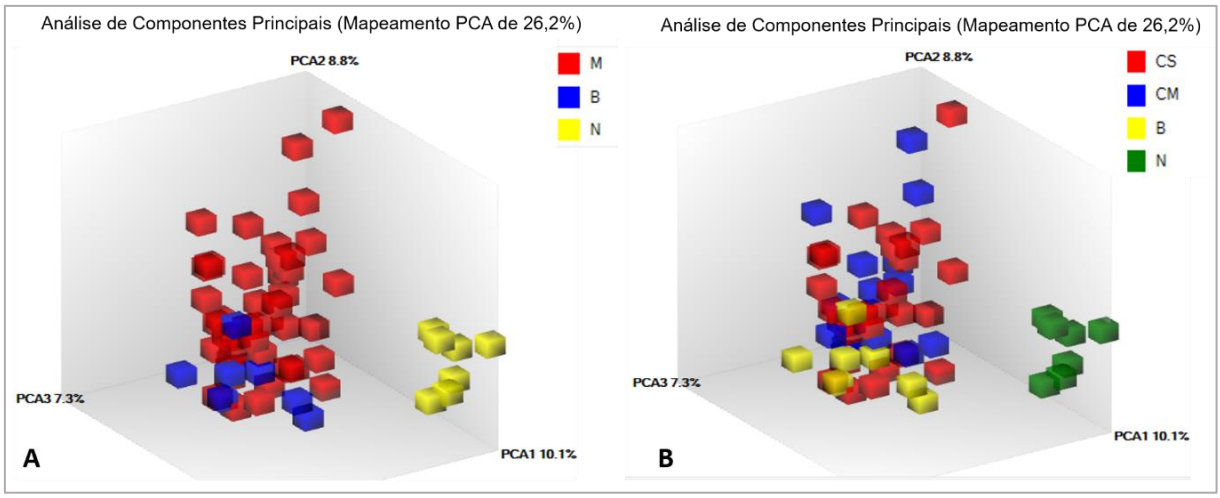


Figura 1. Análise de componente principal representativo de assinaturas de expressão gênica entre amostras de tecidos mamários de fêmeas caninas, avaliada pelo *software Expression Console*. **A.** Comparação entre amostras de glândula mamária normal, tumor benigno e tumor maligno. **B.** Comparação entre mama normal, tumor benigno, carcinoma simples e carcinoma misto. Observa-se agrupamento entre as amostras de tecido mamário normal. N = mama normal (N=7), B = tumor benigno (N=7), M = tumor maligno (N=44), CS = carcinoma simples (N=28) e CM = carcinoma misto (N=16).

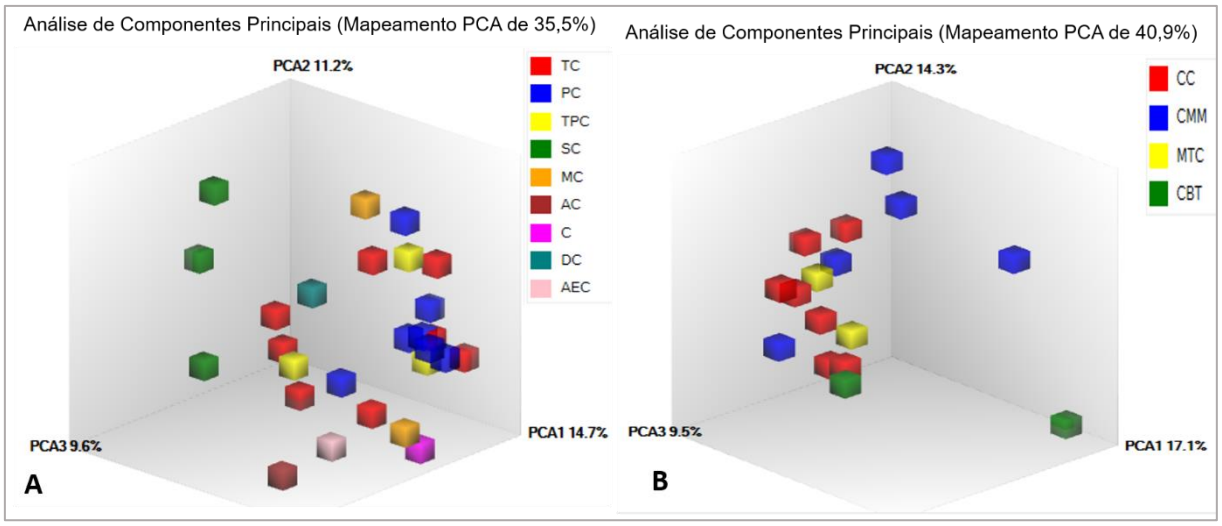


Figura 2. Análise de componente principal representativo de assinaturas de expressão gênica de carcinomas mamários caninos, avaliada pelo *software Expression Console*. **A.** Subtipos de carcinomas simples (N=28). **B.** Subtipos de carcinomas mistos (N=16). TC = carcinoma tubular, PC = carcinoma papilífero, TPC = carcinoma tubulopapilífero, SC = carcinoma sólido, MC = carcinoma micropapilar, AC = carcinoma anaplásico, C = comedocarcinoma, DC = carcinoma ductal, AEC = carcinoma adenoesquamoso, CC = carcinoma complexo, CMM = carcinoma e mioepitelioma maligno, MTC = carcinoma do tipo misto e CBT = carcinoma em tumor misto benigno.

Dados clínicos e histopatológicos referentes as amostras de carcinomas mamários como *status* reprodutivo, grau de malignidade tumoral, tamanho do tumor e presença de metástase foram avaliados para o PCA, a fim de se avaliar se haviam assinaturas gênicas específicas associadas com essas características, no entanto, não foi observado agrupamento relacionado com nenhuma dessas variáveis (Figura 3).

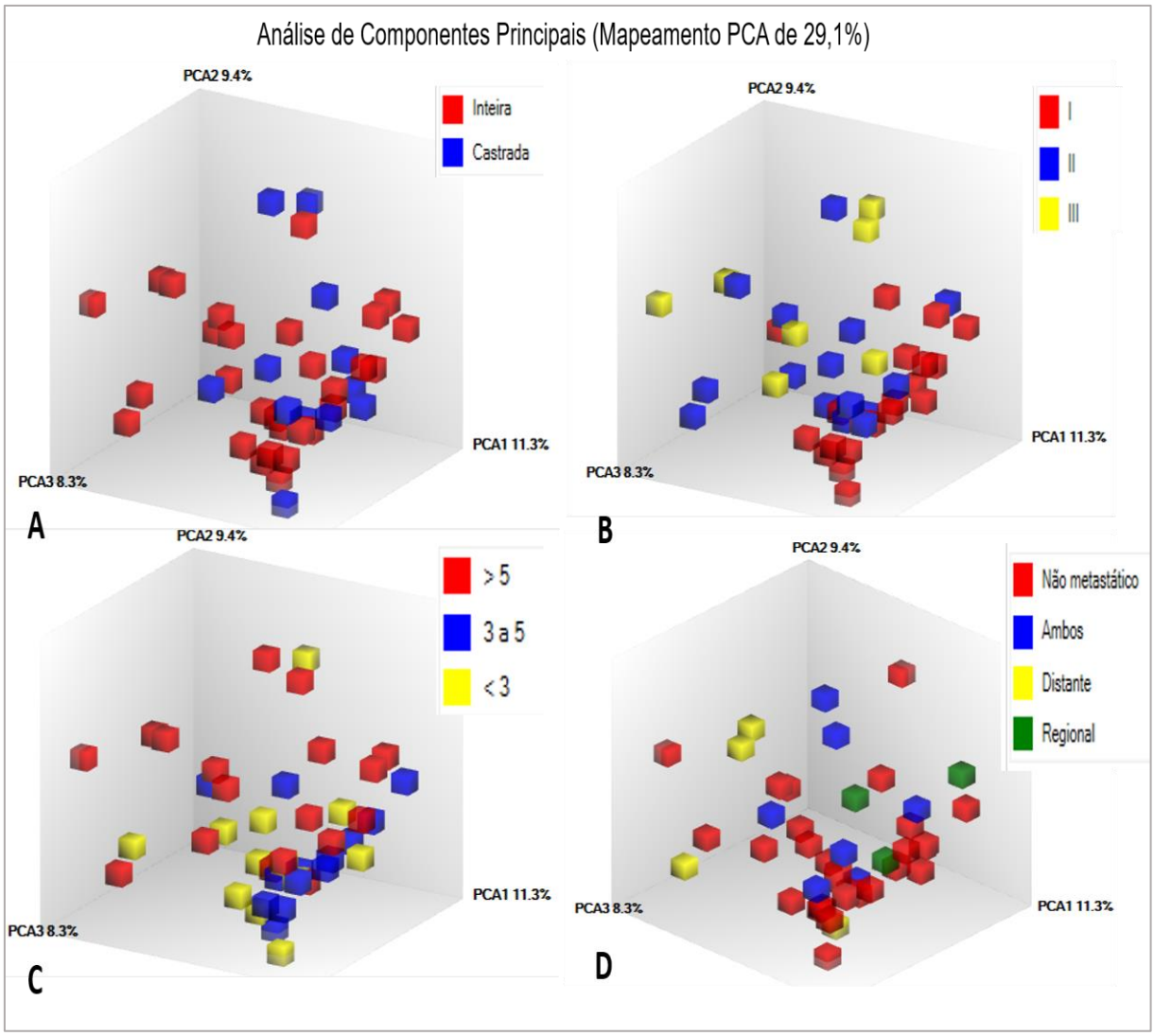


Figura 3. PCA representativo de assinaturas de expressão gênica entre características clínicas e histopatológicas relacionadas a amostras de carcinomas mamários caninos, avaliado pelo *software Expression Console*. **A.** *Status* reprodutivo. **B.** Grau de malignidade tumoral. **C.** Tamanho tumoral (cm). **D.** Metástases de carcinomas mamários. Não foi observado agrupamento relacionando nenhum dado clínico e histopatológico.

As características clínicas como tamanho tumoral e presença de metástases regional e/ou a distância, bem o grau histológico são considerados importantes fatores prognósticos para as neoplasias mamárias, assim tumores acima de 5 cm e estádios 4 e 5 estão normalmente relacionados com comportamento mais agressivos (YAMAGAMI et al., 1996; SORENMO, 2003; CHANG et al., 2005; SORENMO et al., 2011; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013; DE ARAÚJO et al., 2015). No entanto, não foi possível identificar um perfil gênico tumoral característico para cada uma dessas informações clínicohistopatológica avaliadas, confirmando a

heterogeneidade desses tumores e a complexidade na obtenção de informações prognósticas (PEÑA et al., 2012).

5.4.2 Análises computacionais de dados de *microarray*

A comparação das amostras tumorais (benigno e maligno) com as amostras de mamas normais evidenciou 911 genes diferencialmente expressos (GDEs), sendo que 371 genes estavam regulados positivamente e 540 genes apresentaram diminuição da expressão (Figura 4). Na comparação entre tumores benignos e amostras de tecido mamário normal foram encontrados 1010 genes diferencialmente expressos (438 genes com aumento de expressão e 572 genes com expressão diminuída) (Figura 5A), enquanto 896 genes estavam diferencialmente expressos entre tumores malignos e glândula mamária normal, sendo que 362 estavam com a expressão aumentada e 534 apresentaram diminuição de expressão (Figura 5B). Assim, verificou-se um número bastante expressivo de genes diferencialmente expressos na comparação de amostras tumorais, benigno ou maligno, em relação as amostras de glândulas mamárias normais, sugerindo a participação gênica no processo de progressão tumoral.

No entanto, a avaliação entre tumores malignos e benignos evidenciou apenas 34 genes diferencialmente expressos (20 genes com expressão aumentada e 14 genes com expressão diminuída) (Figura 6), mostrando pouca diferença no perfil gênico, possivelmente pela avaliação conjunta de distintos tipos histológicos, estando relacionados tanto com comportamento de baixa e alta agressividade.

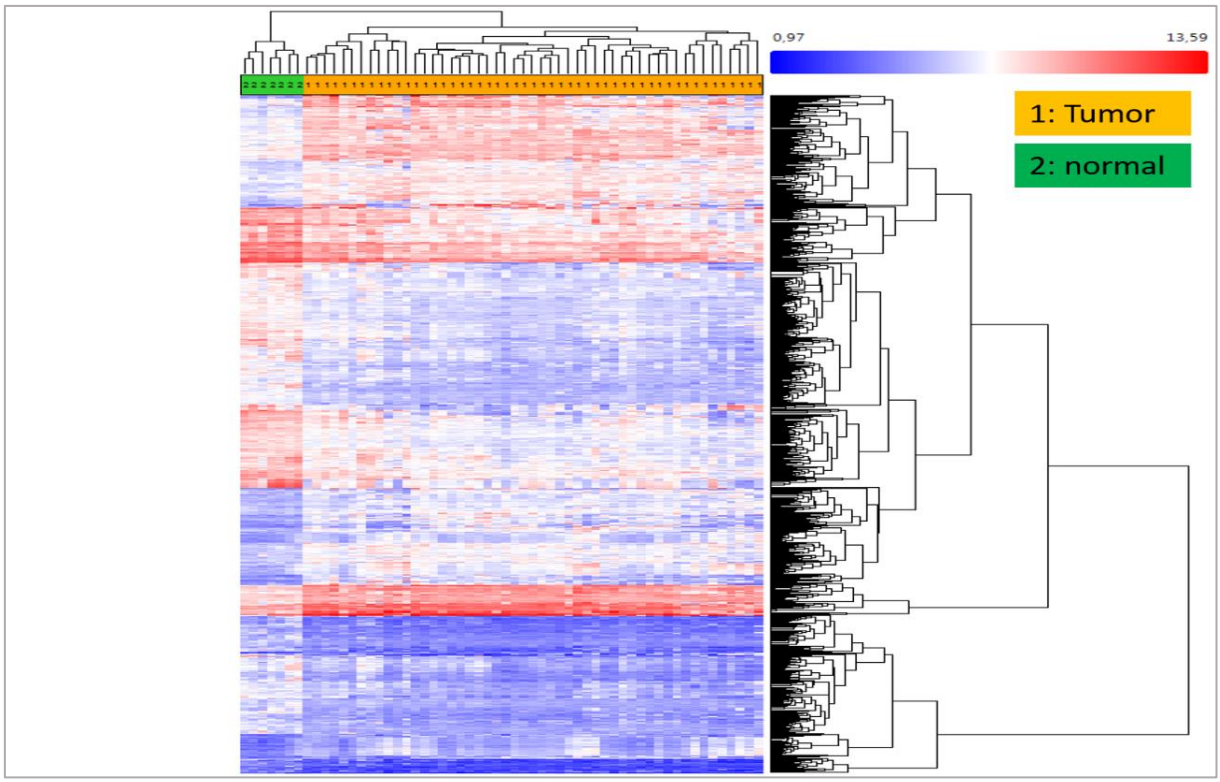


Figura 4. Dendograma representativo das assinaturas de expressão gênica entre as amostras tumorais (tumores benignos e malignos) e as amostras de glândulas mamárias normais de fêmeas caninas. Representação de 911 genes diferencialmente expressos entre ambos grupos. As diferenças relativas de expressão gênica estão representadas pela intensidade de coloração em que o gene se encontra, sendo que o aumento relativo da expressão gênica se apresenta em vermelho e a baixa expressão em azul. O grupo 1 refere-se as amostras tumorais (amarelo) e o grupo 2 as mamas normais (verde).

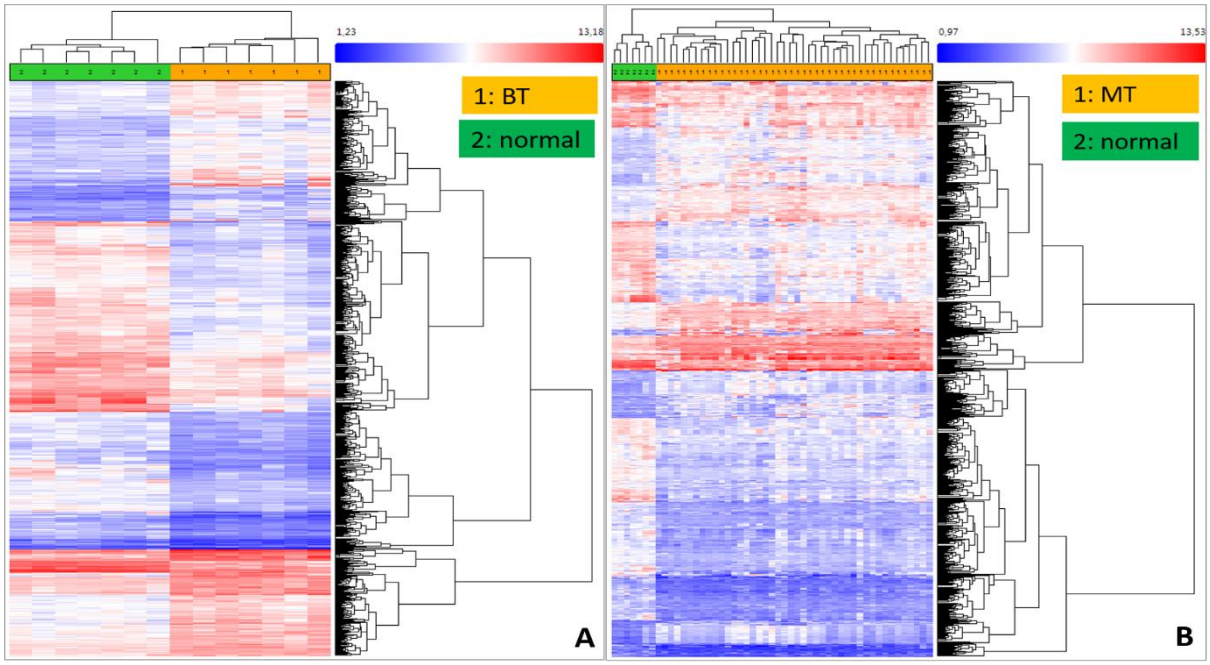


Figura 5. Dendograma representativo das assinaturas de expressão gênica entre amostras de tecidos mamários de fêmeas caninas. **A.** Representação de 1010 genes diferencialmente expressos entre tumor benigno (BT) e mama normal (normal). **B.** Representação de 896 genes diferencialmente expressos entre tumor maligno (MT) e mama normal. Estão representadas as assinaturas específicas de cada grupo com a correspondente barra de intensidade (valores absolutos). Aumento (vermelho) e diminuição (azul) da expressão gênica relativa.

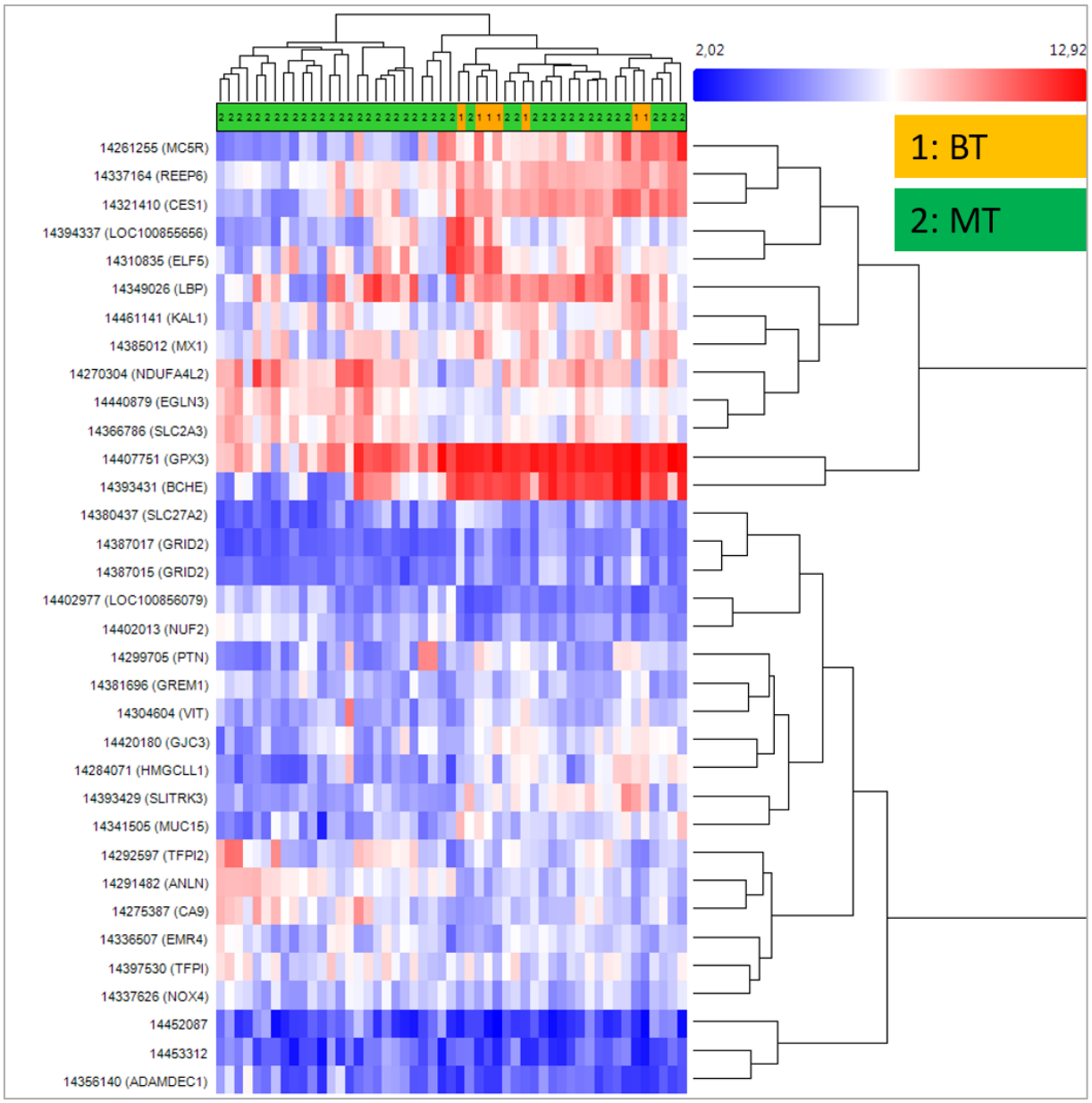


Figura 6. Dendograma representativo das 34 assinaturas de expressão gênica entre amostras de tumores benignos e de tumores malignos. Verificam-se diferentes agrupamentos entre essas amostras tumorais, apresentando diferenças no perfil de expressão gênica. O aumento da expressão gênica está representado em vermelho e a diminuição em azul. O grupo 1 refere-se as amostras de tumores benignos (BT), representado em amarelo e o grupo 2, as mamas de tumores malignos (MT), em verde.

