Simone Crestoni Fernandes

Via da vitamina D em tumores de mama de cadelas

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida
Azevedo Koike Folgueira

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Fernandes, Simone Crestoni

Via da vitamina D em tumores de mama de cadelas / Simone Crestoni
Fernandes. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.

Orientadora: Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira.

Descritores: 1.Vitamina D 2.Neoplasias mamárias animais 3.Técnicas de
cultura de tecidos 4.Receptores de vitamina D 5.Calcitriol 6.Expressão gênica
7.Cães 8.Imunoistoquímica

USP/FM/DBD-382/13

Por toda a pureza,
simplicidade, coragem e
amor, são aos animais
que dedico essa tese.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço às pessoas mais importantes da minha vida, meus pais. Seria impossível ter realizado esse trabalho sem o apoio deles, sem o estímulo, paciência e amor incondicional. Muito obrigada por terem aguentado ao meu lado, todo o meu cansaço, ausência, estresse e péssimo humor, me animando sempre para seguir em frente;

Ao meu namorado Diego Pereira Gimenes que acompanhou todo o meu doutorado, por todo o seu amor, companheirismo e absurda paciência, por ter ficado ao meu lado até nos momentos mais difíceis, aguentado meu constante cansaço, o seu apoio foi fundamental para a conclusão dessa tese;

À minha orientadora Profa Dra Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira, por ter aceito mais uma veterinária no grupo, por ter me auxiliado inúmeras vezes em assuntos profissionais e pessoais, por inúmeras discussões que só me fizeram crescer, por sempre estar disposta a me ajudar e dividir sua experiência e sabedoria comigo;

À Profa Lucia Maria Silveira, por todo o esforço para conseguir completar as 70 cadelas, pelo apoio fundamental nesses anos e pela preciosa amizade, mais um grande presente que ganhei do doutorado;

Ao Prof Dr Roger Chammas, que iniciou tudo quando aplicou a minha prova de admissão do doutorado e me aprovou, por ter dividido toda a sua sabedoria e feito com que eu enxergasse a ciência e a pesquisa com outros olhos;

À Profa Dra Mitzi Maria Brentani e ao Prof Dr Igor Snitkovsky, pela absurda sabedoria transmitida ao longo desses anos;

Aos queridos da FMV-UNIP, Prof Keiji Sato, Prof João Paulo Boccia, Prof Carlos Brunner, Profa Silmara, Enfermeiro Oceliaco e Alunos, que me ajudaram muito na hora de colher as amostras, nas loucuras das campanhas de castração, de me ajudar mesmo na rotina louca do hospital, fazendo contagem regressiva das amostras junto comigo, sempre animados e dispostos a ajudar;

À Profa Dra Clair Motos de Oliveira, pelas amostras cedidas apesar da FMVZ-USP não atender tumores de mama;

Às pesquisadoras Dra Lúcia Hirata Katayama (com aquele sorriso acolhedor), Dra Rosimeire Roela, Dra Fátima Pasini e MSc Tatiane Furuya

pelas inúmeras conversas, socorros, ensinamentos e momentos de descontração;

À Maria José Benevides, por sempre estar pronta a ajudar nas horas de aperto, sempre com um maravilhoso humor, a alma do LIM-24;

Aos meus amigos moleculoides, parceiros de bancada e “senzala” do LIM-24: MSc Paulo Roberto Del Valle, quase MSc Victor Celso Nogueira, Dra Yuri Urata, Profa Dra Cintia Milani, quase Dra Giselly Encinas, Dra Adriana Priscila Trapé, quase Dra Elen Pereira Bastos, MSc Laura Tojeiro Campos, MSc Karina Augusto Escobar, Dra Natália Bromberg, Arthur Willian Alvarenga, MSc Bruno Cadima, Carla Pinheiro, quase Dra Iara Sant’Ana Rodrigues, quase Dr Mateus Barros, MSc Júlia Pires, Nádia Magalhães, MSc Daniele Fontes Almeida e MSc Rita de Cássia Borges de Castro pelas risadas, discussões, desabafos, cafés, almoços, doces da cantina, happy hours, carinho e cumplicidade, nunca vou esquecer nenhum de vocês;

À Cristina, pela ajuda com as fotos, com certeza ela é uma artista;