5.4.3 Análise clusterizada hierárquica não supervisionada

A seguir, os resultados obtidos pelo *microarray* de cada amostra foram submetidos à análise não supervisionada, a fim de verificar se existia algum perfil

gênico que caracterizasse as amostras em um determinado grupo, pela presença de alguma característica, clínica e/ou histopatológica, específica.

Assim, observou-se um perfil de expressão gênica semelhante (agrupamento) caracterizando dois grupos, um composto por amostras de glândulas mamárias normais (N=7), representados pela barra verde e outro correspondendo a amostras de carcinomas mamários metastáticos (N=9), representados pela barra azul. As outras amostras não se encaixaram em nenhum agrupamento característico específico. Algumas amostras de tumores benignos e malignos foram agrupadas juntas (barras em vermelho, N=16 e em amarelo, N=12) e, nenhum dado clínico e/ou histopatológico que pudesse estar associado com esse agrupamento foi observado. Algumas amostras tumorais não apresentaram nenhum tipo de agrupamento, mostrando perfil molecular individual (N=14) (Figura 7).

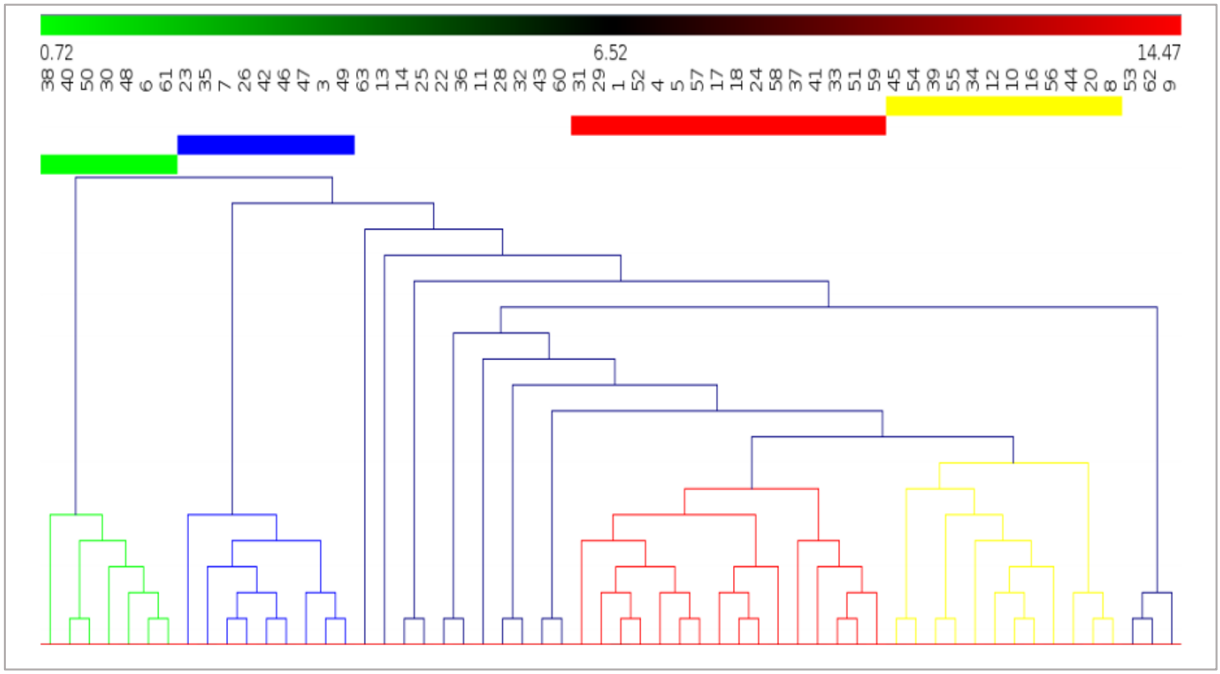


Figura 7. Esquema de representação de assinaturas de expressão gênica das amostras de glândula mamária normal (N=7), tumor benigno (N=7), carcinoma simples (N=28) e carcinoma misto (N=16) avaliadas de forma não supervisionada. As cores de cada barra são indicativas de amostras que se agruparam por apresentarem perfil de expressão gênica semelhante. Em verde estão representadas as amostras de glândula mamária normal, em azul as amostras de carcinomas primários mamários metastáticos e, em vermelho e amarelo estão presentes amostras de tumores benignos e malignos que apesar de estarem agrupadas, não apresentam características clínicas e/ou histopatológicas reconhecidas e que justifiquem esse agrupamento.

Nesse contexto, verificou-se que todas as amostras pertencentes ao grupo azul, apresentaram tamanho tumoral superior à 5 cm e metástases regional e/ou à distância, com exceção de uma amostra que no momento do diagnóstico apresentava tumor <3 cm, e teve diagnóstico de carcinoma tubular grau II; esse animal não teve acompanhamento clínico por não comparecer a nenhum retorno e também não foi possível obter informações desse paciente por telefone, de forma que não foi determinado se apresentou ou não metástase.

As amostras marcadas em vermelho correspondem a 16 casos, sendo duas amostras de tumores benignos (ambas com diagnóstico de adenoma complexo), enquanto as amostras de tumores malignos correspondem aos subtipos carcinomas simples: carcinoma tubular, papilífero e tubulopapilífero, grau I, de estadiamento clínico entre 1 a 3 e carcinomas mistos com os subtipos carcinoma complexo, carcinoma do tipo misto e carcinoma e mioepitelioma maligno, grau de malignidade I ou II e estadiamento clínico de 1 a 3. A semelhança que poderia estar associada com esse grupo seria o baixo grau de malignidade desses tumores.

As amostras marcadas em amarelo correspondem, por sua vez, por três amostras de tumores benignos, cinco amostras de carcinomas simples (carcinoma tubular, papilífero e micropapilar) e quatro amostras de carcinomas mistos (carcinoma complexo, carcinoma do tipo misto e carcinoma e mioepitelioma maligno). O grau desses tumores eram I ou II e estadiamento clínico 1 a 3, com exceção da amostra de carcinoma micropapilar que apresentou metástase em linfonodo regional, sendo considerada de estadiamento clínico 4.

As outras 14 amostras não se enquadraram em nenhum perfil de expressão gênica semelhante. Dessas, uma amostra era de hiperplasia mamária e ectasia ductal, nove amostras de carcinomas simples, compostas por amostras de carcinoma sólido (4), carcinoma tubular (3), carcinoma papilífero (1) e carcinoma ductal (1) e quatro de carcinomas mistos (carcinoma e mioepitelioma maligno, carcinoma complexo, carcinoma em tumor misto benigno e carcinoma do tipo misto), sendo verificados grau I a III, tamanho tumoral T1 a T3, um paciente com tumor classificado como carcinoma tubular grau I apresentou metástase a distância e outro com carcinoma e mioepitelioma maligno grau II desenvolveu metástase regional.

5.5 Seleção de grupos amostrais para análise de expressão gênica em larga escala

A seguir, foram realizadas novas análises de expressão gênica global entre as amostras de mamas normais, tumores mamários benignos e malignos, porém, considerando como pertencentes ao grupo maligno apenas as amostras tumorais que apresentaram pelo menos uma das seguintes características: grau de malignidade tumoral II ou III e/ou estádio clínico III, IV ou V, com objetivo de selecionar as amostras que apresentassem, clinicamente, maior agressividade e obtendo um grupo mais homogêneo, para reduzir os viés encontrados na primeira análise. Desse modo, foram consideradas para essa nova análise, 15 amostras de tumores malignos.

Tumores com comportamento menos agressivo, podem apresentar características morfológicas e comportamento clínico semelhantes aos tumores benignos, podendo inclusive em alguns casos, haver divergências entre os patologistas quanto a classificação desses tumores. Segundo Goldshmidt et al. (2011), o principal problema relacionado com a avaliação dos tumores mamários malignos consiste na identificação de tumores que realmente sejam malignos. Esse fato associado ao comportamento clínico semelhante aos tumores benignos podem justificar as semelhanças encontradas no agrupamento de algumas amostras de tumores malignos com os tumores benignos na primeira análise.

Além dessa análise, foi avaliado o perfil de expressão gênica em larga escala entre as amostras de carcinomas mamários não metastáticos (N=35) e carcinomas mamários primários metastáticos (N=6), essas últimas amostras foram selecionadas de acordo com os resultados obtidos pela análise não supervisionada das amostras representadas pela barra azul (Figura 7), para pesquisa de genes diferencialmente expressos e relacionados com o desenvolvimento de metástases.

5.5.1 Análise entre tumores mamários malignos, benignos e mama normal

A partir desse novo grupo de tumores malignos, foi realizada a análise de PCA comparando esse grupo com as amostras de glândulas mamárias normais e tumores benignos, pelo programa *Expression Console.* Evidenciou-se agrupamento das amostras de mamas normais e dos tumores benignos, enquanto as amostras de

tumores malignos apresentaram-se dispersas, mostrando diferenças no perfil de expressão gênica entre as amostras desse grupo, possivelmente pela heterogeneidade desses tumores quanto aos tipos histológicos e as características clínicas e histológicas (Figura 8).

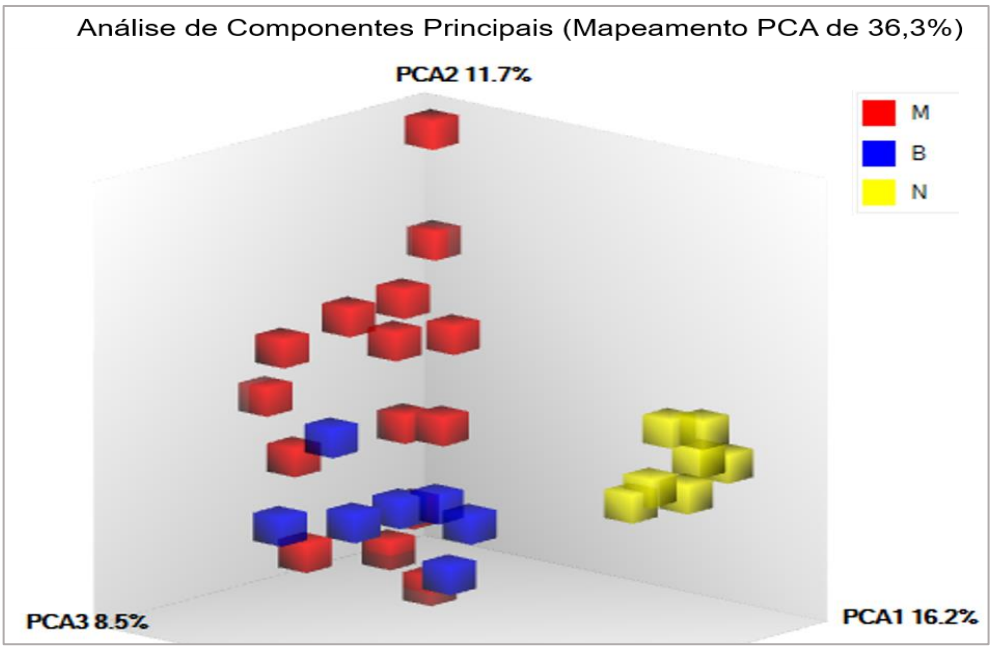


Figura 8. Análise de componente principal representativo de assinaturas de expressão gênica entre amostras de glândulas mamárias normais (N), tumores benignos (B) e tumores malignos (M) de fêmeas caninas. Observa-se agrupamento das amostras de tecidos mamários normais e uma proximidade de expressão gênica entre os tumores benignos, enquanto as amostras de tumores malignos encontram-se dispersas.

A análise de genes diferencialmente expressos avaliada pelo programa *Transcriptome Analysis Console* (TAC) evidenciou 1297 genes diferencialmente expressos entre os tumores malignos e as mamas normais, sendo que 531 genes apresentaram aumento de expressão e 766, diminuição. Enquanto, em relação aos tumores malignos e benignos verificou-se 465 genes diferencialmente expressos (166 genes apresentaram aumento de expressão e 299 genes com expressão diminuída). A análise de agrupamento hierárquico supervisionado (significância estatística para $p<0,05$, FDR de 5% e FC ≤ -2 e ≥ 2) revelou diferenças significativas entre os grupos amostrais, tanto na comparação dos tumores malignos com as mamas normais, como em comparação com os tumores benignos (Figura 9).

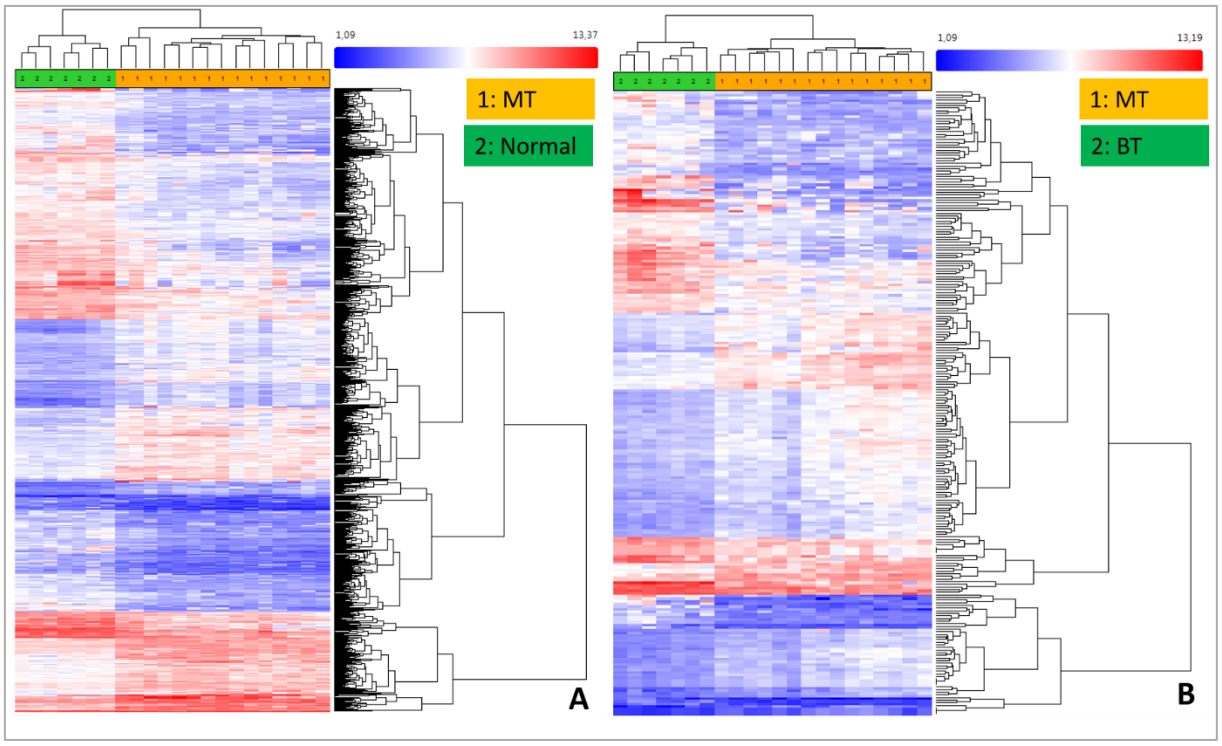


Figura 9. Dendograma representativo das assinaturas de expressão gênica entre amostras de tecidos mamários de fêmeas caninas. **A.** Representação de 1297 genes diferencialmente expressos entre tumor maligno (MT) e mama normal (Normal). **B.** Representação de 465 genes diferencialmente expressos entre tumor maligno (MT) e tumor benigno (BT). Estão representadas as assinaturas específicas de cada grupo com a correspondente barra de intensidade (valores absolutos), em vermelho está caracterizado o aumento da expressão gênica e em azul, a diminuição da expressão.

Os genes diferencialmente expressos entre as amostras de tumores benignos e malignos e de glândulas mamárias normais foram submetidos à análise de redes, vias gênicas, doenças relacionadas e função celular e/ou molecular e vias de interação pela utilização do *software Ingenuity Pathways Analysis* (IPA).

As principais vias canônicas relacionadas com os GDEs entre os tumores benignos e malignos em relação as mamas normais foram as vias de sinalização de inibidores de matriz de metaloproteinases, da fibrose hepática, de extravasão de leucócitos, de sinalização dos receptores de células T, entre outras representadas na Figura 10. Além dessas funções, também foi verificada a participação de genes diferencialmente expressos entre esses grupos na via de desenvolvimento de várias doenças e determinadas funções celulares e biológicas, destacando-se o câncer, proliferação e crescimento celular, doenças do sistema cardiovascular, do sistema hematológico e do sistema reprodutivo (Figura 11).

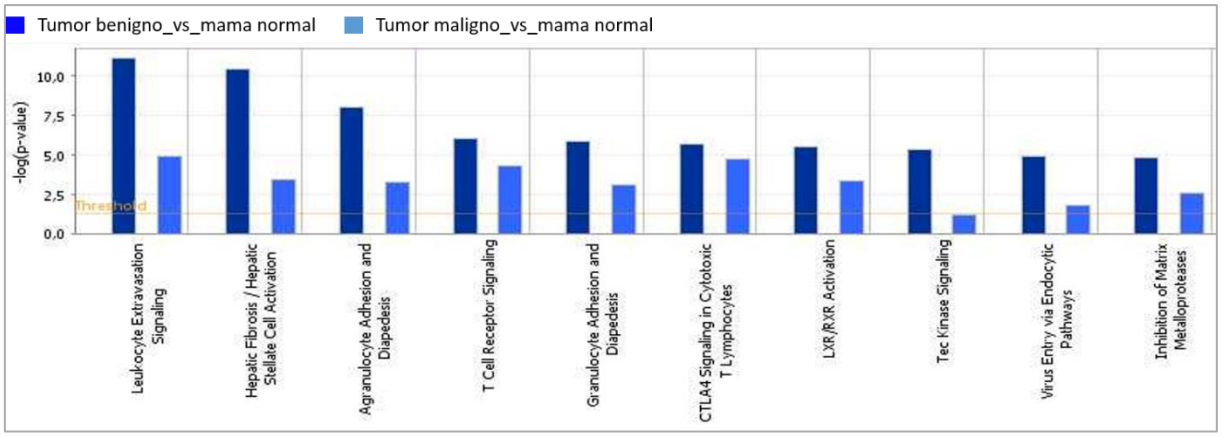


Figura 10. Principais vias canônicas associadas aos tumores benignos e as mamas normais (azul escuro) e entre os tumores malignos e as mamas normais (azul claro).

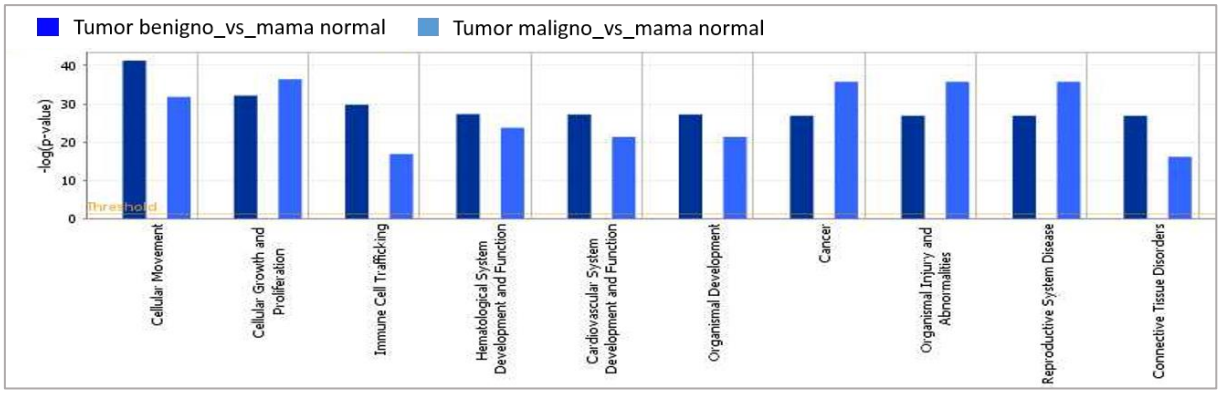


Figura 11. Principais vias gênicas relacionadas às doenças e funções celulares/biológicas entre os tumores benignos e as mamas normais (azul escuro) e entre os tumores malignos e as mamas normais (azul claro).

As 15 principais vias canônicas relacionadas com cada grupo foram identificadas, considerando como critério de seleção valores de $p<0,05$.

Dentre as vias avaliadas para os tumores benignos e as mamas normais destacam-se a via de sinalização da Tec quinase, extravasão de leucócitos e via de sinalização de resposta à fase aguda (Figuras 12A e 13, Tabela 4).

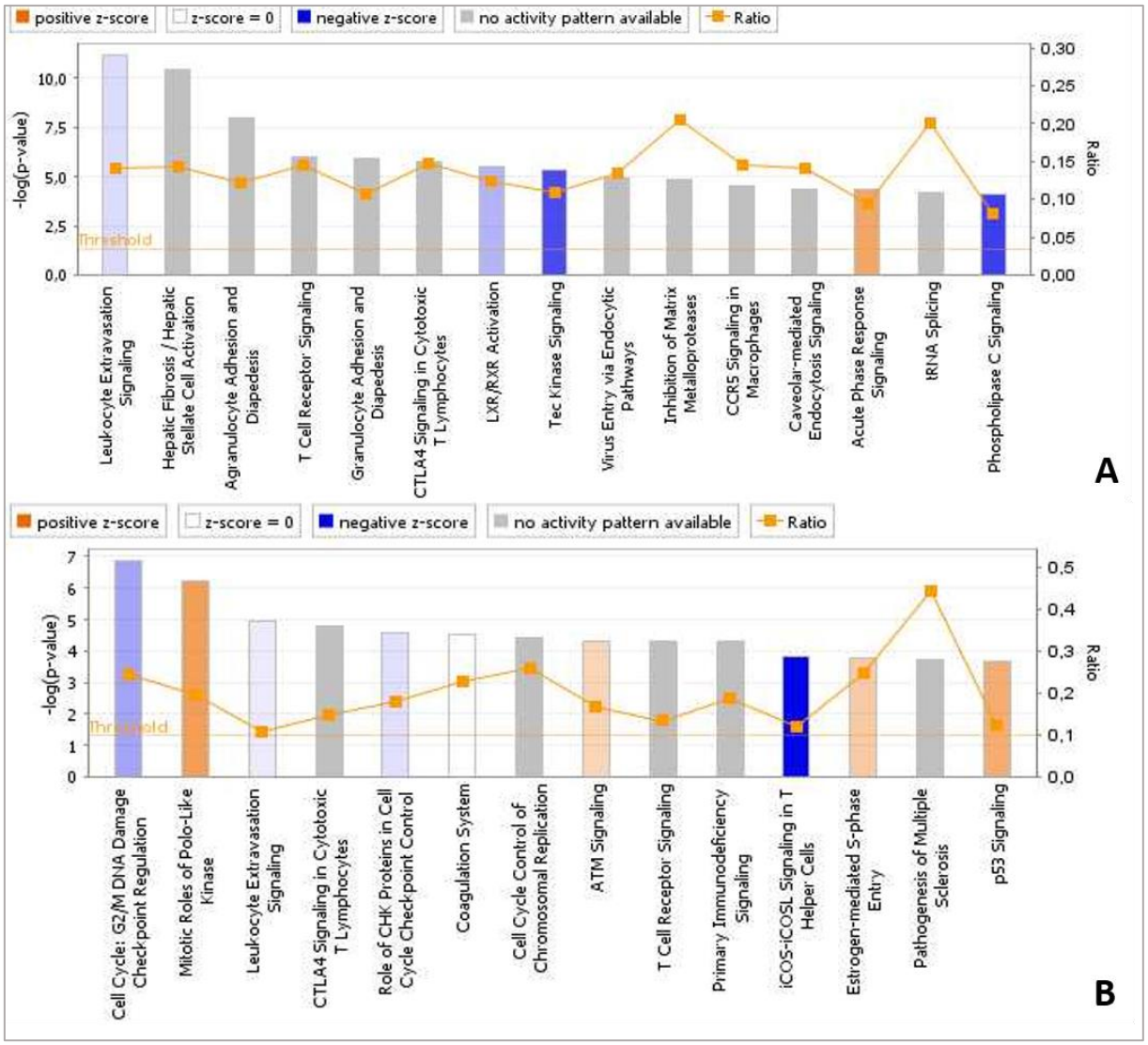


Figura 12. Representação das 15 principais vias canônicas relacionadas com amostras de tecidos mamários caninos, identificadas pelo IPA. **A.** Tumores benignos e mamas normais. **B.** Tumores malignos e mamas normais. Interação positiva representada em laranja e interação negativa em azul.

Tabela 4. Vias canônicas relacionadas com os genes diferencialmente expressos entre os tumores mamários benignos e as mamas normais. Programa IPA, p<0,05. Dentre os transcritos encontrados, observou-se o envolvimento de vários genes da família das metaloproteinases (em negrito) envolvidos na via de extravasão de leucócitos.

Vias canônicas	Transcritos encontrados
Extravasão de leucócitos	CXCL12,ITGAL,CLDN7,**MMP9**,SIPA1,**MMP12**,PRKCQ,ITGA2,TIMP4,VCAM1,DLC1,ITK,PRKCB,ACTG2,JAM2,ARHGAP6,**MMP13**,EDIL3,TXK,TIMP2,CDH5,PIK3CG,PLCG2,**MMP7**,**MMP27**,IT
Sinalização da Tec quinase	PRKCQ,ITGA2,RHOD,RHOJ,TXK,PLCG2,PIK3CG,FOS,FYN,LCK,ITK,TNFSF10,PRKCB,ITGA4,FAS,ITGA5,ACTG2

Sinalização de reposta à fase aguda	ITIH4,TF,C3,CP,RBP7,TCF4,LBP,RBP4,C1R,PIK3CG,OSMR,FOS,FN1,F8,VWF,HPX

Os inibidores de quinases têm sido amplamente estudados devido ao interesse na utilização desses inibidores como alvos terapêuticos. A Tec quinase pertence à família das tirosinas quinases e junto com outras quinases é responsável pela sinalização de receptores de células T (NATARAJAN et al., 2016). Em mulheres foi identificado um importante papel de um de seus membros (Bmx quinase) envolvidos com o desenvolvimento do câncer de mama e outras neoplasias. Além disse o Bmx mostrou potencial efeito terapêutico anti-vascular quando associado com outras terapias como radioterapia e quimioterapia (JARBOE et al., 2013). Outras drogas mostraram efeitos sobre essa via, como drogas imunossupressoras bloqueando a sinalização de receptores das células T.

A via de extravasão leucocitária mostrou a participação de genes da família das metaloproteinases (MMP) e inibidores de metaloproteinases, como a MMP9, TIMP2, os quais já foram descritos apresentando papel importante na carcinogênese dos tumores mamários caninos e no câncer de mama de mulheres (FÜRSTENBERGER et al., 2006; NOWAK M, MADEJ JA, PODHORSKA-OKOLOW M, 2008; HU et al., 2009; DA COSTA et al., 2011; KIM et al., 2011; QIAO et al., 2013).

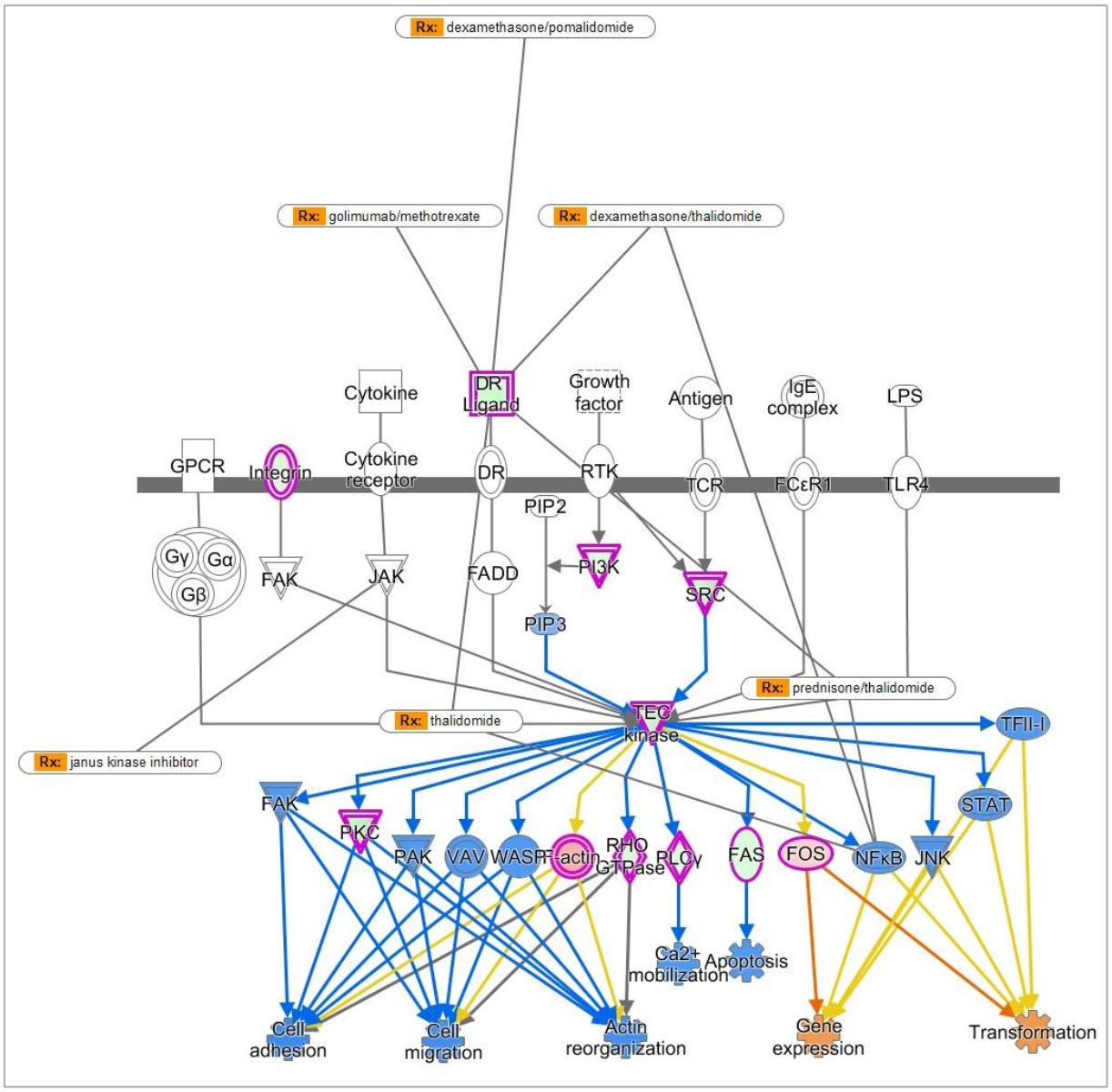


Figura 13. Representação esquemática da via de regulação da Tec Kinase. Os genes com expressão diminuída estão representados em azul. A linha azul indica predição de inibição, a laranja indica predição de ativação e a amarela indica achados de interação inconsistentes baseados na literatura. Estão representados também ação de algumas drogas contra determinados alvos presentes nessa via. Os diferentes formatos dos “nós” constituem a classe funcional do produto do gene.

Em relação as vias canônicas entre os tumores malignos e as mamas normais destacam-se as vias de sinalização dos supressores tumorais p53 e ATM (Figuras 12B e 14).

Esses genes supressores apresentam importante papel no carcinogênese do câncer de mama nas mulheres. O gene mutado ataxia telangectasia (*ATM*) é um transdutor primário a resposta aos danos do DNA e, tem papel de fosforilação de

proteínas relacionadas a pontos de checagem de dano ao DNA, permitindo a parada do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose (morte celular programada) (JIANG et al., 2009; BENSIMON; AEBERSOLD; SHILOH, 2011). Assim, a proteína quinase do ATM quando acionada recruta e fosforila uma variedade de proteínas envolvidas em todas as três respostas à injúria ao DNA como H2AX, MDC1, Rad50, Nbs1, Chk2, p53, MDM2, CHEK2, BRCA1 (DOMBERNOWSKY et al., 2008; JIANG et al., 2009; LALLOO; EVANS, 2012). Muitos desses genes podem ser observados na via canônica de sinalização do ATM entre as amostras de tumores mamários malignos e as mamas normais desse estudo, apresentando diferenças de expressão entre esses grupos.

Quando mutado, o ATM está associado ao desenvolvimento da doença autossômica recessiva rara conhecida como ataxia telangiectasia (AT), que se caracteriza pelo desenvolvimento de ataxia cerebelar, telangiectasias oculares, deficiência imunológica, radiossensibilidade, diabetes insulino-resistente, envelhecimento precoce e predisposição ao câncer, inclusive ao câncer de mama (TERAOKA et al., 1999; CUATRECASAS et al., 2006; PROKOPCOVA et al., 2007; LAVIN, 2008; BHATTI et al., 2011; BUENO et al., 2014). Em mulheres, já foram descritas mais de 400 mutações no *ATM* causadoras de doença, sendo que cerca de 70% delas resultaram em terminação prematura da tradução, sintetizando proteínas incompletas (RENWICK et al., 2006). Além disso, mutações neste gene também foram associadas ao desenvolvimento de câncer de mama em famílias (RENWICK et al., 2006; RIPPERGER et al., 2009; TAVTIGIAN et al., 2009; BOZHANOV et al., 2010).

Em carcinomas mamários esporádicos de mulheres foi observada baixa expressão gênica e proteica (YE et al., 2007; TOMMISKA et al., 2008; BUENO et al., 2014), possivelmente por mecanismos pós transcricionais, através do envolvimento de microRNAs (SONG et al., 2011; BUENO et al., 2014). Resultados semelhantes foram observados em cadelas por nosso grupo de pesquisa, sendo verificada diminuição da expressão gênica e proteica do ATM em carcinomas mamários quando comparados com glândulas mamárias normais (RAPOSO-FERREIRA et al., 2016), mostrando o importante papel do ATM tanto na carcinogênese dos tumores mamários de mulheres como de cadelas. Assim, apesar desse gene especificamente não compor a lista de genes diferencialmente expressos entres os grupos avaliados desse

estudo, indiretamente ele é importante no controle de outros supressores tumorais que podem ter um papel importante, de forma semelhante, no desenvolvimento do câncer de mama, como o p53 e o BRCA1, os quais têm sido bastante estudado no câncer de mama de mulheres e apontados como importantes genes de predisposição ao desenvolvimento dessa neoplasia, quando mutados.

Mutações no gene *TP53* em mulheres apesar de serem raras, estão associadas com um alto risco de desenvolvimento do câncer de mama e com tumores mais agressivos, de pior prognóstico (NICHOLS et al., 2001; BOZHANOV et al., 2010; LALLOO; EVANS, 2012). Mutações neste gene estão presentes em cerca de 15 a 40% dos tumores esporádicos e na linhagem germinativa de pacientes com Síndrome de Li-Fraumeni, síndrome hereditária associada ao câncer de mama nas mulheres (EISENBERG; KOIFMAN, 2001; LALLOO; EVANS, 2012).

O aumento da proteína p53 em tumores mamários de mulheres também foi associado com comportamento mais agressivo (EISENBERG; KOIFMAN, 2001), enquanto a marcação positiva dessa proteína em tumores mamários benignos foi relacionada com o aumento do risco ao desenvolvimento do câncer de mama (ROHAN et al., 1998). Em cadelas, análises de expressão da proteína p53 mostraram resultados contraditórios, Terra et al. (2012) não observou aumento de expressão estatisticamente significativa quando comparado amostras de carcinomas mamários com mamas normais, enquanto Lee et al. (2004) associaram tanto a mutação do TP53 quanto o aumento da expressão de sua proteína como fatores preditores do aumento do potencial de malignidade dos tumores mamários e a um pior prognóstico.

Além disso, mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* conferem alto risco ao desenvolvimento de câncer de mama em mulheres, sendo estimado um risco de 47 a 66% e 40 a 57%, respectivamente, e o impacto sobre a sobrevida das pacientes com essas mutações ainda é controverso.(EOH et al., 2016; MAESHIMA et al., 2016). Em medicina veterinária ainda é pouco estudado o papel do BRCA no processo de tumorigênese de glândulas mamárias, devido à dificuldade de estudos familiais nessa espécie. Em cadelas, a avaliação de BRCA/RAD51 em amostras de carcinomas mamários primários e de linfonodos metastáticos sugeriu um aumento de expressão do RAD51 nas metástases, enquanto o BRCA não teve um aumento significativo (KLOPFLEISCH; GRUBER, 2009).

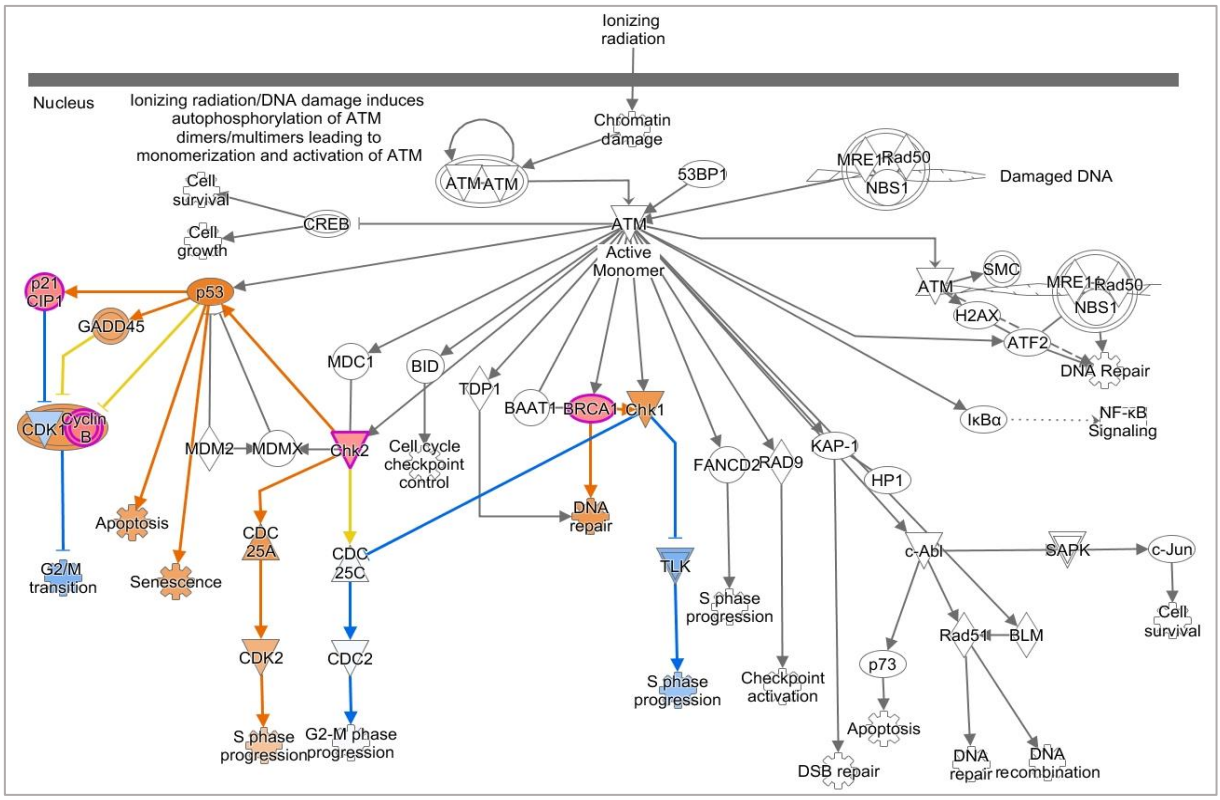


Figura 14. Representação esquemática da via de sinalização do gene supressor tumoral *ATM* (participando também da regulação de outros genes supressores tumorais como o *TP53* e o *BRCA1*) entre os tumores malignos e as mamas normais, identificados pelo IPA. Os genes com aumento de expressão estão representados em laranja e os genes com expressão diminuída estão em azul. A linha azul indica predição de inibição, a laranja indica predição de ativação. Os diferentes formatos dos "nós" constituem a classe funcional do produto do gene.

De forma semelhante, na avaliação entre os tumores mamários malignos e benignos foi verificada uma importante relação com a via de sinalização do gene supressor tumoral *BRCA-1*, além da via de sinalização do *ATM* (Figuras 15 e 16, Tabela 5).

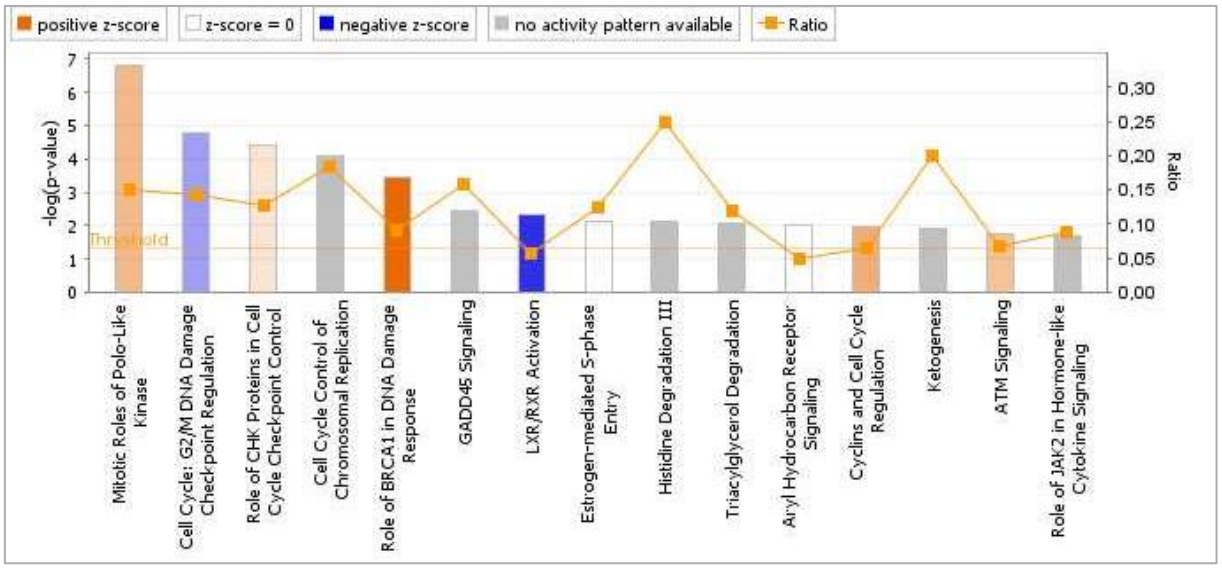


Figura 15. Vias canônicas identificadas pelo IPA, através dos genes diferencialmente expressos entre os tumores mamários malignos e os tumores benignos. Interação positiva em laranja e interação negativa em azul.

Tabela 5. Principais vias canônicas relacionadas com os genes diferencialmente expressos entre os tumores mamários malignos e benignos, identificadas pelo programa IPA, p<0,05. O gene BRCA1 está presente em várias dessas vias (em negrito).

Vias canônicas	Transcritos encontrados
Ciclo cellular: G2/M – regulação do ponto de checagem à injúria ao DNA	TOP2A,**BRCA1**,CHEK2,CDKN1A,HIPK2,PLK1,CCNB1
Papel de proteínas CHK no controle dos pontos de checagem do ciclo celular	**BRCA1**,CHEK2,CDKN1A,PPP2R2B,CLSPN,RFC4,PLK1
Papel do BRCA-1 na resposta ao dano ao DNA	BRIP1,**BRCA1**,CHEK2,CDKN1A,FANCM,RFC4,PLK1
Sinalização do GADD45	**BRCA1**,CDKN1A,CCNB1
Sinalização do ATM	**BRCA1**,CHEK2,CDKN1A,CCNB1

Em análise de expressão gênica e proteica do ATM em amostras de tumores mamários benignos e malignos de cadelas, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (RAPOSO-FERREIRA et al., 2016). Em mulheres, foi detectado diferenças na expressão do ATM entre amostras tumorais benignas e malignas, sugerindo uma correlação da perda de expressão desse marcador no desenvolvimento e progressão do câncer de mama (WAHA et al., 1998), embora em outro estudo, foi verificada ausência de correlação da expressão do ATM entre ambos

tipos tumorais, assim como observado nas cadelas (YE et al., 2007). Assim, a identificação desses supressores tumorais, tanto nas vias relacionadas com os tumores mamários malignos e as mamas normais, bem como com os tumores mamários malignos e tumores mamários benignos, sugerem um papel importante desses genes no desenvolvimento e na progressão dos tumores mamários, através de mecanismos que podem ser semelhantes ao observado nas mulheres, sendo necessária à validação de genes envolvidos nessas vias para comprovar esses mecanismos de ação tumoral.