Ao Jair Claudio e Willame Macedo, pela descontração diária;

À funcionária Ivonete Lima, por toda a sua descontração e as hilárias noites de unhas;

Ao grupo de Adesão Celular, pela ajuda nos momentos que faltava material, pelos desabafos, conversas e companheirismo;

Aos meus irmãos Ricardo e Wanderley Crestoni Fernandes, minha cunhada Márcia Faggian Rocha e meus sobrinhos Guilherme e Rodrigo Rocha Fernandes, por entenderem a minha constante ausência e me apoiarem em todo o percurso;

À Renata Sobral, por ter me introduzido no LIM-24 e me estimulado a fazer o doutorado;

À Juliana Mariotti Guerra e Suely Nonogaki, pela ajuda com a imunoistoquímica;

Ao Prof Dr José Guilherme Xavier, pelo ajuda com o histopatológico;

Ao Prof Dr Rafael Malagoli Rocha, por abrir as portas do Hospital A.C. Camargo Cancer Center para realização das imunoistoquímicas;

Ao Prof Dr Alceu Afonso Jordão Júnior, por ter permitido que eu fizesse a cromotografia no seu laboratório na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e à Marina Mendonça Dias, pela ajuda com a técnica e análise;

À Profa Dra Shigueko e à Teresinha, por dividir o laboratório com a gente, mantendo sempre um ambiente agradável;

Aos meus amigos Vets, do São Luís, de Jaboticabal e da Vida, por continuar a amizade mesmo com toda a minha ausência, tem que ser muito amigo para entender e perdoar;

À Família Pereira Gimenes (Wilson, Maria Jacinta, Maria Gabriela, Rafael, Beatriz, Nina e Fusca), pela compreensão nos momentos difíceis e alegria com que sempre me acolheram;

À minha avó Benedita Crestoni *in memoriam*, que me ensinou a se corajosa e guerreira, saudades eternas;

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por ceder o espaço e a estrutura;

À todos os proprietários que cederam as amostras de seus cães e pacientemente responderam ao questionário, e também aos cães que contribuíram com o estudo;

Ao Prof Dr David J. Argyle e todo sua equipe pela oportunidade de acompanhá-los no Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário da Universidade de Edimburgo (Riddell-Swan Veterinary Cancer Centre, Hospital for Small Animals, The Royal Dick School of Veterinary Studies, The University of Edinburgh) e o centro de pesquisas The Roslin Institute, The University of Edinburgh;

À Fapesp, pelo apoio financeiro (Auxílio à Pesquisa – processo nº 2010/04169-1 e Bolsa Regular de Doutorado – processo nº 2010/01837-3);

E à todos aqueles que contribuíram de alguma forma para esse trabalho ser concluído, mas que acabei esquecendo por desgaste cerebral.

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Quadros

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo Geral.....	11
2.2 Objetivos Específicos.....	11
3. MÉTODOS.....	13
3.1 Seleção dos Animais.....	13
3.2 Coleta e Processamento das Amostras.....	16
3.3 Radioimunoensaio (RIE).....	16
3.4 Cultura de Tecidos e Tratamento com Vitamina D.....	17
3.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	18
3.6 Extração de RNA Total.....	19
3.7 Reação de Transcriptase Reversa (RT) para Obtenção de cDNA.....	20
3.8 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (RTqPCR) ..	21
3.8.1 Descrição da Técnica de RTqPCR.....	21
3.8.2 Escolha dos genes e amostras utilizadas.....	22
3.8.3 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>).....	23
3.8.4 Cálculo da eficiência da amplificação dos <i>primers</i>	25

3.8.5 Análise dos dados da expressão.....	25
3.9 Reação de Imunoistoquímica.....	26
3.10 Análise Estatística.....	37
4. RESULTADOS.....	39
4.1 Característica dos Animais do Grupo Controle e Tumor de Mama.....	39
4.2 Caracterização dos Tumores.....	41
4.2.1 Diagnóstico Histopatológico.....	41
4.2.2 Subtipos moleculares (RP, RE e HER-2).....	43
4.3 Dosagem sérica de 25(OH)D ₃	55
4.3.1 Concentração sérica de 25(OH)D ₃ na espécie canina.....	55
4.3.2 Concentração sérica de 25(OH)D ₃ no grupo controle.....	59
4.3.3 Concentração sérica de 25(OH)D ₃ nas cadelas com tumor de mama	63
4.4 Expressões gênica e proteica de VDR.....	71
4.4.1 Tecidos normais.....	72
4.4.2 Tecidos tumorais.....	75
4.4.3 Comparação entre tecidos normais e tumorais.....	82
4.5 Cultura de Tecidos e Tratamento com Vitamina D.....	84
4.6 Concentração tecidual de vitamina D.....	89
4.7 Expressão de genes do metabolismo da vitamina D (<i>CYP24A1</i> e <i>CYP27B1</i>)....	93
4.7.1 Tecidos normais.....	93
4.7.2 Tecidos tumorais.....	95
4.7.3 Comparação entre tecidos normais e tumorais.....	96
4.8 Expressão de genes candidatos (<i>CDKN1A</i> , <i>CDKN1B</i> e <i>CD14</i>).....	98
4.8.1 Tecidos normais.....	98

4.8.2 Tecidos tumorais.....	100
4.8.3 Comparação entre tecidos normais e tumorais.....	102
4.9 Análise da proliferação (expressão proteica de Ki-67).....	105
4.9.1 Tecidos normais.....	105
4.9.2 Tecidos tumorais.....	108
4.9.3 Comparação entre tecidos normais e tumorais.....	111
4.10 Análise de apoptose (expressão proteica de caspase-3 clivada).....	112
4.10.1 Tecidos normais.....	113
4.10.2 Tecidos tumorais.....	116
4.10.3 Comparação entre tecidos normais e tumorais.....	119
5. DISCUSSÃO.....	121
6. CONCLUSÕES.....	133
7. ANEXOS.....	135
8. REFERÊNCIAS.....	163

Lista de Abreviaturas

ALT - Alanina amino transferase

ATP5B - ATP-sintase subunidade 5B

CASP3 - Caspase 3 clivada, *apoptosis-related cysteine peptidase*

CD14 - *Cluster of differentiation 14 molecule*

CDK2 - quinase dependente de ciclina 2

CDKN1A - inibidor de quinase dependente de ciclina 1A p21, Cip1)

CDKN1B - inibidor de quinase dependente de ciclina 1B p27, Kip1)

cDNA - DNA complementar

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Ct - Ciclo limiar, *Cycle threshold*

CYP24A1 - Gene que codifica a enzima 24 hidroxilase (citocromo P450, família 24, subfamília A, polipeptídeo 1)

CYP27B1 - Gene que codifica a enzima 1 α hidroxilase (citocromo P450, família 27, subfamília B, polipeptídeo 1)