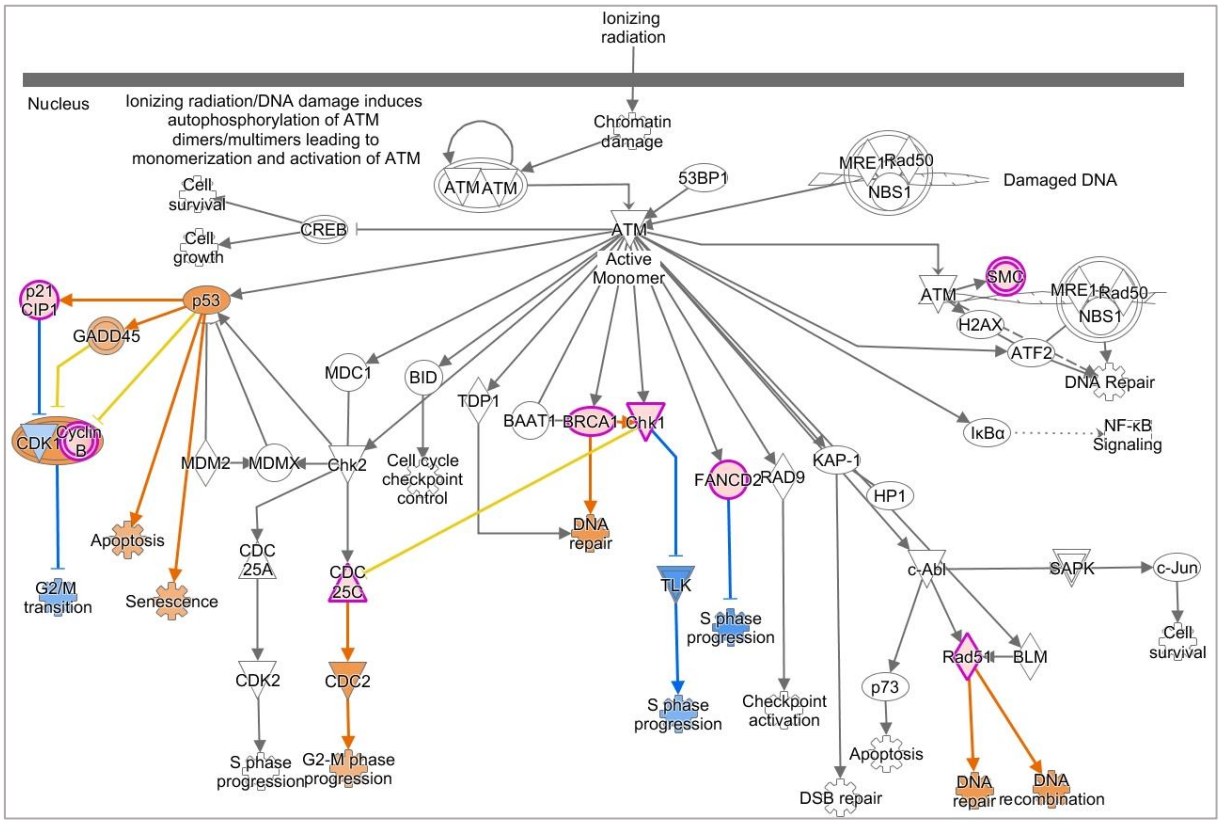


Figura 16. Representação esquemática da via de sinalização do *ATM* (supressor tumoral envolvido com a via de regulação de outros genes supressores tumorais como o *TP53* e o *BRCA1*, entre os tumores mamários malignos e os tumores mamários benignos, avaliados pelo programa IPA. Os genes com aumento de expressão estão representados em laranja e os genes com transcritos diminuídos estão em azul. A linha azul indica predição de inibição, a laranja indica predição de ativação e a amarela indica achados de interação inconsistentes baseados na literatura. Os diferentes formatos dos "nós" constituem a classe funcional do produto do gene.

Posteriormente, foi realizada uma nova análise através do Diagrama de Venn, considerando os valores de *fold change* ≤-3 e ≥3, a fim de restringir mais a seleção de

genes diferencialmente expressos entre os grupos e de identificar genes exclusivos de cada grupo. Desse modo, foram observados 88 genes diferencialmente expressos entre os tumores mamários benignos e as glândulas mamárias normais (antes 1010 genes), 141 genes entre os tumores mamários malignos e as mamas normais (antes 1297 genes) e 51 genes entre os tumores malignos e benignos (antes 465 genes), em comum aos três grupos observou-se apenas um gene (Figura 17).

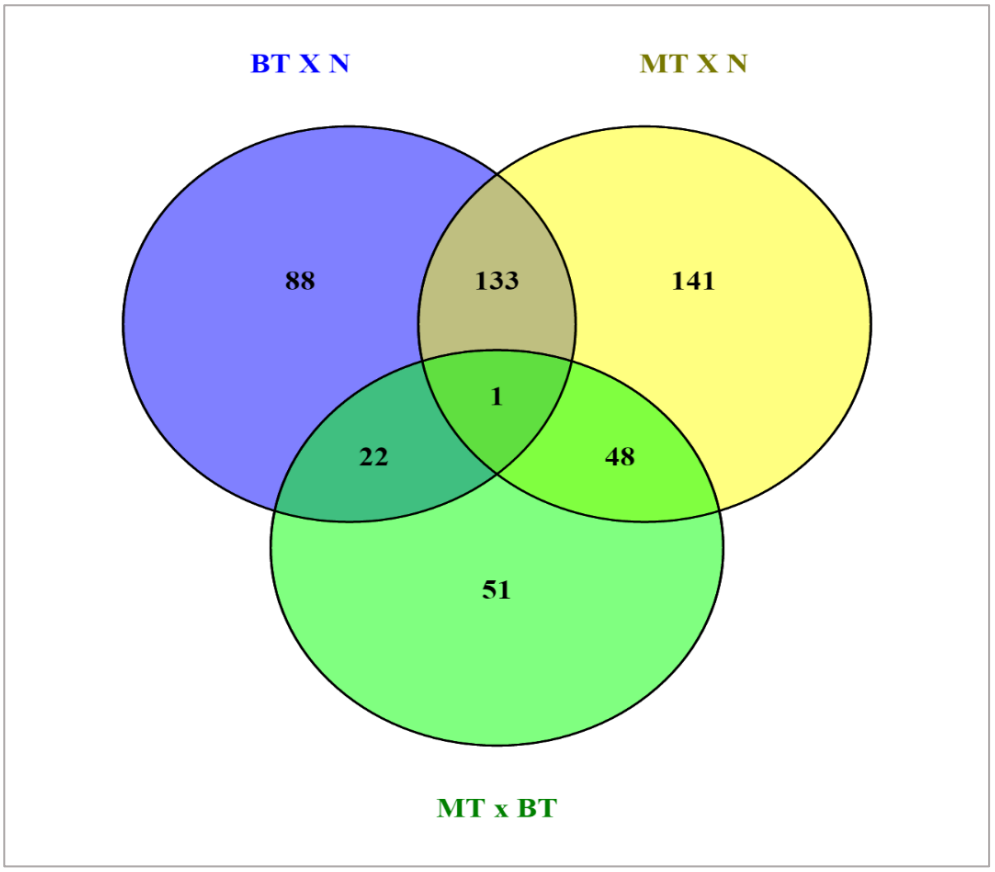


Figura 17. Diagrama de Venn mostrando o número de genes diferencialmente expressos comuns e exclusivos dos tumores mamários benignos, tumores mamários malignos e das glândulas mamárias normais. Os valores descritos no interior dos círculos indicam o número de genes expressos em cada grupo. A intersecção do diagrama indica os genes diferencialmente expressos em comum entre os grupos. BT = tumor benigno, MT = tumor maligno e N = mama normal.

Dentre os genes com expressão aumentada nos tumores mamários benignos em relação as mamas normais, foi encontrada a rede de interação proteica relacionada com o desenvolvimento da glândula mamária, sendo representada pelos

alvos SEMA3A, ERBB4,CSN2,PGR,ESR1,KLKB1, FOXA1, GATA3, ELF5 e XDH, identificada pelo programa String (Figura 18). Muitos desses alvos estão relacionados com vias de sinalização hormonal, e esse fator estaria de acordo com a literatura a respeito da importância da influência hormonal no desenvolvimento das neoplasias mamárias caninas (SCHNEIDER; DORN; TAYLOR, 1969; SORENMO, 2003; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013; CASSALI et al., 2014).

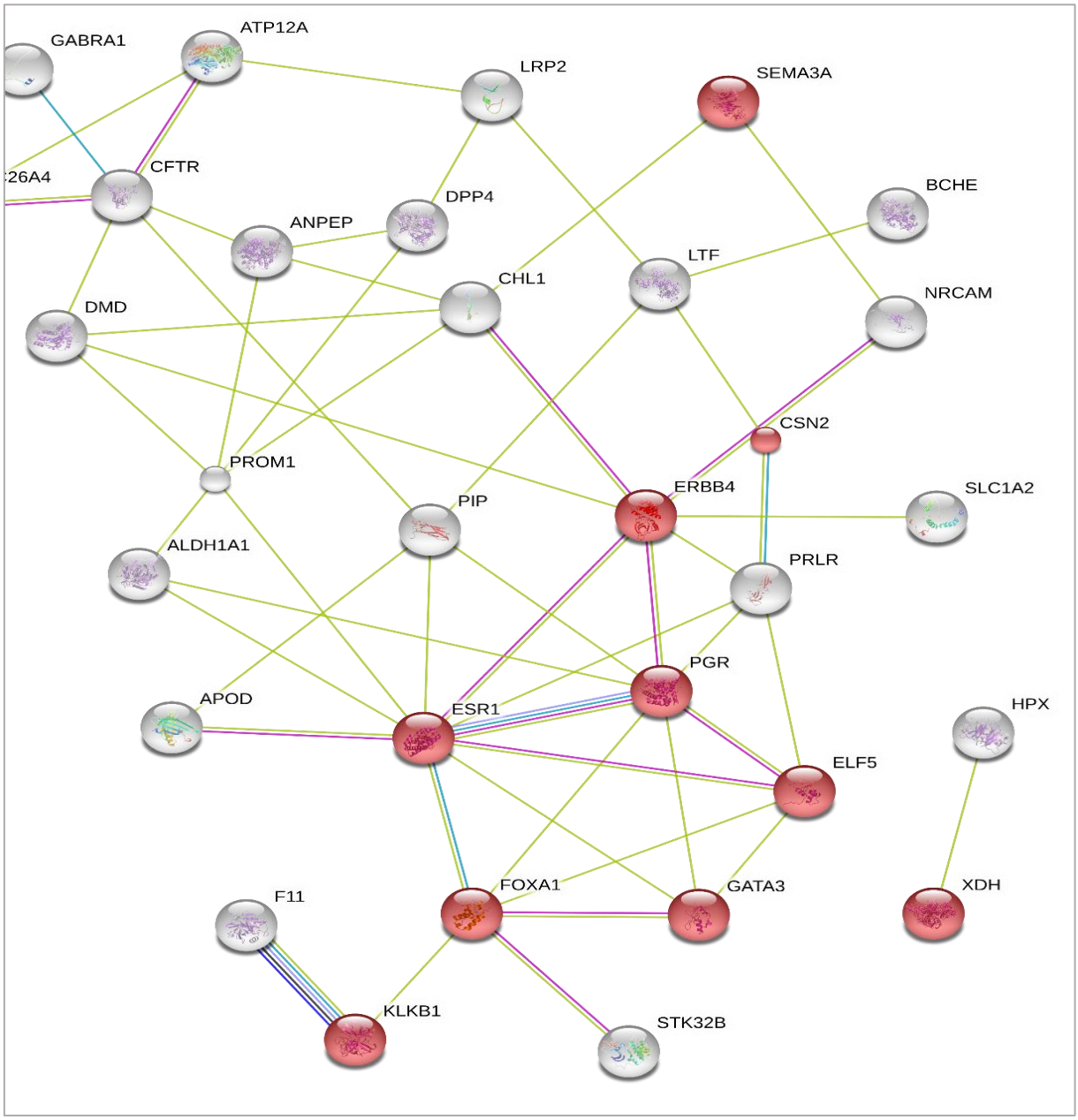


Figura 18. Rede de interação proteica relacionada com genes com expressão aumentada nos tumores mamários benignos em relação as mamas normais. As

proteínas em vermelho estão relacionadas com a função biológica de desenvolvimento da glândula mamária.

Em relação aos genes diferencialmente expressos entre os tumores mamários malignos e as mamas normais, verificou-se uma rede de interação proteica relacionada com a divisão celular, pelo programa String, representada pelos alvos ASPM, ANLN, ECT2, TOP2A, BUB1B, NUF2 e KIF 14 (Figura 19). A presença desses marcadores sugere a ocorrência da proliferação e progressão tumoral; funções biológicas importantes que podem estar relacionadas com tumores malignos de comportamento mais agressivo.

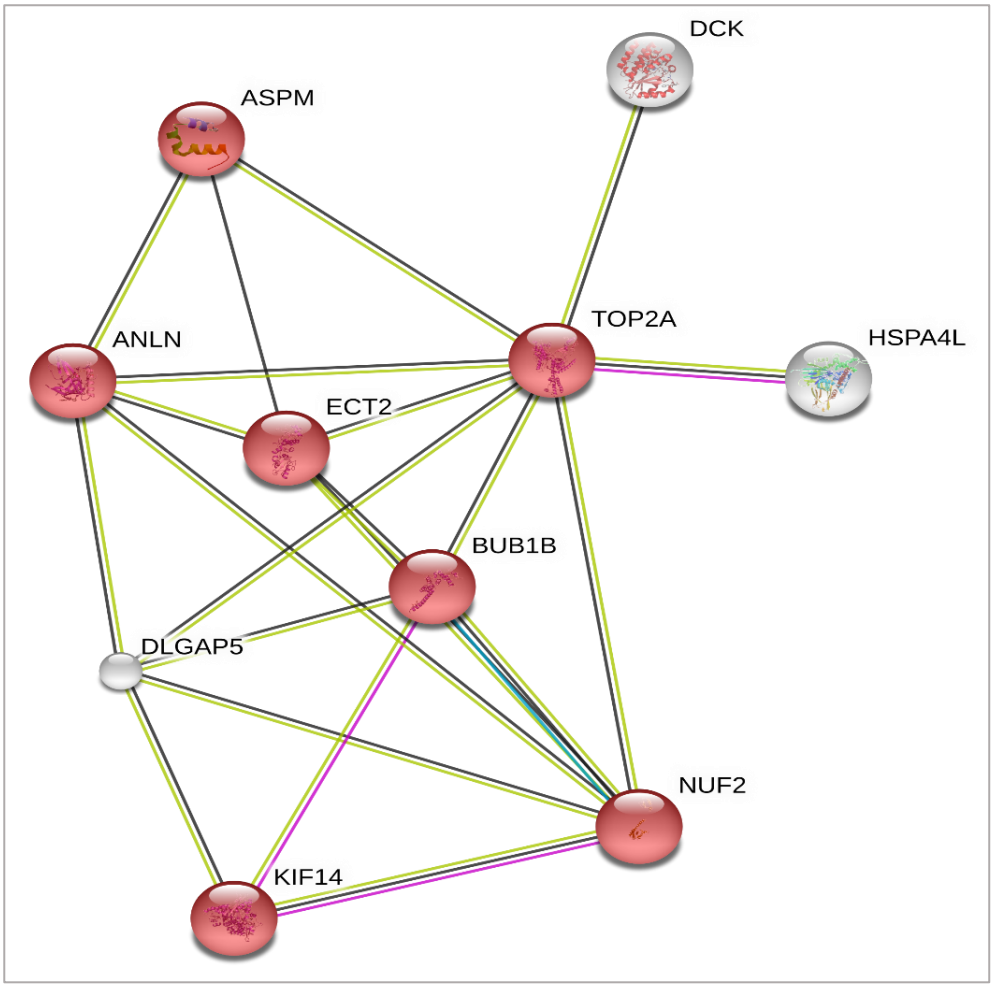


Figura 19. Rede de interação proteica entre os genes com expressão aumentada nos tumores mamários malignos em relação as glândulas mamárias normais. As proteínas em vermelho estão relacionadas com a função biológica de divisão celular.

A lista de genes diferencialmente expressos entre os tumores mamários malignos e benignos encontram-se na Tabela 6. Dentre eles destacam-se a presença de transcritos relacionados com o desenvolvimento do câncer e mecanismos de proliferação celular. A avaliação de genes exclusivos de tumores mamários malignos em relação aos benignos são fundamentais para o melhor entendimento dos mecanismos de tumorigênese e da progressão tumoral.

Tabela 6. Lista dos 51 GDEs obtidos pela comparação entre tumores mamários malignos e tumores mamários benignos.

Símbolo do gene	***Fold Change***
SQLE	3
TFPI2	3,01
HSPA4L	3,11
CD55	-3
TGFB3	-3
MX1	-3,01
LALBA	-3,03
ARHGEF38	-3,03
RNF128	-3,07
MEGF9	-3,1
LOC609038	-3,1
HSPA4L	-3,11
TFCP2L1	-3,18
EFHC2	-3,19
BHMT2	-3,23
ERBB4	-3,24
PRRG4	-3,28
PROKR2	-3,29
IGJ	-3,3
CCDC80	-3,38
GATA3	-3,42
CFA.47200	-3,43
SPON1	-3,59
EFHD1	-3,64
FOXA1	-3,69
NRCAM	-3,78
IGKC	-3,78
LOC100856382	-3,87
DPP4	-3,99
CA8	-4,1
GABRA1	-4,13
GCM1	-4,31
SLITRK3	-4,37
DMD	-4,47
MUC15	-4,5
CFTR	-4,54
IL1RL1	-4,61
ESR1	-4,69

PIP5K1B	-4,81
SEMA3A	-4,88
TMEM45B	-5,14
TFAP2B	-5,19
PIGR	-5,24
CPXM2	-5,36
SPOCK3	-5,45
SERTM1	-5,65
SCN7A	-5,91
ELF5	-6,14
CLEC3A	-6,58
SLC26A4	-18,04
PIP	-18,21

5.5.2 Análise entre carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos

A seguir, análises de expressão gênica em larga escala foram avaliadas entre as amostras de carcinomas mamários metastáticos, não metastáticos e de glândulas mamárias normais. A análise de PCA realizada através do software *Expression Console,* evidenciou o agrupamento das amostras de mamas normais e algumas amostras de carcinomas mamários não metastáticos, enquanto as amostras de carcinomas mamários metastáticos encontram-se dispersas (Figura 20). Portanto, pela análise de PCA pode-se observar que apesar da característica comum de ocorrência de metástases no grupo de carcinomas mamários metastáticos, não há evidência de um perfil gênico específico que caracterize esse grupo, mostrando a complexidade de mecanismos que podem estar envolvidos no desenvolvimento das metástases e, provavelmente pela presença de vários fatores que predispõem a sua ocorrência, assim como no processo de carcinogênese, conforme descrito em outros estudos (BECKMANN et al., 1997; GUPTA et al., 2007; RAKHA et al., 2009; HANAHAN; WEINBERG, 2011; KLOPFLEISCH et al., 2011; MUCHA et al., 2016).

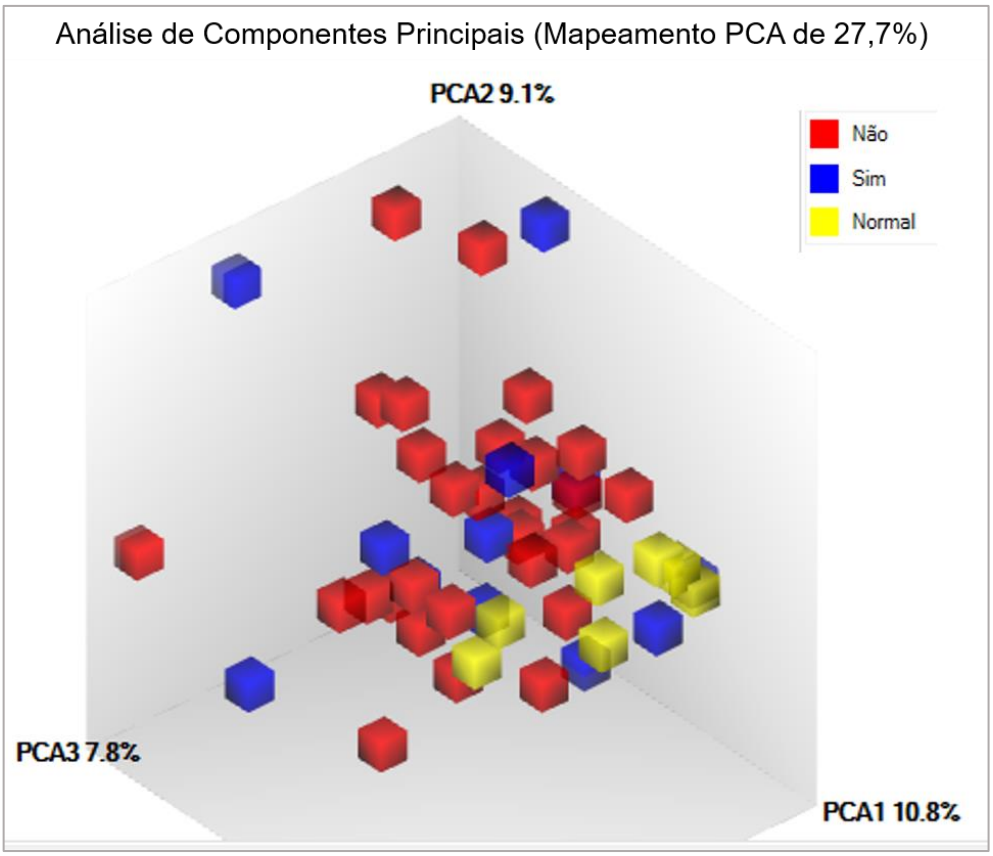


Figura 20. Análise de componente principal representativo de assinaturas de expressão gênica entre amostras de glândulas mamárias normais (amarelo), carcinomas mamários não metastáticos (vermelho) e carcinomas mamários metastáticos (azul). Observa-se agrupamento das amostras de tecidos mamários normais e algumas amostras de carcinomas mamários não metastáticos, enquanto as amostras de carcinomas mamários metastáticos encontram-se dispersas.

A análise de genes diferencialmente expressos avaliada pelo *software Transcriptome Analysis Console* (TAC), evidenciou 1422 genes diferencialmente expressos entre carcinomas metastáticos e mamas normais (785 genes com aumento de expressão e 637 genes com diminuição de expressão), 935 genes diferencialmente expressos entre os carcinomas mamários não metastáticos e as amostras de mamas normais, estando 377 genes com expressão aumentada e 558 genes com baixa expressão e, 633 genes diferencialmente expressos entre os carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos (328 genes regulados positivamente e 305 genes com baixa expressão) (Figura 21).