DMEM - Meio Dulbecco Modificado

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

DTT - Ditioneitol

FISH - Hibridização fluorescente *in situ*

HE - Hematoxilina e eosina

HER-2 - Receptor do fator de crescimento humano epidermal 2

Ki-67 - Marcador de proliferação celular

MCF-7 - Linhagem celular epitelial mamária proveniente de adenocarcinoma mamário

p21 - proteína codificada pelo gene *CDKN1A*

p27 - proteína codificada pelo gene *CDKN1B*

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RE - Receptor de estrógeno

RIE - Radioimunoensaio

RNA - Ácido ribonucleico

RNA_m - RNA mensageiro

RP - Receptor de progesterona

RPL32 - proteína ribossomal L32

RPMI - Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

RT - Transcrição reversa

RXR - Receptor de ácido retinóico

TGFβ₂ - Fator de crescimento transformador beta

uPA - plasminogênio tipo uroquinase

VD - Vitamina D

Vitamina D₃ - Colecalciferol

Vitamina D₂ - Ergocalciferol

VDR - Receptor de Vitamina D

VDRE - Elemento de resposta ao receptor de vitamina D

Lista de Figuras

Figura 1. Reação de imunoistoquímica com BSA (controle negativo) em fatias de tecidos mamários não submetidas à cultura de tecidos.....	28
Figura 2 – Expressão proteica de VDR em amostras de glândulas mamárias divididas em padrões segundo a localização da marcação nuclear.....	31
Figura 3 – Expressão proteica de α actina de músculo liso em tecidos mamários de cadelas não submetidos à cultura de tecidos (para marcação de células mioepiteliais).....	33
Figura 4 – Expressão proteica de pancitoqueratina em tecidos mamários de cadelas não submetidos à cultura de tecidos (para marcação de células epiteliais e mioepiteliais).....	34
Figura 5 – Expressão proteica de vimentina em tecidos mamários de cadelas não submetidos à cultura de tecidos (para marcação de células mesenquimais e mioepiteliais).....	35
Figura 6 – Expressão proteica de desmina em tecidos mamários de cadelas não submetidos à cultura de tecidos (para marcação de tecido muscular e diferenciação óssea).....	36
Figura 7 – Expressão proteica de RE em amostras de glândulas mamárias tumorais distribuídas pela classificação em pontuações de 0 a 7 (n=63).....	44
Figura 8 – Expressão proteica de HER-2 em amostras de glândulas mamárias tumorais distribuídas pela classificação em pontuações de 0 a 7 (n=65).....	44
Figura 9 – Expressão proteica de RE em amostras de glândulas mamárias tumorais realizadas por IHQ distribuídas pela classificação em pontuações de 0 a 7 em comparação com a expressão gênica realizada por RTq-PCR (Teste Wilcoxon, $p=0,005$, $n=59$).....	45
Figura 10 – Expressão proteica de HER-2 em amostras de glândulas mamárias tumorais distribuídas pela classificação em pontuações de 0 a 7 em comparação com a expressão gênica realizada por RTq-PCR (Teste Wilcoxon, $p<0,001$, $n=59$)....	45
Figura 11 – Expressão proteica de RE em tecidos mamários tumorais de cadelas não submetidos à cultura de tecidos.....	47
Figura 12 – Expressão proteica de HER-2 em tecidos mamários tumorais de cadelas não submetidos à cultura de tecidos.....	48
Figura 13 – Expressão proteica de HER-2 em amostras de glândulas mamárias tumorais distribuídas em positivas ou negativas segundo o método HercepTest (n=54).....	49

Figura 14 – Expressão proteica de HER-2 em amostras de glândulas mamárias tumorais distribuídas em positivas ou negativas segundo o método HercepTest e classificadas em tumores benignos ou em carcinomas (n=52).....	50
Figura 15 – Expressão proteica de RE em amostras de glândulas mamárias tumorais distribuídas em positivas ou negativas (n=62).....	51
Figura 16 – Expressão proteica de RE em amostras de glândulas mamárias tumorais distribuídas em positivas ou negativas classificadas em tumores benignos ou em carcinomas (n=57).....	51
Figura 17 – Comparação da expressão gênica relativa de RE realizada através de RT-qPCR com as amostras classificadas como positivas ou negativas segundo a expressão proteica (IHQ) das mesmas amostras de tumor de mama.....	54
Figura 18 – Comparação da expressão gênica relativa de HER-2 realizada através de RT-qPCR com as amostras classificadas como positivas ou negativas segundo a expressão proteica (IHQ) das mesmas amostras de tumor de mama.....	54
Figura 19 – Comparação entre a idade nas cadelas sem tumor, nos cães machos sem tumor e nas cadelas com tumor de mama (Teste de Kruskal Wallis, $p < 0,001$, n=80).....	55
Figura 20 – Comparação entre peso e os grupos controle fêmea, controle macho e tumor mamário (Teste de Kruskal Wallis, $p = 0,586$, n=82).....	56
Figura 21 – Distribuição dos animais nos grupos controle fêmea, controle macho e tumor em relação ao porte (Teste de Kruskal Wallis, $p = 0,815$, n=93).....	57
Figura 22 – Comparação entre concentração sérica de 25(OH)D ₃ entre as cadelas sadias (controle) e as cadelas com tumor de mama (Teste Mann-Whitney, $p = 0,350$, n=89).....	58
Figura 23 – Comparação entre concentração sérica de 25(OH)D ₃ entre as cadelas com tumor de mama e o grupo controle (machos e fêmeas) (Teste Kruskal Wallis, $p = 0,688$, n=103).....	58
Figura 24 – Correlação entre concentração sérica de 25(OH)D ₃ e idade em cadelas sem tumor (n=31), cães machos sem tumor (n=10) e cadelas com tumor de mama (n=39) (Correlação de Pearson, $p = 0,464$, $r = -0,830$, n=80).....	59
Figura 25 – Concentração sérica de 25(OH)D ₃ em animais controle (Teste T Student bicaudal, $p = 0,012$).....	60
Figura 26 – Correlação entre concentração sérica de 25(OH)D ₃ e idade em cadelas do grupo controle (cadela sadias) (Correlação de Pearson; $p = 0,670$ n=31; $r = 0,080$).....	60
Figura 27 – Comparação entre concentração sérica de 25(OH)D ₃ e tipo de alimentação nas cadelas do grupo controle (cadela sadias) (Teste Kruskal Wallis, $p = 0,001$, n=30).....	61