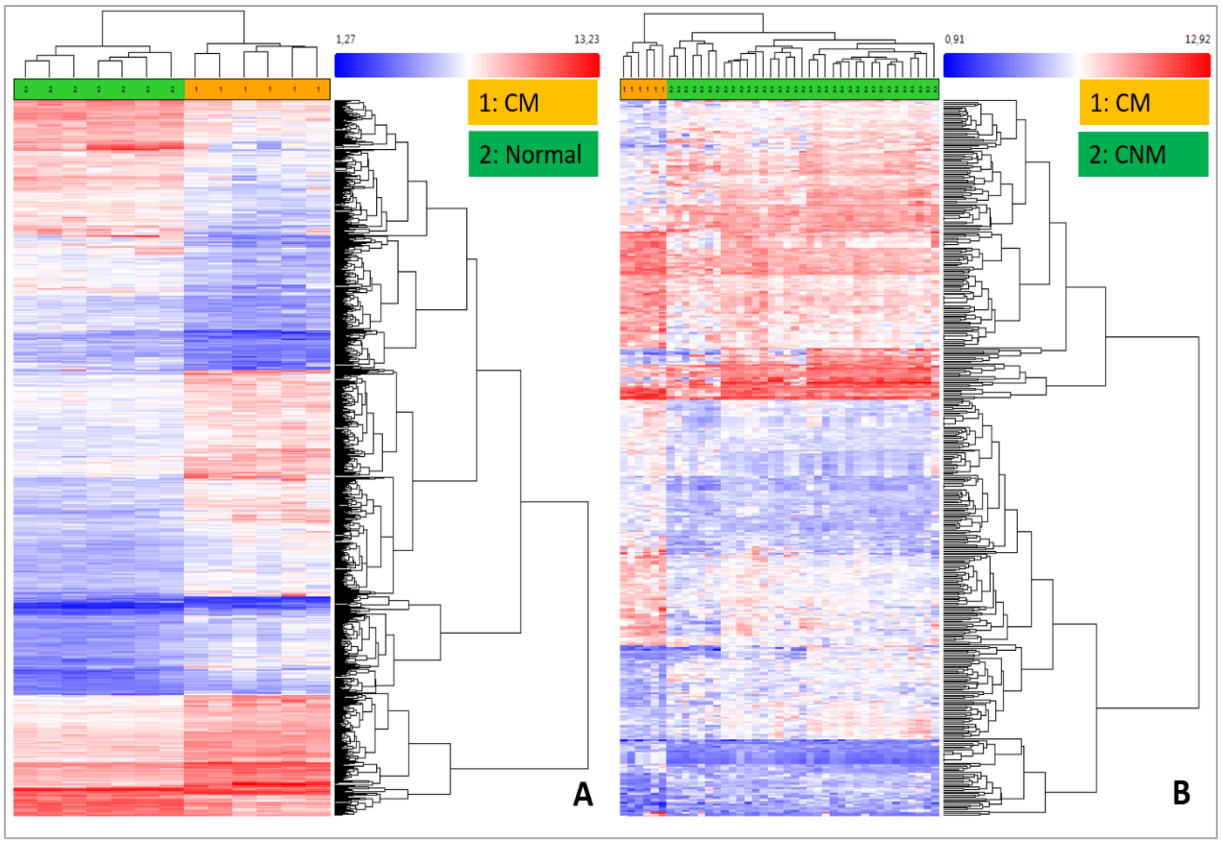


Figura 21. Dendograma representativo das assinaturas de expressão gênica entre amostras de tecidos mamários de fêmeas caninas. **A.** Representação de 1422 genes diferencialmente expressos entre amostras de carcinomas metastáticos (CM) e mama normal (Normal). **B.** Representação de 633 genes diferencialmente expressos entre carcinomas metastáticos e carcinomas não metastáticos (CNM). Em vermelho está caracterizado o aumento da expressão gênica e em azul a diminuição da expressão.

A seguir, os genes diferencialmente expressos entre os grupos em questão foram submetidos às análises de redes, vias gênicas, doenças relacionadas e função celular e/ou molecular através dos programas IPA, diagrama de Venn e String, para identificação dos principais genes e suas vias de interação envolvidos com cada grupo.

As principais vias canônicas relacionadas com os carcinomas não metastáticos e as mamas normais foram as vias de ativação LXR/RXR, sinalização da resposta de fase aguda e do sistema de coagulação (Figura 22 e Tabela 7).

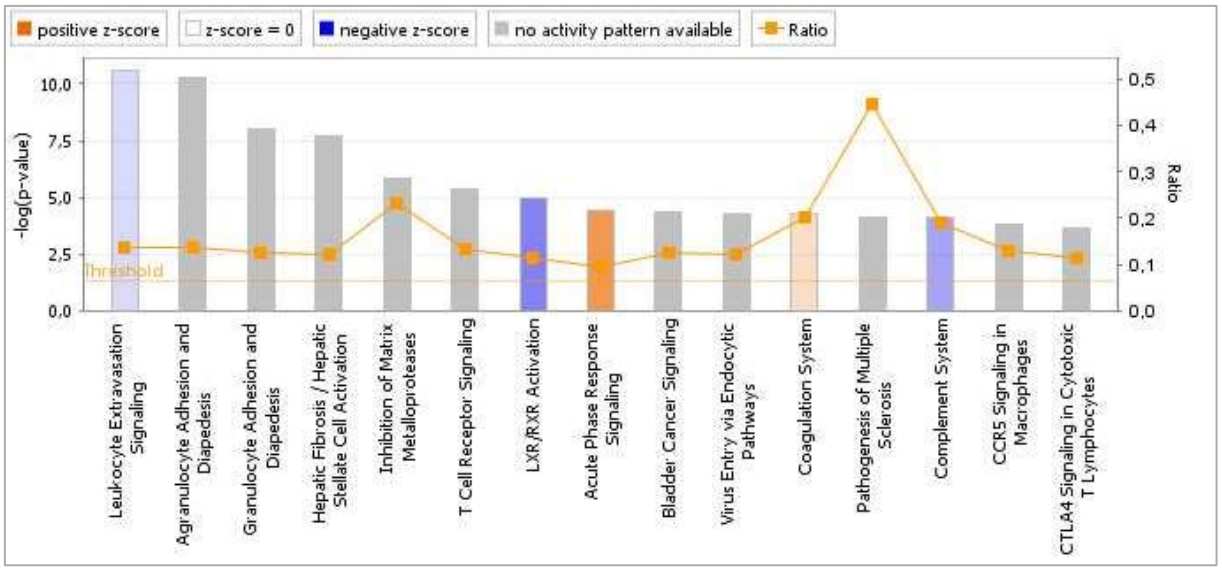


Figura 22. As 15 principais vias canônicas identificadas pelo IPA através dos genes diferencialmente expressos entre amostras de carcinomas mamários não metastáticos e tecidos mamários normais. Interação positiva representada em laranja e interação negativa em azul.

Tabela 7. Principais vias canônicas relacionadas aos genes diferencialmente expressos entre as amostras de carcinomas mamários não metastáticos e glândulas mamárias normais, identificadas pelo programa IPA, p<0,05.

Vias canônicas	Transcritos encontrados
Ativação da via LXR/RXRn	ITIH4,S100A8,TF,C3,MMP9,RBP4,CD36,C4A/C4B,VTN,CLU, NR1H3,ARG2,CYP51A1,HPX
Sinalização da resposta de fase aguda	ITIH4,TF,C3,CP,RBP7,TCF4,ITIH3,RBP4,CRABP2,C1R,FOS, C4A/C4B,FN1,F8,VWF,HPX
Sistema da coagulação	F2R,PROS1,TFPI,F8,F3,F13A1,VWF

Além disso, foram encontradas 25 principais redes de interação gênica entre os carcinomas mamários não metastáticos e as glândulas mamárias normais relacionadas com diversas doenças e funções biológicas e, dentre elas destacam-se o câncer, doenças do sistema reprodutivo, injúrias e anormalidades orgânicas, função e desenvolvimento do sistema hematológico, resposta celular imunomediada; além de genes envolvidos com o ciclo celular, proliferação e crescimento celular (Figura 23).

Novamente foi observada a participação da MMP9, dessa vez na via de ativação dos fatores de transcrição LXR (*Liver X receptor*) e RXR (*retinoid X receptor)*, os quais estão considerados reguladores centrais na homeostase de lipídeos em mamíferos, através do controle de inúmeros genes relacionados com a captação,

transporte, efluxo e excreção de colesterol. A via de sinalização do LXR está presente em vários tecidos e tem se mostrado promissora na elaboração de novas estratégias terapêuticas, alguns genes alvos envolvidos nessa via parecem ser benéficos no tratamento de várias doenças em humanos nas quais os lipídeos tenham um papel central, como aterosclerose, Alzheimer e até mesmo o câncer (HONG & TONTONOZ, 2014).

Outro transcrito encontrado e que chama atenção é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), apresentando expressão diminuída nos carcinomas mamários metastáticos em comparação com as mamas normais. O VEGF é um dos mais potentes fatores angiogênicos (ADAMS et al., 2000). A expressão deste gene é induzida pela exposição à baixa tensão de oxigênio sobre uma variedade de circunstâncias patofisiológicas (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003). Embora não fosse esperado, esse marcador está fortemente relacionado com a angiogênese, um dos mecanismos relacionados com as metástases, acredita-se que o envolvimento desse gene nas mamas normais possa estar relacionado algum processo fisiológico e não relacionado com o desenvolvimento tumoral e sua diminuição nas amostras de carcinomas mamários pode estar relacionada com alterações no desenvolvimento do sistema hematológico ou devido ao fato do processo biológico tumoral ser dinâmico e no momento da coleta das amostras, o VEGF pode não ter sofrido alteração.

Além disso, foram observados genes associados com o ciclo celular, proliferação e crescimento celular, ou seja, mecanismos esperados para o desenvolvimento e progressão tumoral.

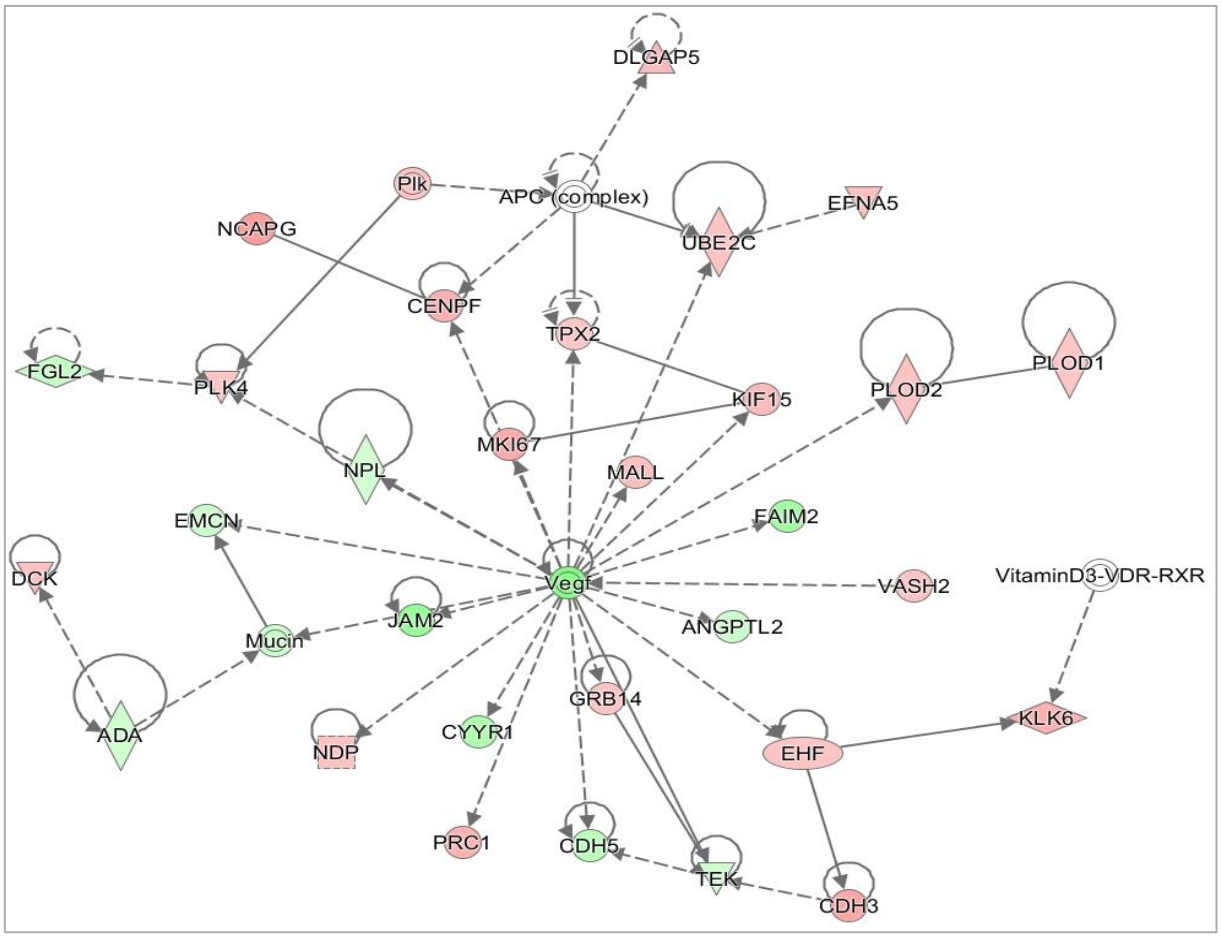


Figura 23. Rede de interação gênica identificada pelo IPA, para os genes diferencialmente expressos entre carcinomas mamários não metastáticos e glândulas mamárias normais, com funções relacionadas com ciclo celular, proliferação e crescimento celular e o desenvolvimento do câncer. As linhas entre os genes representam as interações conhecidas, com as linhas sólidas caracterizando as interações diretas e as linhas pontilhadas retratam as interações indiretas. Os diferentes formatos dos “nós” constituem a classe funcional do produto do gene. Genes com expressão aumentada estão representados em vermelho e com baixa expressão em verde, a intensidade da cor reflete a intensidade de expressão gênica.

Em relação as amostras de carcinomas mamários metastáticos e de glândulas mamárias normais, observou-se como principais vias canônicas, as vias de ativação do LXR/RXR, de papéis mitóticos da quinase Polo-like, de entrada de estrógeno mediada pela fase S e do papel das proteínas CHK no controle do ciclo celular (Figura 24 e Tabela 8).

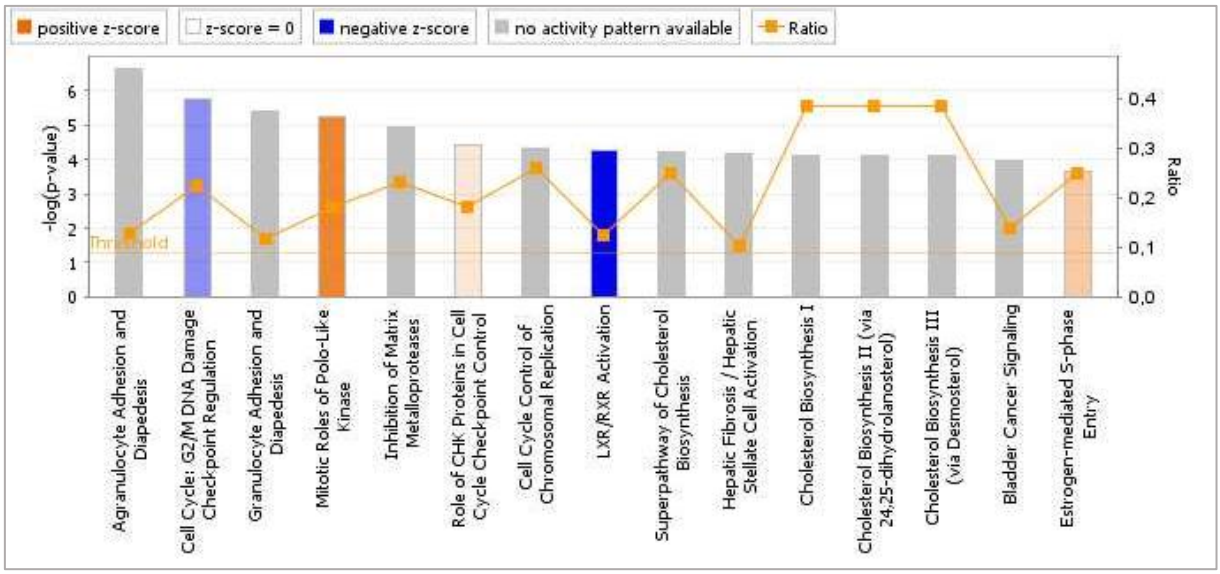


Figura 24. As 15 principais vias canônicas identificadas pelo IPA através dos genes diferencialmente expressos entre as amostras de carcinomas mamários metastáticos e tecidos mamários normais. Interação positiva representada em laranja e interação negativa, em azul.

Tabela 8. Principais vias canônicas entre as amostras de carcinomas mamários metastáticos e glândulas mamárias normais, identificadas pelo programa IPA, p<0,05.

Vias canônicas	Transcritos encontrados
Papéis mitóticos da quinase Polo-like	PLK3,KIF23,CDC25A,PRC1,PLK4,PPP2R2B,PTTG1,CCNB2,KIF11,FBXO5,PLK1,CCNB1
Papel das proteínas CHK no controle do ciclo celular	BRCA1,CDKN1A,CDC25A,PPP2R2B,CLSPN,RFC4,E2F3,PCNA,PLK1,CHEK1
Ativação do LXR/RXR	ITIH4,S100A8,MMP9,SERPINF1,CD14,APOD,HMGCR,RBP4,CD36,VTN,LDLR,IL1RN,PTGS2,ARG2,CYP51A1
Entrada de estrógeno mediada pela fase S	CCND1,CDKN1A,CDC25A,CCNA2,E2F3,ESR1

De forma semelhante ao grupo anterior, foram encontradas 25 principais redes de interação entre os carcinomas mamários metastáticos e as glândulas mamárias normais relacionadas com diversas doenças e funções biológicas, como redes relacionadas como câncer, injúria e anormalidades orgânicas, doença do sistema reprodutivo.; ciclo celular, organização e modelagem celular, replicação, recombinação e reparo do DNA (Figura 25) e, câncer, morfologia celular, função e manutenção celular (Figura 26).

Dentre os genes relacionados com os carcinomas metastáticos destacam-se a presença do supressor tumoral BRCA1, apresentando expressão aumentada nesse grupo quando comparado com as mamas normais, estando envolvido também com outros transcritos relacionados com o controle do ciclo celular. O BRCA1 foi encontrado na via das proteínas CHK, as quais estão relacionadas com os pontos de checagem durante o ciclo celular. Como descrito anteriormente, o BRCA1 apresenta um importante papel no desenvolvimento do câncer de mama em mulheres (MAESHIMA et al., 2016). De forma semelhante, parece manifestar um papel importante tanto na progressão dos tumores mamários de cadelas como no desenvolvimento de metástases.

Outro transcrito que exibiu aumento de expressão gênica nos carcinomas mamários metastáticos em comparação com as glândulas mamárias normais foi a MMP12. As matrizes metaloproteinaises (MMPs) são pertencentes à família das enzimas proteolítcas dependentes de zinco e de forma geral seus representantes estão relacionados com a angiogênese tumoral, migração, mecanismos de invasão tecidual e regulação de mecanismos de vigilância imunológica (VU; WERB, 2000; EGLEBAD; WERB, 2002). Essas funções atribuídas as MMPs justificaria a presença de vários de seus representantes envolvidos no desenvolvimento, progressão tumoral e de desenvolvimento de metástases, através da participação de várias vias, como foi observado nesse estudo. As MMPs podem estar envolvidas com diversos cânceres em humanos, além disso já foram associadas com tumores de estádios mais avançados e baixa sobrevida global (VU; WERB, 2000; YE, 2000). A MMP12 é uma enzima proteolítica responsável pela clivagem de plasminogênio em angiotensina, apresentando efeito angiostático, o que poderia conferir um efeito protetor contra a angiogênese. No entanto, sua participação no câncer de mama de mulheres é controversa (FERRERAS et al., 2000; SHIN et al., 2005). Como a MMP12 apresentou aumento expressivo no grupo de carcinomas mamários metastáticos em relação as mamas normais, sugere-se que nas cadelas, seu comportamento seja parecido com de outras MMP, associada a um prognóstico ruim.

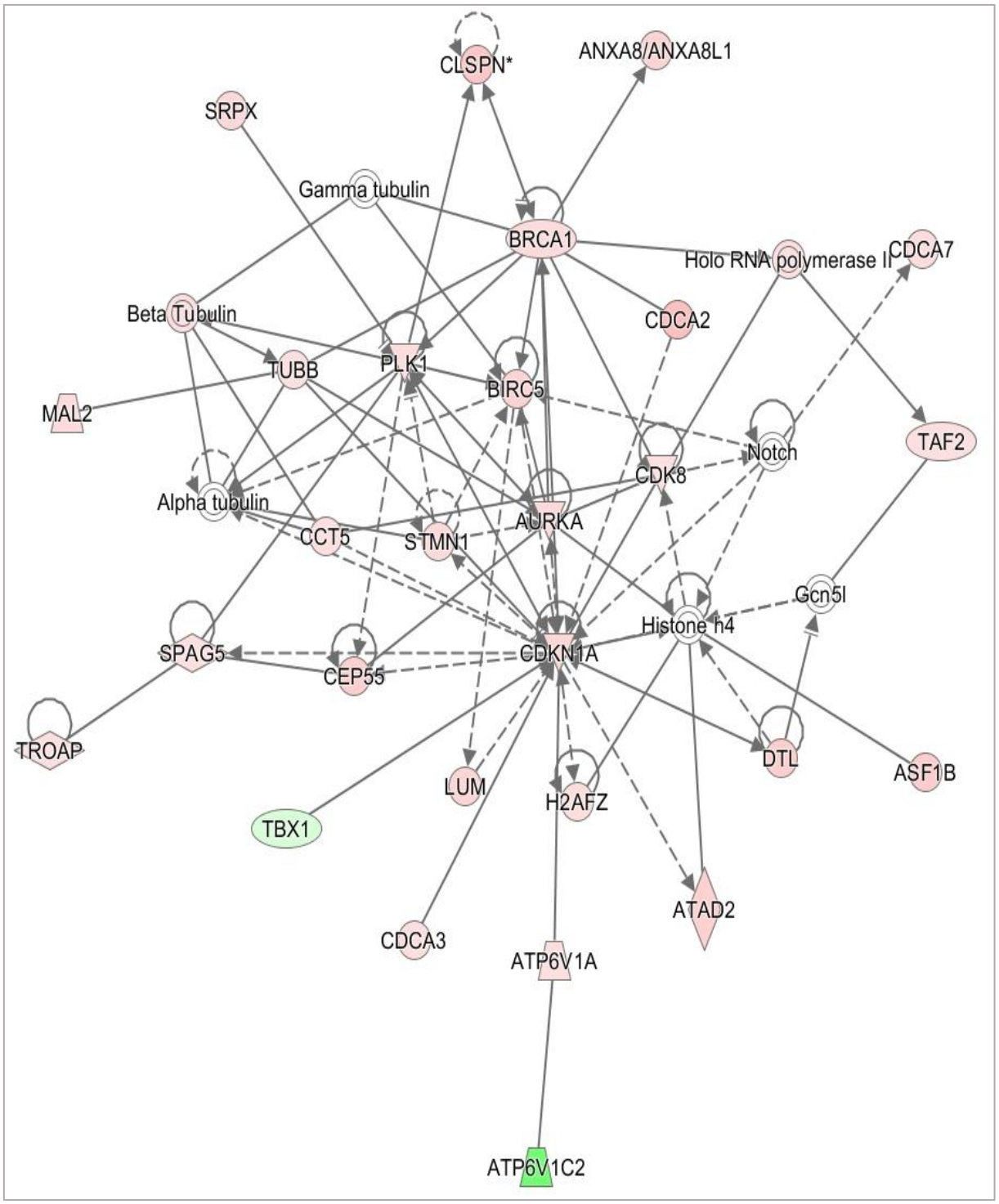


Figura 25. Rede de interação gênica associadas com as funções celulares/biológicas de ciclo celular, organização e modelagem celular, replicação, recombinação e reparo do DNA, identificadas pelo IPA através dos genes diferencialmente expressos entre carcinomas mamários metastáticos e mamas normais. As linhas entre os genes representam as interações conhecidas, com as linhas sólidas caracterizando as interações diretas e as linhas pontilhadas as interações indiretas. Os diferentes formatos dos “nós” constituem a classe funcional do produto do gene. Genes com

expressão aumentada estão representados em vermelho e com baixa expressão em verde, a intensidade da cor reflete a intensidade da expressão gênica.

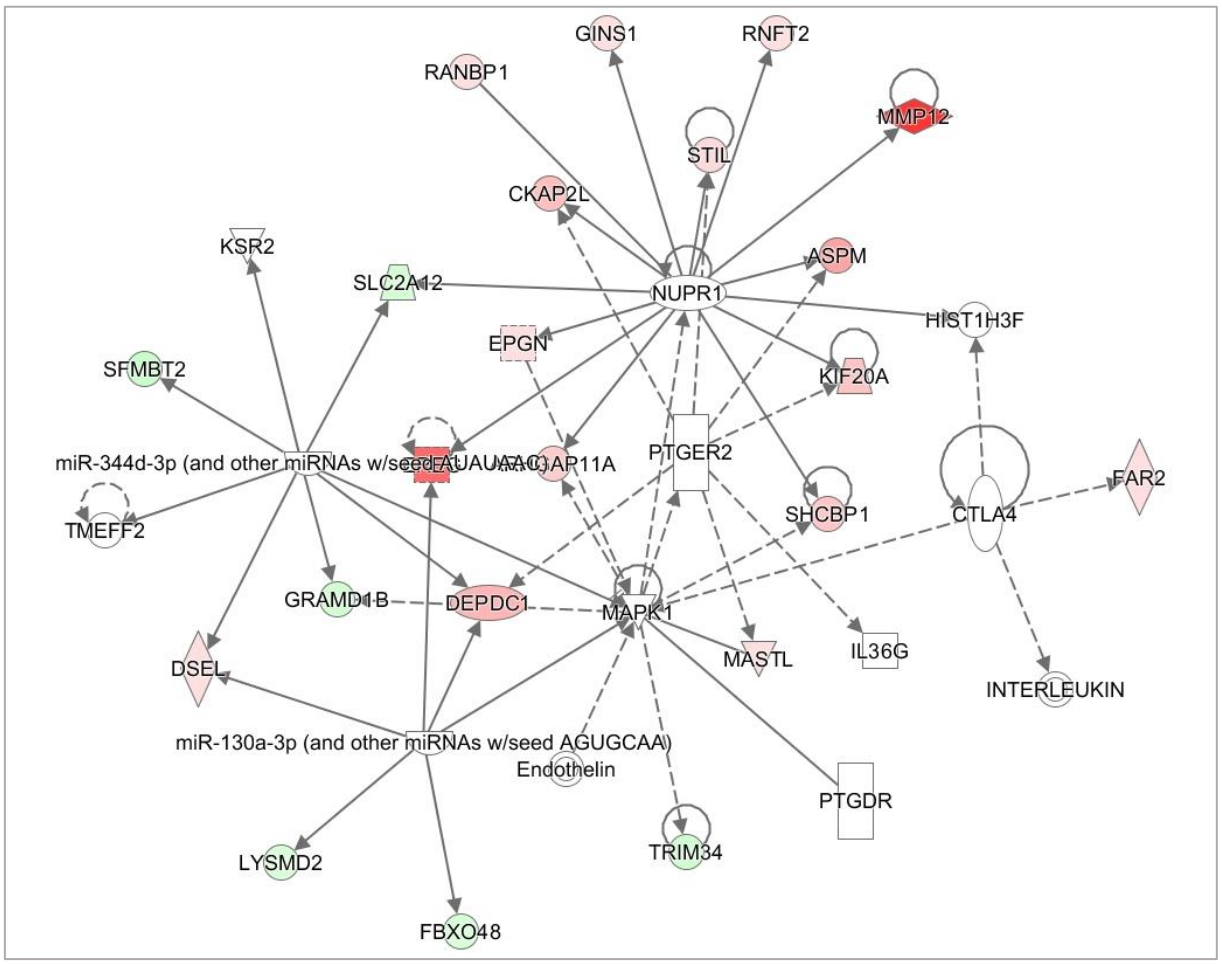


Figura 26. Rede de interação gênica relacionada com os genes diferencialmente expressos entre carcinomas mamários metastáticos e mamas normais, envolvida com câncer, morfologia celular, função e manutenção celular. As linhas sólidas entre os genes representam as interações conhecidas e diretas e as linhas pontilhadas as interações indiretas. Os diferentes formatos dos “nós” constituem a classe funcional do produto do gene. Genes com expressão aumentada estão representados em vermelho e com baixa expressão em verde, a intensidade da cor reflete a intensidade da expressão gênica.

Em relação as amostras de carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos foi verificada como principais vias canônicas as vias de sinalização de extravasão de leucócitos e sinalização de glioma invasivo (Figura 27 e Tabela 9). Observou-se envolvidos nessas vias, TIMP1, TIMP2 e alguns membros representantes das metaloproteinases.

Tabela 9. Principais vias canônicas de sinalização significantemente alteradas entre as amostras de carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos, identificadas pelo programa IPA, p<0,05.

Vias canônicas	Transcritos encontrados
Glioma Invasiveness Signaling	F2R,PLAU,PLAUR,ITGB3,TIMP1,TIMP2
Leukocyte Extravasation Signaling	MMP11,ITGA2,CLDN8,ITGB3,TIMP1,MMP13,CLDN6,RASGRP1,ITGA5,TIMP2

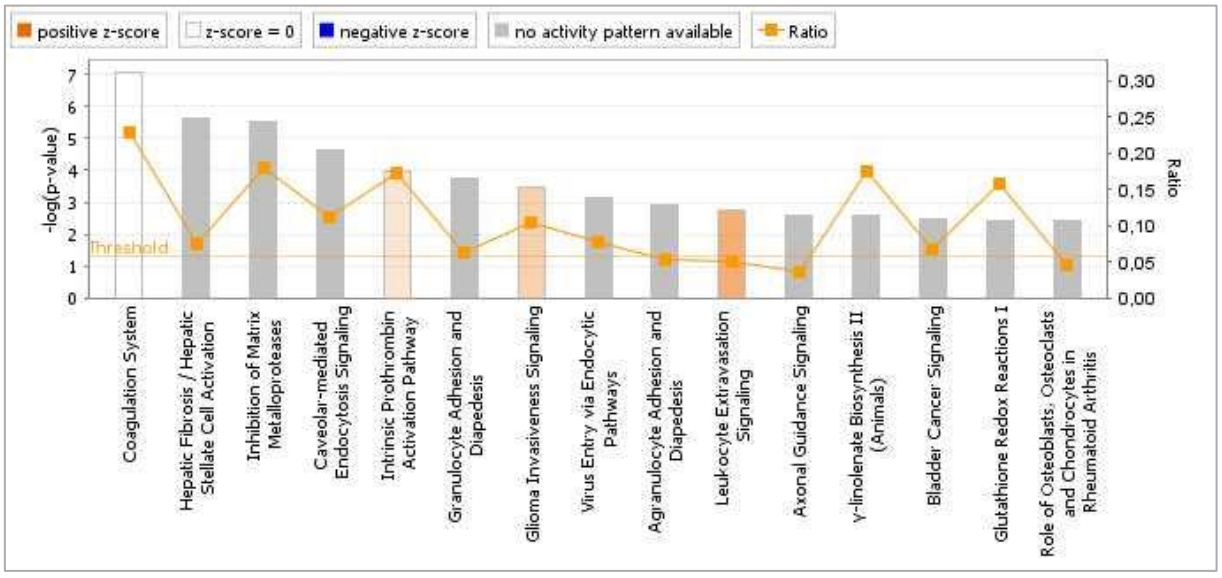


Figura 27. As 15 principais vias canônicas identificadas pelo IPA através dos genes diferencialmente expressos entre as amostras de carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos. Interação positiva representada em laranja e interação negativa em azul.

A seguir foram determinadas pelo programa IPA, as principais redes de interação a partir dos genes diferencialmente expressos entre os carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos. Dessa forma, foram observados entre as 25 principais vias de interação relacionadas com determinadas enfermidades e funções biológicas, as vias relacionadas com movimento celular, câncer, anormalidades e injúrias orgânicas; ciclo celular, desenvolvimento celular, crescimento e proliferação celular (Figura 28); desordens hereditárias, doença metabólica, transporte molecular (Figura 29).

Dentre os genes diferencialmente expressos estão presentes os fatores transcricionais representantes da família GATA. O GATA-3 tem sido considerado um importante marcador preditivo para o câncer de mama em mulheres, além de um

importante regulador na diferenciação de células luminais. O GATA-3 está expresso em tecidos mamários, sendo considerado um marcador relacionado com a diferenciação e desenvolvimento da glândula mamária e pode ainda ser usado para predição de lesões metastáticas. Esse gene está associado ainda com o receptor de estrógeno, participando da via de sinalização hormonal e do desenvolvimento da glândula mamária (WASSERMAN et al., 2016) Nesse estudo, observou-se diminuição na expressão desse gene nos carcinomas mamários metastáticos em comparação com os carcinomas não metastáticos, corroborando com estudos em mulheres, sugerindo que esse marcador possa ser considerado um importante marcador prognóstico para os tumores mamários em cadelas, assim como para as mulheres. Enquanto que GATA-6 apresenta um mecanismo inverso e, seu aumento está relacionado com o desenvolvimento do câncer e de metástases.

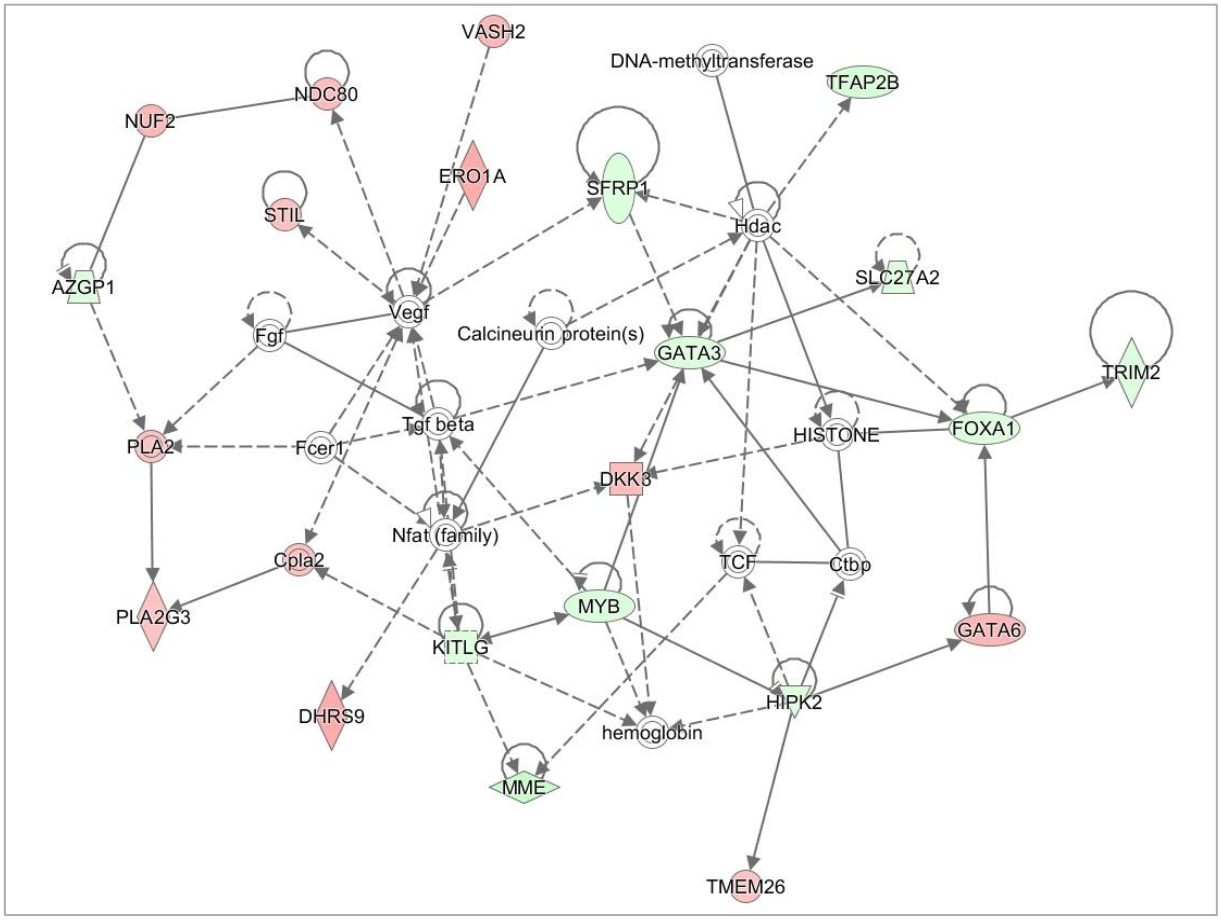


Figura 28. Rede de interação gênica envolvida com ciclo celular, desenvolvimento celular, crescimento e proliferação celular, relacionada com os genes diferencialmente expressos entre carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos. Genes com

expressão aumentada estão representados em vermelho e com baixa expressão em verde.

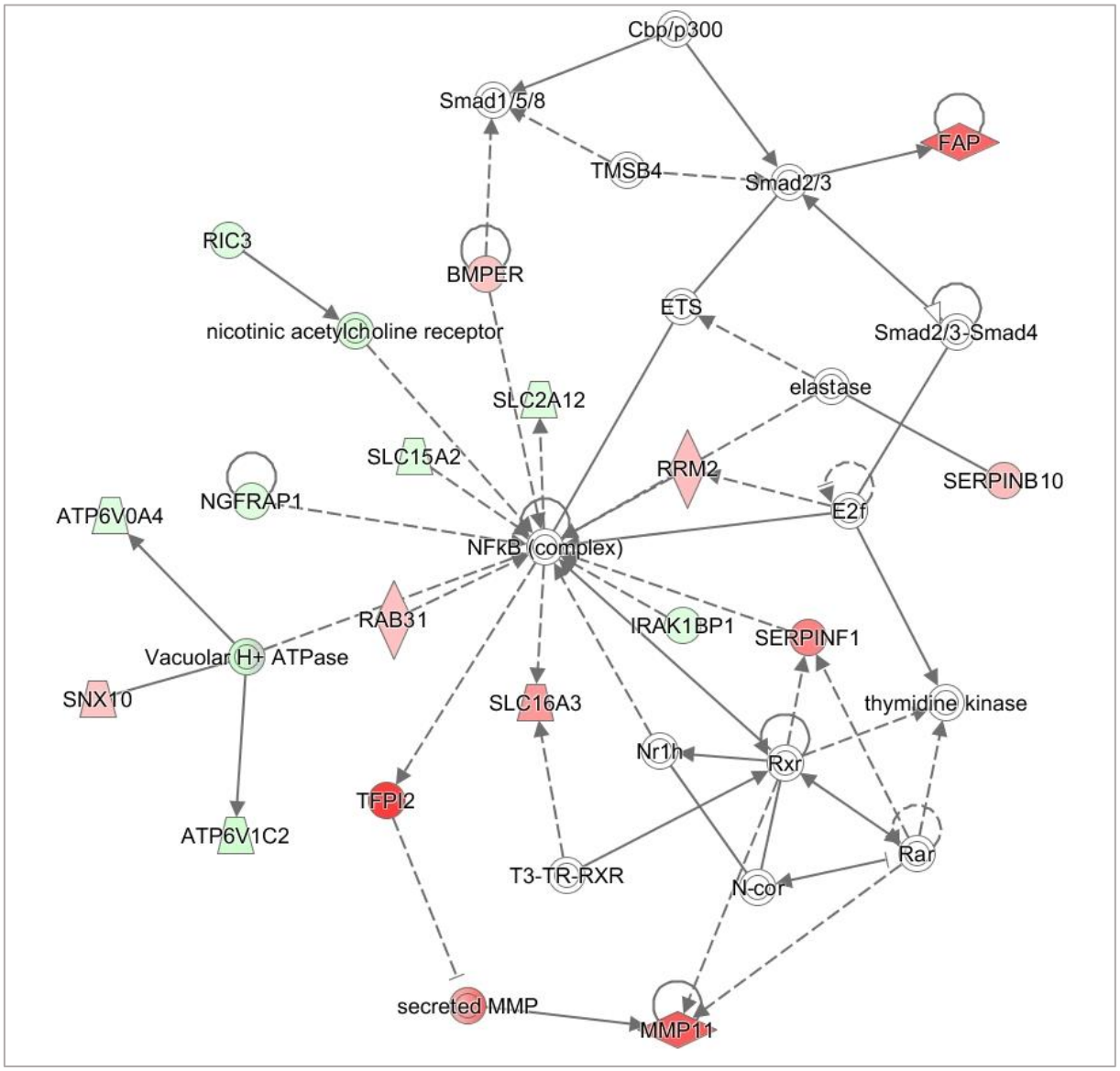


Figura 29. Rede de interação gênica relacionada com os genes diferencialmente expressos entre carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos, envolvida com desordens hereditárias, doença metabólica, transporte molecular. Genes com expressão aumentada estão representados em vermelho e com baixa expressão em verde.

Análises entres esses mesmos grupos (carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos e glândulas mamárias normais) foram realizadas, posteriormente, considerando valores de *fold change* ≤-3 e ≥3, com o objetivo de restringir mais a seleção dos genes diferencialmente expressos entre esses grupos. Assim, foi identificado pelo Diagrama de Venn 186 genes diferencialmente expressos entre carcinomas mamários metastáticos e as mamas normais (antes 1422 genes), 123

genes diferencialmente expressos entre carcinomas mamários não metastáticos e as mamas normais (antes 935 genes) e 57 genes diferencialmente expressos entre carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos (antes 633 genes), além disso, foi observado que 3 genes eram comuns aos três grupos (Figuras 30).

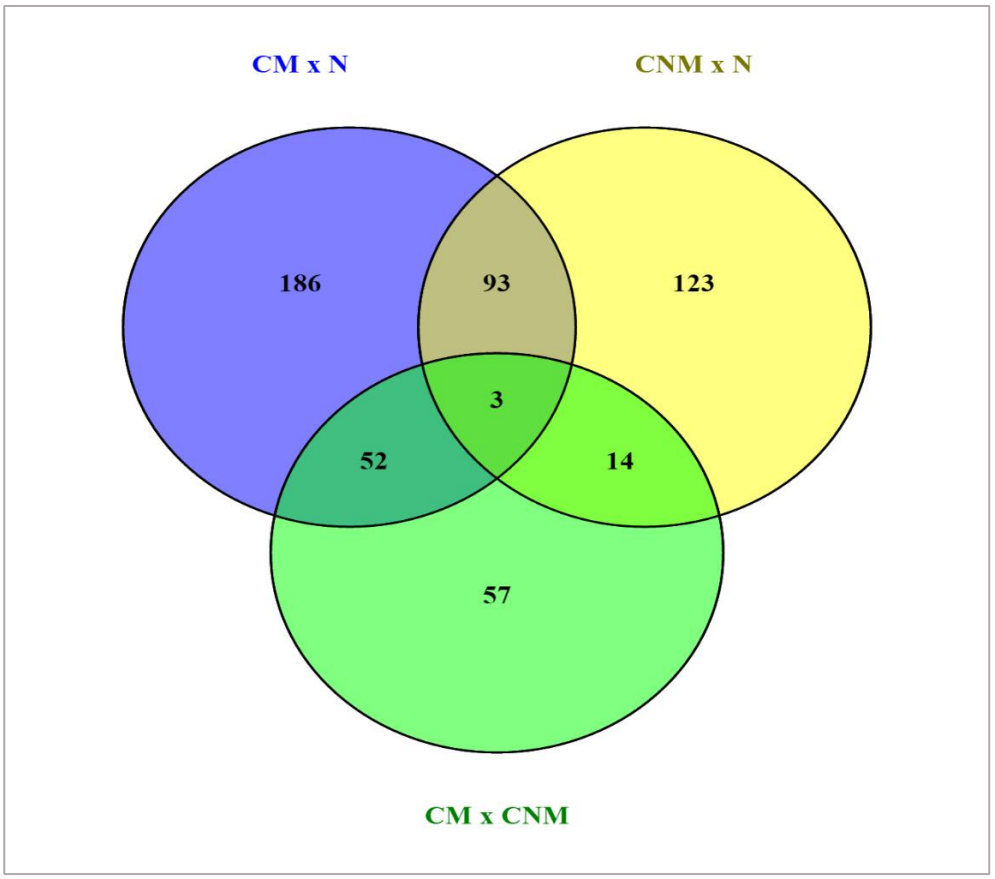


Figura 30. Diagrama de Venn mostrando os genes diferencialmente expressos comuns e exclusivos dos carcinomas mamários metastáticos e não metastáticas e mamas normais. Os valores descritos no interior dos círculos indicam o número de genes expressos em cada grupo. A intersecção do diagrama indica os genes diferencialmente expressos em comum entre os grupos. CM= carcinoma mamário metastático, CNM = carcinoma mamário não metastático e N = mama normal

Dentre os genes expressão aumentada dos carcinomas mamários metastáticos em relação aos carcinomas não metastáticos foram observadas redes de interação proteica relacionadas com a organização da matriz extracelular (Figura 31) e desenvolvimento de vasos sanguíneos (Figura 32), mecanismos importantes que conferem ao tumor a capacidade de invasão a tecidos adjacentes e angiogênese,

favorecendo o desenvolvimento de metástases. A lista dos genes diferencialmente expressos entre carcinomas mamários metastáticos e não metastáticos encontram-se na Tabela 10.