Figura 28 – Comparação entre concentração sérica de 25(OH)D ₃ e tipo de alimentação nos cães machos do grupo controle (Teste Kruskal Wallis, p= 0,670, n=10).....	62
Figura 29 – Comparação entre concentração sérica de 25(OH)D ₃ e exposição solar nas cadelas fêmeas do grupo controle (Teste Kruskal Wallis, p= 0,943, n=29).....	62
Figura 30 – Correlação entre concentração sérica de 25(OH)D ₃ e idade entre as cadelas com tumor de mama (Correlação de Pearson, p=0,042, r=-0,327, n=39).....	63
Figura 31 – Comparação entre concentração sérica de 25(OH)D ₃ e castração nas cadelas com tumor de mama (Teste Mann-Whitney, p= 0,107, n=39).....	65
Figura 32 – Comparação entre concentração sérica de 25(OH)D ₃ e tipo de alimentação nas cadelas do grupo tumoral (Teste Kruskal Wallis, p= 0,446, n=30).....	66
Figura 33 – Comparação entre concentração sérica de 25(OH)D ₃ e exposição solar nas cadelas fêmeas portadoras de neoplasia mamária (Teste Kruskal Wallis, p= 0,086, n=39).....	67
Figura 34 – Comparação entre concentração sérica de 25(OH)D ₃ e comprimento dos pelos nas cadelas fêmeas portadoras de neoplasia mamária (Teste Kruskal Wallis, p= 0,404, n=39).....	68
Figura 35 – Comparação entre concentração sérica de 25(OH)D ₃ e cor dos pelos nas cadelas fêmeas portadoras de neoplasia mamária (Teste Kruskal Wallis, p= 0,580, n=39).....	69
Figura 36 – Comparação entre concentração sérica de 25(OH)D ₃ e a histologia dos tumores de mama (Teste Kruskal Wallis, p= 0,693, n=39).....	70
Figura 37 – Comparação entre concentração sérica de 25(OH)D ₃ e a histologia dos tumores de mama (Teste Kruskal Wallis, p= 0,781, n=37).....	71
Figura 38 – Porcentagem de animais de acordo com a expressão proteica do VDR em amostras de glândulas mamárias normais distribuídas pela classificação em pontuações de 1 a 7 (Teste Chi-quadrado, p=0,001, n=44).....	72
Figura 39 – Expressão proteica do VDR em amostras de glândulas mamárias normais distribuídas pelos três padrões em comparação com a porcentagem de animais.....	73
Figura 40 – Expressão gênica do VDR em amostras de glândulas mamárias normais distribuídas pelas pontuações de 1 a 7 classificadas através da expressão proteica (Teste de Friedman, p<0,001, n=41).....	74
Figura 41 – Correlação entre a expressão gênica do VDR em amostras de glândulas mamárias normais distribuídas pelas pontuações de 1 a 7 classificadas através da expressão proteica (Correlação de Pearson, p=0,239, r=0,188, n=41).....	74