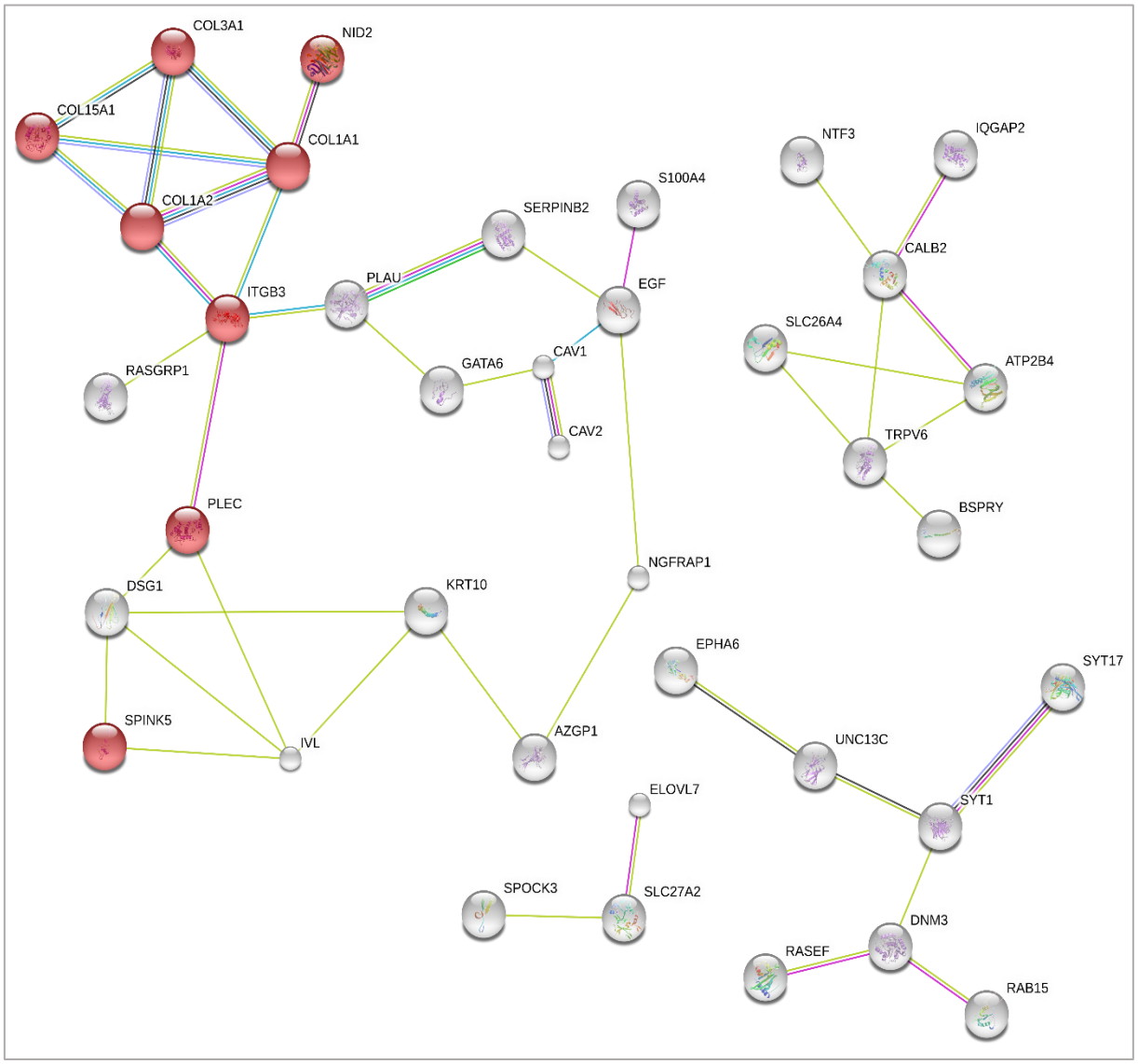


Figura 31. Rede de interação proteica relacionada aos genes com aumento de expressão nos carcinomas mamários metastáticos em relação aos não metastáticos. As proteínas em vermelho estão relacionadas com a função biológica de organização da matriz extracelular.

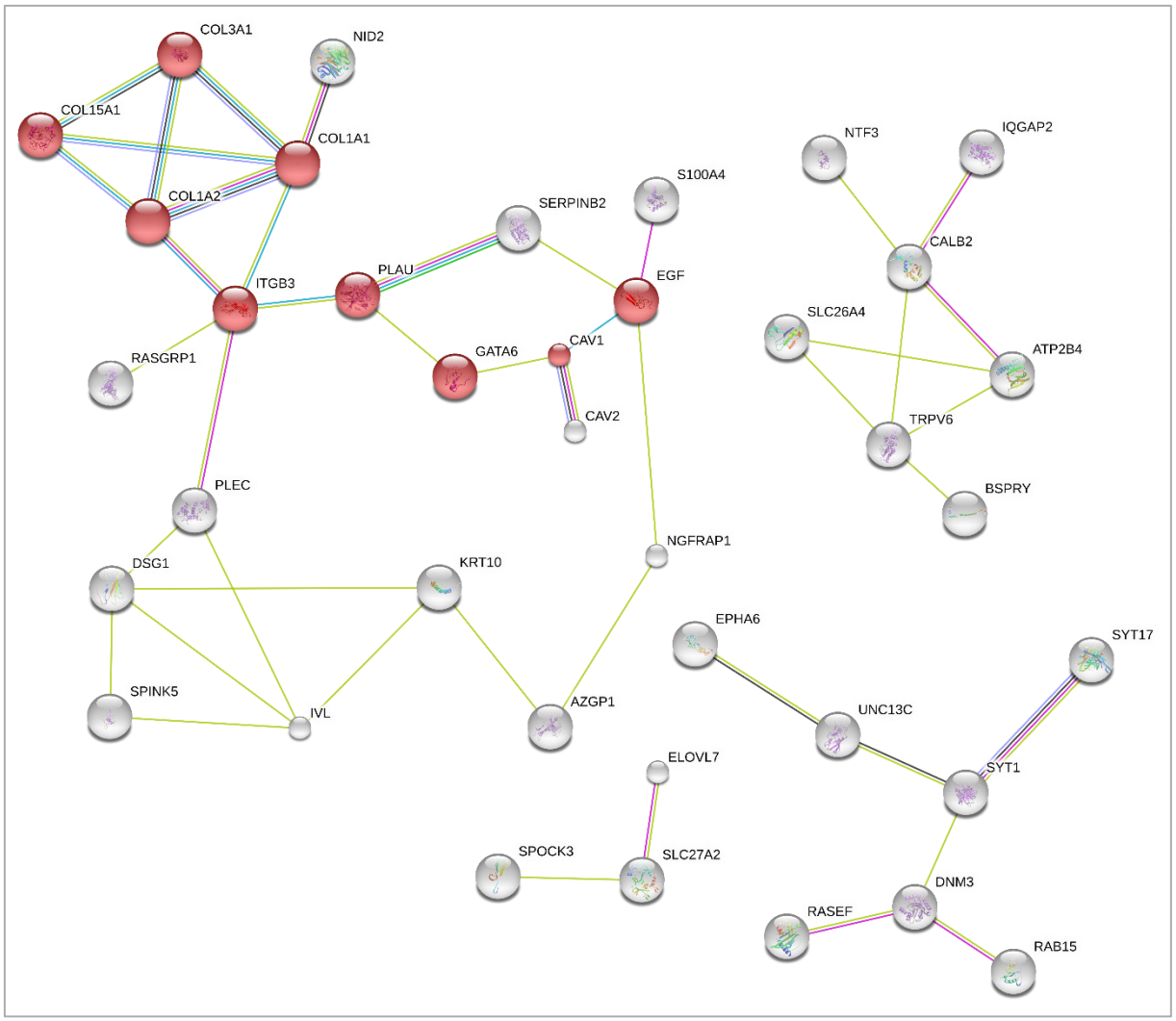


Figura 32. Rede de interação proteica relacionada aos genes regulados positivamente nos carcinomas mamários metastáticos em relação aos não metastáticos. As proteínas em vermelho estão relacionadas com a função biológica de desenvolvimento de vasos sanguíneos.

Tabela 10. Lista dos 57 GDEs encontrados nos carcinomas mamários metastáticos em relação aos carcinomas mamários não metastáticos.

Símbolo do gene	***Fold Change***
SPOCK3	-11.42
LOC100856571	-17.96
SLC26A4	-18.62
TRPV6	-3.02
AHNAK2	3.03
ATP6V0A4	-3.06
ARHGEF38	-3.1
ITGA5	3.11
cfa-mir-32	-3.13
SLC16A10	-3.13

MRC1	3.14
RNASE12	-3.18
FOXA1	-3.2
SHC4	-3.22
LOC100856661	3.24
MXRA5	3.26
REEP6	-3.27
LOC100688132	3.28
MIA	-3.29
TMEM176A	3.3
FBLN1	3.47
ARHGAP20	-3.5
SPDEF	-3.53
TMEM176B	3.54
COL1A2	3.6
CXCL5	3.77
SPHKAP	-3.78
RNF180	-3.81
IVL	3.82
RPS6KA6	-3.9
NTN4	-4.07
GPC6	-4.09
MYB	-4.2
ESRRG	-4.21
SERTM1	-4.27
CCDC160	-4.29
LOC100856542	-4.29
CHRNA7	-4.33
CALB2	-4.34
CNTNAP5	-4.45
SCN7A	-4.47
cfa-mir-568	-4.5
CA8	-4.53
COL1A1	4.58
ANO4	4.67
TFAP2B	-4.82
PKIA	-4.95
SYT1	-5.04
FAP	5.43
RBP4	5.68
ASPN	5.71
RNF128	-5.75
GABRP	-5.77
COL6A5	6.2

LOC610632	6.66
SPINK5	6.7
KRT10	7.38

6 CONCLUSÃO

O estudo em larga escala pela técnica de *microarray* permitiu a identificação de inúmeros genes e vias de interação proteica que possivelmente estão envolvidos no processo de carcinogênese dos tumores mamários caninos e das metástases.

Os resultados apresentados confirmaram a importância da cadela como modelo experimental ao estudo do câncer de mama em mulheres por apresentar mecanismos moleculares semelhantes ao observado nas mulheres.

Apesar das diferenças morfológicas e no comportamento clínico dos carcinomas simples e dos carcinomas mistos, não foi evidenciado diferença em relação ao perfil molecular desses tumores.

Os resultados evidenciados nesse trabalho também possibilitam que novos estudos sejam realizados em busca de marcadores prognósticos específicos para os tumores mamários caninos através de análises individuais de genes alvos como genes relacionados com o desenvolvimento da glândula mamária e via hormonal (*GATA 3*, *GATA 6*), envolvidos na via de sinalização dos fatores transcricionais *LXR*/*RXR*, genes da família Tec quinase, genes da família das metaloproteinases e inibidores de metaloproteinases, genes presentes nas vias de supressores tumorais *ATM*, *BRCA1* e *TP53*.

7 REFERÊNCIAS

ADAMS, J.; CARDER, P. J.; DOWNEY, S.; FORBES, M. A.; MACLENNAN, K.; ALLGAR, V.; KAUFMAN, S.; HALLAM, S.; BICKNELL, R.; WALKER, J. J.; CAIRNDUFF, F.; SELBY, P. J.; PERREN, T. J.; LANSDOWN, M.; BANKS, R. E. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue vegf and microvessel density and effects of tamoxifen. **Cancer Research**, Chicago, v. 60, n. 11, p. 2898–2905, 2000.

AKIYAMA, F.; HORII, R. Therapeutic Strategies for breast cancer based on histological type. **Breast Cancer**, New York, v. 16, n. 3, p. 168–172, 2009.

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

BEAUVAIS, W.; CARDWELL, J. M.; BRODBELT, D. C. The effect of neutering on the risk of mammary tumours in dogs – a systematic review. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 53, n. 6, p. 314–322, 2012.

BECKMANN, M. W.; NIEDERACHER, D.; SCHNÜRCH, H. G.; GUSTERSON, B. A.; BENDER, H. G. Multistep Carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. **Journal of Molecular Medicine**, Berlin, v. 75, n. 6, p. 429–39, 1997.

BENJAMIN, S. a; LEE, a C.; SAUNDERS, W. J. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. **Veterinary pathology**, New York, v. 36, n. 5, p. 423–436, 1999.

BENSIMON, A.; AEBERSOLD, R.; SHILOH, Y. Beyond ATM: the protein kinase landscape of the dna damage response. **FEBS letters**, Amsterdam, v. 585, n. 11, p. 1625–39, 2011.

BHATTI, S.; KOZLOV, S.; FAROOQI, A. A.; NAQI, A.; LAVIN, M.; KHANNA, K. K. ATM protein kinase: the linchpin of cellular defenses to stress. **Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS**, Boston, v. 68, n. 18, p. 2977–3006, 2011.

BOGGS, R. M.; WRIGHT, Z. M.; STICKNEY, M. J.; PORTER, W. W.; MURPHY, K. E. MicroRNA Expression in canine mammary cancer. **Mammalian Genome : Official Journal of the International Mammalian Genome Society**, New York, v. 19, n. 7-8, p. 561–569, 2008.

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

BOZHANOV, S. S.; ANGELOVA, S. G.; KRASTEVA, M. E.; MARKOV, T. L.; CHRISTOVA, S. L.; GAVRILOV, I. G.; GEORGIEVA, E. I. Alterations in p53, BRCA1, ATM, PIK3CA, and HER2 genes and their effect in modifying clinicopathological characteristics and overall survival of bulgarian patients with breast cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Berlin, v. 136, n. 11, p. 1657–1669, 2010.

BUENO, R. C.; CANEVARI, R. A.; VILLACIS, R. A. R.; DOMINGUES, M. A. C.; CALDEIRA, J. R. F.; ROCHA, R. M.; DRIGO, S. A.; ROGATTO, S. R. ATM down-regulation is associated with poor prognosis in sporadic breast carcinomas. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, Dordrecht, v. 25, n. 1, p. 69–75, 2014.

CASSALI, G. D. Comparative mammary oncology: canine model. **BMC proceedings**, London, v. 7, n. supl. 2, p. K6, 2013.

CASSALI, G.; LAVALLE, G.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A.; GHEVER, C.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; OLIVEIRA, L. O.; SUEIRO, F. A. R.; BESERRA, H. E. O.; BERTAGNOLLI, A. C.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; CAMPOS, C. B.; ARAUJO, M. R.; CAMPOS, L. C.; MONTEIRO, L. N.; NUNES, F. C.; HORTA, R. S.; REIS, D. C.; LUVIZOTTO, M. C. R.; MAGALHÃES, G. M.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; TANAKA, N. M.; GRANDI, F.; UBUKATA, R.; BATSCHINSKI, K.; TERRA, E. M.; SALVADOR, R. C. L.; JARK, P. C.; DELECRODI, J. E. R.; NASCIMENTO, N. A.; SILVA, D. N.; SILVA, L; P.; FERREIRA, K. C. R. S.; FREHSE, M. S.; SANTIS, G. W.; SILVA, E. O.; GUIM, T. N.; KERR, B.; CINTRA, P. P.; SILVA, F. B. F.; LEITE, J. S.; MELLO, M. F. V.; FERREIRA, M. L. G.; FUKUMASU, H.; SALGADO, B. S.; TORRES, R. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors-2013. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, Belo Horizonte, v. 7, n. 2, p. 38–69, 2014.

CHANG, S. C.; CHANG, C. C.; CHANG, T. J.; WONG, M. L. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 227, n. 10, p. 1625–1629, 2005.

CUATRECASAS, M.; SANTAMARIA, G.; VELASCO, M.; CAMACHO, E.; HERNANDEZ, L.; SANCHEZ, M.; ORRIT, C.; MURCIA, C.; CARDESA, A.; CAMPO, E.; FERNANDEZ, P. L. ATM gene expression is associated with differentiation and angiogenesis in infiltrating breast carcinomas. **Histology and Histopathology**, Murcia, v. 21, n. 1-3, p. 149–156, 2006.

DE ARAÚJO, M. R.; CAMPOS, L. C.; FERREIRA, E.; CASSALI, G. D. Quantitation of the regional lymph node metastatic burden and prognosis in malignant mammary tumors of dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 29, n. 5, p. 1360–1367, 2015.

DE OLIVEIRA, J. T.; PINHO, S. S.; DE MATOS, A. J.; HESPANHOL, V.; REIS, C. A.; GÄRTNER, F. MUC1 Expression in canine malignant mammary tumours and relationship to clinicopathological features. **Veterinary Journal**, London, v. 182, n. 3, p. 491–493, 2009.

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

EGENVALL, A.; BONNETT, B. N.; ??HAGEN, P.; OLSON, P.; HEDHAMMAR, ??ke; VON EULER, H. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in sweden from 1995 to 2002. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 69, n. 1-2, p. 109–127, 2005.

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

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Assessment of histological grade. In: **Systemic Pathology—The Breast**. 3rd. ed. London: Churchill and Livingstone, 1998. p. 365–384.

ESTRELA-LIMA, A.; ARAUJO, M. S.; COSTA-NETO, J. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; BARROUIN-MELO, S. M.; CARDOSO, S. V; MARTINS-FILHO, O. A.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. **BMC cancer**, London, v. 10, n. 1, p. 256–269, 2010.

FERLAY, J.; SHIN, H.-R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: globocan 2008. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, New York, v. 127, n. 12, p. 2893–917, 2010.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, New york, v. 9, n. 6, p. 669–676, 2003.

FERRERAS, M.; FELBOR, U.; LENHARD, T.; OLSEN, B. R.; DELAISSE, J. Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 486, p. 247–251, 2000.

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

GAMBA, C. O.; DIAS, E. J.; RIBEIRO, L. G. R.; CAMPOS, L. C.; ESTRELA-LIMA, A.; FERREIRA, E.; CASSALI, G. D. Histopathological and immunohistochemical assessment of invasive micropapillary mammary carcinoma in dogs: a retrospective study. **Veterinary Journal**, London, v. 196, n. 2, p. 241–246, 2013.

GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary pathology**, New York, v. 48, n. 1, p. 117–131, 2011.

GRÜNTZIG, K.; GRAF, R.; HÄSSIG, M.; WELLE, M.; MEIER, D.; LOTT, G.; ERNI, D.; SCHENKER, N. S.; GUSCETTI, F.; BOO, G.; AXHAUSEN, K.; FABRIKANT, S.; FOLKERS, G.; POSPISCHIL, A. The Swiss canine cancer registry: a retrospective study on the occurrence of tumours in dogs in Switzerland from 1955 to 2008. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 152, n. 2-3, p. 161–171, 2015.

GUPTA, G. P.; NGUYEN, D. X.; CHIANG, A. C.; BOS, P. D.; KIM, J. Y.; NADAL, C.; GOMIS, R. R.; MANOVA-TODOROVA, K.; MASSAGUÉ, J. Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. **Nature**, London, v. 446, n. 7137, p. 765–70, 2007.

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

INCA. **Tipos de câncer: Mama**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama>. Acesso em: 19 jun. 2016.

IRIZARRY, R. A.; HOBBS, B.; COLLIN, F.; BEAZER-BARCLAY, Y. D. ANTONELLIS K. J.; SCHERF, U.; SPEED, T. P. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. **Biostatistics**, Oxford, v. 4, n. 2, p. 249-264, 2003.

JIANG, H.; REINHARDT, H. C.; BARTKOVA, J.; TOMMISKA, J.; BLOMQVIST, C.; NEVANLINNA, H.; BARTEK, J.; YAFFE, M. B.; HEMANN, M. T. The combined status of ATM and p53 link tumor development with therapeutic response. **Genes and Development**, Cold Spring Harbor, v. 23, n. 16, p. 1895–1909, 2009.

KLOPFLEISCH, R.; GRUBER, A. D. Increased expression of BRCA2 and RAD51 in lymph node metastases of canine mammary adenocarcinomas. **Veterinary Pathology**, New York, v. 46, n. 3, p. 416–422, 2009.

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

KLOPFLEISCH, R.; LENZE, D.; HUMMEL, M.; GRUBER, A. D. The Metastatic Cascade Is Reflected in the Transcriptome of Metastatic Canine Mammary Carcinomas. **Veterinary Journal**, London, v. 190, n. 2, p. 236–243, 2011.

KRISTIANSEN, V. M.; NØDTVEDT, A.; BREEN, A. M.; LANGELAND, M.; TEIGE, J.; GOLDSCHMIDT, M.; JONASDOTTIR, T.; GROTMOL, T.; SORENMO, K. Effect of ovariohysterectomy at the time of tumour removal in dogs with benign mammary tumours and hyperplastic lesions : a randomised controlled clinical trial. **European Journal of Companion Animal Practice**, Brussels, v. 24, n. 1, p. 56–66, 2013.

KRISTIANSEN, V. M.; PEÑA, L.; DÍEZ CÓRDOVA, L.; ILLERA, J. C.; SKJERVE, E.; BREEN, A. M.; COFONE, M. A.; LANGELAND, M.; TEIGE, J.; GOLDSCHMIDT, M.; SØRENMO, K. U. Effect of ovariohysterectomy at the time of tumor removal in dogs with mammary carcinomas: a randomized controlled trial. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 30, n. 1, p. 230–241, 2015.

KROL, M.; PAWLOWSKI, K. M.; SKIERSKI, J.; RAO, N. A. S.; HELLMEN, E.; MOL, J. A.; MOTYL, T. Transcriptomic profile of two canine mammary cancer cell lines with different proliferative and anti-apoptotic potential. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, Krakow, v. 60, n. supl. 1, p. 95–106, 2009.

KRÓL, M.; PAWŁOWSKI, K. M.; SKIERSKI, J.; TUROWSKI, P.; MAJEWSKA, a; POLAŃSKA, J.; UGORSKI, M.; MORTY, R. E.; MOTYL, T. Transcriptomic “portraits” of canine mammary cancer cell lines with various phenotypes. **Journal of applied genetics**, Cheshire, v. 51, n. 2, p. 169–183, 2010.

KRÓL, M.; PAWŁOWSKI, K. M.; SZYSZKO, K.; MACIEJEWSKI, H.; DOLKA, I.; MANUALI, E.; JANK, M.; MOTYL, T. The Gene Expression Profiles of Canine Mammary Cancer Cells Grown with Carcinoma-Associated Fibroblasts (CAFs) as a Co-Culture in Vitro. **BMC Veterinary Research**, London, v. 8, n. 1, p. 35, 2012.