Figura 42 – Expressão gênica do VDR em amostras de glândulas mamárias normais distribuídas pelos padrões de I a III classificados através da expressão proteica (Teste de Friedman, $p=0,105$, $n=38$).....	75
Figura 43 – Porcentagem de animais de acordo com a expressão proteica do VDR em amostras de glândulas mamárias tumorais distribuídas pela classificação em pontuações de 1 a 7 (Teste Chi-quadrado, $p=0,038$, $n=60$).....	75
Figura 44 – Gráfico demonstrando a expressão proteica do VDR em amostras tumorais distribuídas pelos três padrões em comparação com a porcentagem de animais.....	76
Figura 45 – Expressão gênica do VDR em amostras de tumor de mama distribuídas pelas pontuações de 1 a 7 classificadas através da expressão proteica (Teste de Friedman, $p<0,001$, $n=56$).....	77
Figura 46 – Correlação entre a expressão gênica do VDR em amostras de tumores de mama distribuídas pelas pontuações de 1 a 7 classificadas através da expressão proteica (Correlação de Pearson, $p=0,561$, $r=0,079$, $n=56$).....	77
Figura 47 – Expressão gênica do VDR em amostras de glândulas mamárias tumorais distribuídas pelos padrões de I a III classificados através da expressão proteica (Teste de Friedman, $p=0,180$, $n=45$).....	78
Figura 48 – Comparação entre a expressão proteica do VDR classificada nos padrões I, II e III em relação aos tipos histológicos dos tumores de mama (Teste Chi-quadrado de Pearson, $p=0,012$, $n=49$).....	79
Figura 49 – Comparação entre a expressão proteica do VDR classificada nos padrões I, II e III em relação aos tumores mamários benignos e os carcinomas (Teste Chi-quadrado de Pearson, $p=0,261$, $n=48$).....	80
Figura 50 – Expressão gênica de VDR em amostras de glândulas mamárias normais e tumorais (Teste de Friedman, $p=0,647$, $n=43$).....	81
Figura 51 – Expressão proteica de VDR em amostras de glândulas mamárias normais e tumorais distribuídas pela classificação em pontuações de 1 a 7 em comparação com a porcentagem de animais ($p<0,001$, Teste de Friedmann, $n=43$).....	82
Figura 52 – Expressão proteica do VDR em amostras de glândulas mamárias normais e tumorais distribuídas pelos padrões I (marcação mista), II (marcação predominante em células mioepiteliais) e III (marcação predominante em células epiteliais) em comparação com a porcentagem de animais (Teste de Friedman, $p<0,001$, $n=34$).....	83
Figura 53 – Fatias de tecidos de glândulas mamárias normais (cadela 4) após cultura primária e tratamento com 0,228nM de calcitriol (A) , 100nM de calcitriol (B) e o veículo etanol (C) por 48 horas.....	84

Figura 54 – Fatias de tecidos de tumores mamários (cadela 4) após cultura primária e tratamento com 2nM de calcitriol (A), 100nM de calcitriol (B) e o veículo etanol (C) por 48 horas.....	85
Figura 55 – Fatias de tecidos de glândulas mamárias normais (cadela 36) após cultura primária e tratamento com 0,228nM de calcitriol (A), 100nM de calcitriol (B) e o veículo etanol (C) por 24 horas.....	86
Figura 56 – Fatias de tecidos de tumores mamários (cadela 35) após cultura primária e tratamento com 2nM de calcitriol (A), 100nM de calcitriol (B) e o veículo etanol (C) por 24 horas.....	87
Figura 57 – Concentração de Vitamina D ₃ tecidual.....	88
Figura 58 – Concentração de Vitamina D ₂ tecidual.....	90
Figura 59 – Comparação da expressão gênica relativa do <i>CYP24A1</i> segundo os tratamentos em amostras de glândulas mamárias normais (Teste Friedman, $p<0,001$, $n=40$).....	92
Figura 60 – Comparação da expressão gênica relativa do <i>CYP27B1</i> segundo os tratamentos, em amostras de glândulas mamárias normais (Teste de Friedman, $p=0,592$, $n=40$).....	94
Figura 61 – Comparação da expressão gênica relativa de <i>CYP24A1</i> segundo os tratamentos, em amostras de glândulas mamárias tumorais (Teste Friedman, $p<0,001$, $n=45$).....	94
Figura 62 – Comparação da expressão gênica relativa de <i>CYP27B1</i> segundo os tratamentos, em amostras de glândulas mamárias tumorais (Teste de Friedman, $p=0,165$, $n=45$).....	95
Figura 63 – Expressão gênica de <i>CYP24A1</i> das amostras normais e amostras tumorais entre todos os tratamentos em cultura (Teste de Friedman, $p<0,001$, $n=34$).....	96
Figura 64 – Gráfico comparando a expressão gênica de <i>CYP27B1</i> das amostras normais e tumorais considerando todos os tratamentos em cultura (Teste de Friedman, $p=0,310$, $n=34$).....	97
Figura 65 – Comparação da expressão gênica relativa do <i>CDKN1A</i> (p21) segundo os tratamentos, em amostras de glândulas mamárias normais (Teste de Friedman, $p=0,535$, $n=40$).....	98
Figura 66 – Comparação da expressão gênica relativa do <i>CDKN1B</i> (p27) segundo os tratamentos, em amostras de glândulas mamárias normais (Teste de Friedman, $p=0,187$, $n=40$).....	99
Figura 67 – Comparação da expressão gênica relativa do <i>CD14</i> segundo os tratamentos, em amostras de glândulas mamárias normais (Teste de Friedman, $p=0,273$, $n=40$).....	99