KYUNG JIN EOH, HYUNG SEOK PARK, JI SOO PARK, S.-T. L.; JEONGWOO HAN, JUNG-YUN LEE, SANG WUN KIM, SUNGHOON KIM, YOUNG TAE KIM, E. J. N. Comparison of clinical outcomes of BRCA1/2 pathologic mutation, variants of unknown significance, or wild type epithelial ovarian cancer patients. **Cancer Research and Treatment**, New York, 2016.

LALLOO, F.; EVANS, D. G. Familial breast cancer. **Clinical Genetics**, Copenhagen, v. 82, n. 2, p. 105–114, 2012.

LAVIN, M. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 9, p. 18–21, 2008.

LORENZOVÁ, J.; CRHA, M.; KECOVÁ, H.; URBANOVÁ, L.; STAVINOHOVÁ, R.;

NEČAS, A. Patient survival periods and death causes following surgical treatment of mammary gland tumours depending on histological type of tumour: retrospective study of 221 cases. **Acta Veterinaria Brno**, Praha, v. 79, n. 2, p. 289–297, 2010.

MAESHIMA, Y.; OSETO, K.; KATSURAGI, R.; YOSHIMOTO, Y.; TAKAHARA, S.; YAMAUCHI, A. Breast cancer experience with bilateral risk-reducing mastectomy for an unaffected BRCA mutation carrier. **Journal of Breast Cancer**, Seoul, v. 79, n. 5, p. 431–437, 2016.

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

MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMÉN; LIPSCOMB, T. P.; BENJAMIN, S. A. Book review: histological classification of mammary tumors of the dog and cat. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 38, n. 6, p. 733–733, 2001.

MORRIS, J. S. Genomic and proteomic profiling for cancer diagnosis in dogs. **Veterinary Journal**, London, 2016.

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

MUCHA, J.; RYBICKA, A.; DOLKA, I.; SKA, J. S.; MANUALI, E.; PARZENIECKA-JAWORSKA, M.SKI, W. K.; KRO´, and M. Immunosuppression in dogs during mammary cancer development. **Veterinary Pathology**, New York, p. 1–7, 2016.

NATARAJAN, G.; OGHUMU, S.; TERRAZAS, C.; VARIKUTI, S.; BYRD, J. C.; SATOSKAR, A. R. A Tec Kinase BTK inhibitor ibrutinib promotes maturation and activation of dendritic cells. **Oncoimmunology**, Austin, v. 5, n. 6, p. 1–7, 2016.

NICHOLS, K. E.; MALKIN, D.; GARBER, J. E.; FRAUMENI J.F., J.; LI, F. P. Germ-Line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, Philadelphia, v. 10, n. 2, p. 83–87, 2001.

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

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

OWEN, L. N. **Tnm classification of tumors in domestic animals.** Ed. Geneva: World Health Organization, 1980.

PEÑA, L.; DE ANDRES, P. J.; CLEMENTE, M.; CUESTA, P.; PEREZ-ALENZA, M. D. Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. **Veterinary Pathology**, New York, v. 50, n. 1, p. 94–105, 2012.

PEREZ ALENZA , PEÑA L, DEL CASTILLO N, N. A. Factors influencing the incidence and prognosis of canine rnarnrn ltv turnours. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 41, n. 7, p. 287–291, 2000.

PEROU, C. M.; SØRLIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; REES, C.; POLLACK, J. R.; ROSS, D. T.; JOHNSEN, H.; AKSLEN, L. a; FLUGE, O.; PERGAMENSCHIKOV, a; WILLIAMS, C.; ZHU, S. X.; LØNNING, P. E.; BØRRESEN-DALE, L.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, London, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000.

PHILIBERT, J. C.; SNYDER, P. W.; GLICKMAN, N.; GLICKMAN, L. T.; KNAPP, D. W.; WATERS, D. J. Influence of Host Factors on Survival in Dogs with Malignant Mammary Gland Tumors. **Journal of veterinary internal medicine**, Philadelphia, v. 17, n. 1, p. 102–106, 2003.

PINHO, S. S.; CARVALHO, S.; CABRAL, J.; REIS, C. A.; GÄRTNER, F. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. **Translational Research : The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, New York, v. 159, n. 3, p. 165–172, 2012.

PROKOPCOVA, J.; KLEIBL, Z.; BANWELL, C. M.; POHLREICH, P. The role of ATM in breast cancer development. **Breast Cancer Research and Treatment**, Dordrecht, v. 104, n. 2, p. 121–128, 2007.

PUSZTAI, L.; AYERS, M.; STEC, J.; HORTOBÁGYI, G. N. Clinical application of cDNA microarrays in oncology. **The Oncologist**, Dayton, v. 8, n. 3, p. 252–258, 2003.

QUEIROGA, F. L.; RAPOSO, T.; CARVALHO, M. I.; PRADA, J.; PIRES, I. Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. **In vivo,** Athens, v. 25, n. 3, p. 455–465, 2011.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. **Tumores Mamários Caninos – Novas Perspectivas**. Congresso de Ciências Veterinárias, SPCV, v. 3, p. 183–190, 2002.

RAKHA, E. A.; EL-SAYED, M. E.; REIS-FILHO, J.; ELLIS, I. O. Patho-biological aspects of basal-like breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, Dordrecht, v. 113, n. 3, p. 411–422, 2009.

RAO, N. A. S.; VAN WOLFEREN, M. E.; GRACANIN, A.; BHATTI, S. F. M.; KROL, M.;

HOLSTEGE, F. C.; MOL, J. A. Gene expression profiles of progestin-induced canine mammary hyperplasia and spontaneous mammary tumors. **Journal of Physiology and Pharmacology : An Official Journal of the Polish Physiological Society**, Krakow, v. 60, n. supl. 1, p. 73–84, 2009.

RAO, N. A. S.; VAN WOLFEREN, M. E.; VAN DEN HAM, R.; VAN LEENEN, D.; GROOT KOERKAMP, M. J. A.; HOLSTEGE, F. C. P.; MOL, J. A. cDNA microarray profiles of canine mammary tumour cell lines reveal deregulated pathways pertaining to their phenotype. **Animal Genetics**, Oxford, v. 39, n. 4, p. 333–345, 2008.

RASOTTO, R.; GOLDSCHMIDT, M. H.; CASTAGNARO, M.; CARNIER, P.; CALIARI, D.; ZAPPULLI, V. The dog as a natural animal model for study of the mammary myoepithelial basal cell lineage and its role in mammary carcinogenesis. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 151, n. 2-3, p. 166–180, 2014.

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

RIPPERGER, T.; GADZICKI, D.; MEINDL, A.; SCHLEGELBERGER, B. Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling. **European journal of human genetics : EJHG**, Basel, v. 17, n. 6, p. 722–731, 2009.

SAIDI, S. A; HOLLAND, C. M.; KREIL, D. P.; MACKAY, D. J. C.; CHARNOCK-JONES, D. S.; PRINT, C. G.; SMITH, S. K. Independent component analysis of microarray data in the study of endometrial cancer. **Oncogene**, Basingstoke, v. 23, n. 39, p. 6677–6683, 2004.

SANTOS, A. A. F.; OLIVEIRA, J. T.; LOPES, C. C. C.; AMORIM, I. F.; VICENTE, C. M. F. B.; GÄRTNER, F. R. M.; MATOS, A. J. F. Immunohistochemical Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Canine Mammary Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 143, n. 4, p. 268–275, 2010.

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

SHIN, A.; CAI, Q.; SHU, X.; GAO, Y.; ZHENG, W. Research article genetic polymorphisms in the matrix metalloproteinase 12 gene (MMP12) and breast cancer risk and survival : the shanghai breast cancer study. **Breast Cancer Research**, London, v. 7, n. 4, p. 506–512, 2005.

SILVER, I. A. The Anatomy of the Mammary Gland of the Dog and Cat. **Journal of**

small animal practice, Oxford, v. 7, n. 11, p. 689–696, 1966.

SONG, L.; LIN, C.; WU, Z.; GONG, H.; ZENG, Y.; WU, J.; LI, M.; LI, J. miR-18a impairs dna damage response through downregulation of ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase. **PloS One**, San Francisco, v. 6, n. 9, p. e25454, 2011.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **The Veterinary Clinics of North America. Small animal practice**, Philadelphia, v. 33, n. 3, p. 573–596, 2003.

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

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

SORENMO, K. U.; SHOFER, F. S.; GOLDSCHMIDT, M. H. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 14, n. 3, p. 266–270, 2000.

SORENMO, K. U.; WORLEY, D. R.; GOLDSCHMIDT, M. H. Tumors of the mammary gland. In: **Small Animal Clinical Oncology**. 5th. ed. Saint Louis: Elsevier Saunders, 2013. p. 538–547.

RAPOSO-FERREIRA, T. M. M.; BUENO, R. C.; TERRA, E. M.; AVANTE, M. L.; TINUCCI-COSTA, M.; CARVALHO, M.; CASSALI, G. D.; LINDE, S. D.; ROGATTO, S. R. LAUFER-AMORIM, R. Downregulation of ATM gene and protein expression in canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, New York, p. 1–6, 2016.

TATEYAMA, S.; UCHIDA, K.; HIDAKA, T.; HIRAO, M.; YAMAGUCHI, R. Expression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in myoepithelial cells in canine mammary gland tumors. **Veterinary Pathology**, New York, v. 38, n. 2001, p. 703–709, 2001.

TAVASSOLI, F. A. **Pathology of the Breast**. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1999.

TAVTIGIAN, S. V.; OEFNER, P. J.; BABIKYAN, D.; HARTMANN, A.; HEALEY, S.; LE CALVEZ-KELM, F.; LESUEUR, F.; BYRNES, G. B.; CHUANG, S. C.; FOREY, N.; FEUCHTINGER, C.; GIOIA, L.; HALL, J.; HASHIBE, M.; HERTE, B.; MCKAY-CHOPIN, S.; THOMAS, A.; VALLÉE, M. P.; VOEGELE, C.; WEBB, P. M.; WHITEMAN, D. C.; SANGRAJRANG, S.; HOPPER, J. L.; SOUTHEY, M. C.; ANDRULIS, I. L.; JOHN, E. M.; CHENEVIX-TRENCH, G. Rare, evolutionarily unlikely missense

substitutions in atm confer increased risk of breast cancer. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 85, n. 4, p. 427–446, 2009.

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

TERRA, E. M.; RODRIGUES, M. M. M. P.; MAGALHÃES, G. M.; COSTA, M. T.; AMORIM, R. L.; ROCHA, N. S. Immunohistochemical expression of p53 and p63 in adenomas and carcinomas of canine mammary glands. **Open Journal of Veterinary Medicine**, New York, v. 2, p. 21–24, 2012.

TOMMISKA, J.; BARTKOVA, J.; HEINONEN, M.; HAUTALA, L.; KILPIVAARA, O.; EEROLA, H.; AITTOMÄKI, K.; HOFSTETTER, B.; LUKAS, J.; VON SMITTEN, K.; BLOMQVIST, C.; RISTIMÄKI, A.; HEIKKILÄ, P.; BARTEK, J.; NEVANLINNA, H. The DNA damage signalling kinase ATM is aberrantly reduced or lost in BRCA1/BRCA2-deficient and ER/PR/ERBB2-triple-negative breast cancer. **Oncogene**, Basingstoke, v. 27, n. 17, p. 2501–2506, 2008.

VASCELLARI, M.; CAPELLO, K.; CARMINATO, A.; ZANARDELLO, C.; BAIONI, E.; MUTINELLI, F. Incidence of Mammary Tumors in the canine population living in the veneto region (Northeastern Italy): risk factors and similarities to human breast cancer. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 126, p. 183–189, 2016.

VON DEETZEN, M. C.; SCHMECK, B.; GRUBER, A. D.; KLOPFLEISCH, R. Molecular quantification of canine specific microRNA species. **Research in Veterinary Science**, London, v. 95, n. 2, p. 562–568, 2013.

VU, T. H.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases : effectors of development and normal physiology. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, n. 415, p. 2123–2133, 2000.

WAHA, A.; STURNE, C.; KESSLER, A.; KOCH, A.; KREYER, E.; FIMMERS, R.; WIESTLER, O. D.; VON DEIMLING, A.; KREBS, D.; SCHMUTZLER, R. K. Expression of the ATM gene is significantly reduced in sporadic breast carcinomas. **International Journal of Cancer**, New York, v. 78, n. 3, p. 306–309, 1998.

WASSERMAN, J. K.; WILLIAMS, P. A.; ISLAM, S.; ROBERTSON, S. J. Pathology – Research and Practice GATA-3 Expression is not associated with complete pathological response in triple negative breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. **Pathology - Research and Practice**, Stuttgart, v. 212, n. 6, p. 539–544, 2016.

WEIGELT, B.; HORLINGS, H.; KREIKE, B.; HAYES, M.; HAUPTMANN, M.; WESSELS, L.; DE JONG, D.; VAN DE VIJVER, M.; VEER, L. V.; PETERSE, J.

Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. **The Journal of Pathology**, Chichester, v. 216, n. 2, p. 141–150, 2008.

WENSMAN, H.; GÖRANSSON, H.; LEUCHOWIUS, K.-J.; STRÖMBERG, S.; PONTÉN, F.; ISAKSSON, A.; RUTTEMAN, G. R.; HELDIN, N.-E.; PEJLER, G.; HELLMÉN, E. Extensive expression of craniofacial related homeobox genes in canine mammary sarcomas. **Breast Cancer Research and Treatment**, Dordrecht, v. 118, n. 2, p. 333–343, 2009.

YAMAGAMI, T.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, K.; SUGIYAMA, M. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 58, n. 11, p. 1079–1083, 1996.

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

YE, S. Polymorphism in Matrix Metalloproteinase Gene Promoters : Implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. **Matrix Biology**, Amsterdam, p. 623–629, 2000.

ZHANG, P.; WEI, Y.; WANG, L.; DEBEB, B. G.; YUAN, Y.; ZHANG, J.; YUAN, J.; WANG, M.; CHEN, D.; SUN, Y.; WOODWARD, W. a; LIU, Y.; DEAN, D. C.; LIANG, H.; HU, Y.; ANG, K. K.; HUNG, M.-C.; CHEN, J.; MA, L. ATM-mediated stabilization of zeb1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1. **Nature Cell Biology**, London, v. 16, n. 9, p. 864–875, 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE 1. Técnica de *microarray* (análise em larga escala).

Para o preparo das amostras para hibridização no GeneChip 1.0 ST Array (Affymetrix) foi utilizado o protocolo de marcação, conforme recomendação do fabricante, com 250ng de RNA total, denominado *Whole Transcript (WT) Expression Arrays GeneChip*. Controles com RNA Poly-A foram realizados em quatro diferentes concentrações de estocagem. Para sua realização, utilizou-se o tampão de diluição fornecido com o kit e assim, foram feitas três diluições seriadas conforme recomendação do fabricante. Foi adicionado 5uL da diluição final ao volume de cada amostra contendo 2uL de RNA total para compor a mistura de RNA Total/RNA Poly-A. Em seguida, foram acrescentados 5uL do primeiro mix do kit (*First Strand mix*) nas amostras contendo a mistura de RNA Total/ RNA Poly-A. Essa reação foi incubada por 60 min a 25°C, 60 min a 42ºC e por 2 min a 4°C. Assim, a síntese da 1°e 2° fitas de cDNA, bem como a transcrição de cDNA em cRNA, foram feitas conforme indicação do fabricante.

A purificação dessa reação ocorreu com a utilização de *beads* magnéticas de cRNA *Cleanup Spin* do Kit GeneChip *Sample Cleanup Module*, seguindo as especificações do fabricante. A concentração de cRNA foi analisada utilizando o NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA), a concentração mínima obtida foi de 625 ng/uL. Desse modo, foi feita a síntese da 1° e 2° fitas de cDNA (2° ciclo), tratamento com RNase H e dosagem do rendimento como recomendado pelo fabricante.

Após a purificação com *beads* magnéticas, foram utilizados 5,5ug de cDNA total ou 176ng/uL de fita única. Para a fragmentação do DNA fita única adicionou-se 10uL de água livre de RNase, 4,8uL de 10X DNA Fragmentation Buffer, 1,0uL de UDG (10U/uL), 1,0uL APE (1000 U/uL). A reação foi incubada por 60 min a 37°C, 93°C por 2 min e 4°C. Para a marcação foram adicionados 12uL de 5X TdT Buffer, 2uL de TdT, 1uL de DNA Labelling Reagent (5mM) e finalmente, 45uL de DNA fita única fragmentado. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 60 min, 70°C por 10 min, 4°C por 2 min. O mix de hibridação era composto por 1,7uL do reagente Control Oligonucleotide B2 (3nM), 5uL do 20X Eucaryotic hibridization, 50uL do 2X Hibridization Mix, 7uL de DMSO, 9,3L de água livre de RNase e 27uL de DNA

fita única fragmentado. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas a 99°C por 5 min e em seguida a 45°C por 5 min. Ao final, foram aplicados 130uL dessa solução no GeneChip canino (3,5 ug de ss-DNA fragmentado e marcado) seguindo-se a etapa de hibridação (Hybridization Oven 640, Affymetrix, P/N 800138 110V) à rotação de 60 rpm, 45°C, durante 16h.

Posteriormente, os GeneChips foram submetidos a 10 ciclos de lavagem a 25°C com tampão não estringente (6X SSPE, 0.01% Tween-20) e 8 ciclos de lavagem a 50°C com tampão estringente (10 mM MES, 0,1 M [Na+], 0.01% Tween 20). Após, foi realizada nova lavagem de 10 ciclos com tampão não estringente a 30°C, os GeneChips foram incubados por 10 min com solução contendo 300 uL de Stain Buffer 2X, 24 uL de BSA (50mg/mL); 6uL de Goat IgG Stock 10mg/mL; 3,6uL de anticorpo biotinilado 0,5mg/mL e 266,4 uL de água deionizada. A seguir, procedeu-se à segunda etapa de incubação em solução SAPE por 10 min a 25°C. A lavagem final foi realizada em 35 ciclos a 35°C utilizando o tampão estringente.

APÊNDICE 2. Resultados obtidos durante a avaliação da concentração e qualidade do RNA extraído e de sua integridade pelo NanoDrop™ e Bionalyzer (*RIN*), respectivamente.

Caso	Grupo	[ ] ng/□L	260/280	230/260	*RIN*
1	B	594,2	1,96	2,21	8,9
2	B	1570	2,03	2,16	8,5
3	B	3040	1,77	1,84	9,6
4	B	1667	2	2,13	9
5	B	798,2	1,95	2,31	7,4
6	B	4865,5	2,02	2,19	7,6
7	B	1149	2,03	1,37	8,2
8	M	1418,2	1,89	2,19	9,4
9	M	1183	1,97	2,29	8,3
10	M	3008	1,88	2,16	9,6
11	M	945,4	1,91	2,16	8,1
12	M	817,9	1,93	2,28	9
13	M	2631	1,91	2,01	9,8
14	M	213,5	1,8	2,31	8
15	M	1723,6	1,98	2,23	8
16	M	8429,8	2,02	2,2	8,9
17	M	2158,8	2	2,07	8,4
18	M	2993	1,66	1,7	9
19	M	2524	1,9	1,95	8
20	M	1523	1,98	1,88	8,2
21	M	868,3	2,11	1,47	7,1
22	M	262,4	1,9	2,04	8,1
23	M	2284	1,97	1,92	9,2
24	M	2600	1,92	1,69	9,5
25	M	2660	1,92	1,93	9,3
26	M	3429,7	2,02	2,22	8,4
27	M	855,5	1,94	2,27	8
28	M	1280	2,02	2,18	8,8
29	M	1254	2	2,11	9
30	M	1200	1,9	2,29	9,1
31	M	1088,3	1,94	2,09	8,8
32	M	992,4	1,91	2,14	9,3
33	M	732,2	1,94	1,96	7,6
34	M	2694	1,87	1,86	8,8
35	M	1771	1,92	2,16	8,9
36	M	1046	1,97	1,98	7,3
37	M	2783	1,79	1,9	9,2

38	M	1806	1,98	1,98	8,8
39	M	420,1	2,01	1,85	7,1
40	M	2884	1,72	1,87	8,6
41	M	1805	1,99	1,96	8,8
42	M	2785	1,82	1,89	8,4
43	M	1448	2,01	1,95	8,6
44	M	1810	1,97	2,09	9,2
45	M	2647	1,89	1,88	9,2
46	M	307,6	1,91	2,17	8,8
47	M	1472	2,04	1,64	8,8
48	M	2476	1,92	1,94	8,7
49	M	443,4	1,87	1,95	7,1
50	M	2009	1,91	1,79	8,9
51	M	1317	2,05	2	7,6
52	M	2429	1,93	2,05	8
53	M	656,8	2,03	2,01	9,2
54	N	2875	1,69	1,79	8,8
55	N	1433	1,98	2,28	9,4
56	N	1115	1,99	2,16	6,7
57	N	2853	1,73	1,85	7,8
58	N	1113	1,98	2,31	6,8
59	N	1542	1,97	2,21	7,8
60	N	1721	1,97	2,22	7,1
61	N	220,6	1,76	2,31	6,7
62	N	322,5	1,84	2,26	7,6
63	N	507,4	1,93	2,32	7,1

B = tumor benigno, M = tumor maligno e N = glândula mamária normal.

APÊNDICE 3. Dados clínicos dos pacientes com carcinomas mamários (N=46).

Variável	N (%)
Idade (anos)	
< 9	8 (17,4)
9 a 11	20 (43,5)
> 11	18 (39,1)
***Status* reprodutivo**	
Castrada	9 (19,6)
Inteira	37 (80,4)
Pseudociese	
Sim	20 (43,5)
Não	21 (45,6)
Não informado pelo proprietário	5 (10,9)
Uso de contraceptivo	
Sim	2 (4,4)
Não	38 (82,6)
Não informado pelo proprietário	6 (13)
Número de tumores mamários	
1	25 (54,3)
> 1	21 (45,7)
Ulceração tumoral	
Sim	7 (15,2)
Não	39 (84,8)
Tamanho tumoral (cm)	
< 3	13 (28,3)
3 a 5	15 (32,6)
> 5	18 (39,1)
Metástase	
Sem metástase	35 (71,4)
Regional	3 (6,1)
a distância	4 (8,1)
Ambos	7 (14,4)
Estadiamento clínico	
1	13 (28,3)
2	11 (23,9)
3	8 (17,4)
4	2 (4,3)
5	12 (26,1)

APÊNDICE 4. Curva de sobrevida entre os carcinomas mamários não metastáticos (linha sólida) e metastáticos (linha pontilhada), pelo método de Kaplan-Meier e significância estatística determinada pelo teste de log-rank com valores de p<0,05 considerados significativos, através do programa GraphPad Prism6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