Figura 68 – Comparação da expressão gênica relativa do <i>CDKN1A</i> (p21) segundo os tratamentos, em amostras tumorais (Teste de Friedman, $p=0,853$, $n=44$).....	100
Figura 69 – Comparação da expressão gênica relativa do <i>CDKN1B</i> (p27) segundo os tratamentos, em amostras tumorais (Teste de Friedman, $p=0,239$, $n=44$).....	101
Figura 70 – Comparação da expressão gênica relativa do <i>CD14</i> segundo os tratamentos, em amostras tumorais (Teste de Friedman, $p=0,218$, $n=44$).....	101
Figura 71 – Comparação da expressão proteica de <i>CDKN1A</i> (p21) realizada através da reação de imunoistoquímica em amostras de glândulas mamárias normais e tumorais (Teste de Friedman, $p=0,001$, $n=34$).....	102
Figura 72 – Comparação da expressão proteica de <i>CDKN1B</i> (p27) realizada através da reação de imunoistoquímica em amostras de glândulas mamárias normais e tumorais (Teste de Friedman, $p=0,011$, $n=34$).....	103
Figura 73 – Comparação da expressão proteica de <i>CD14</i> realizada através da reação de imunoistoquímica em amostras de glândulas mamárias normais e tumorais (Teste de Friedman, $p=0,584$, $n=34$).....	104
Figura 74 – Expressão proteica de Ki-67 em amostras normais submetidas à cultura de tecidos (cadela 65).....	104
Figura 75 – Comparação da expressão proteica de Ki-67 representada em porcentagem (células positivas em 1000 células tumorais) realizada através da reação de imunoistoquímica em amostras de glândulas mamárias normais (Teste de Friedman, $p=0,311$, $n=42$).....	106
Figura 76 – Expressão proteica de Ki-67 em amostras tumorais submetidas à cultura de tecidos (cadela 68).....	107
Figura 77 – Comparação da expressão proteica de Ki-67 representada em porcentagem (células positivas em 1000 células tumorais) realizada através da reação de imunoistoquímica em amostras de tumores mamários (Teste de Friedman, $p=0,002$, $n=47$).....	109
Figura 78 – Comparação da expressão proteica de Ki-67 representada em porcentagem (células positivas em 1000 células tumorais) realizada através da reação de imunoistoquímica em amostras de glândulas mamárias normais e tumorais (Teste de Friedman, $p=0,018$, $n=35$).....	110
Figura 79 – Expressão proteica de CASP3 em amostras normais da Cadela 33 submetidas à cultura de tecidos.....	112
Figura 80 – Expressão proteica de CASP3 (representada pela pontuação) realizada através da reação de imunoistoquímica em amostras de glândulas mamárias normais (Teste de Friedman, $p=0,247$, $n=41$).....	114
Figura 81 – Expressão proteica de CASP3 em amostras tumorais da cadela 29 submetidas à cultura de tecidos.....	115

Figura 82 – Expressão proteica de CASP3 (representada pela pontuação) realizada através da reação de imunoistoquímica em amostras de glândulas mamárias tumorais (Teste de Friedman, $p=0,310$, $n=60$).....	117
Figura 83 – Comparação da expressão proteica de CASP3 realizada através da reação de imunoistoquímica representada pela pontuação em amostras de glândulas mamárias normais e tumorais (Teste de Friedman, $p=0,599$, $n=41$).....	118

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Estadiamento clínico dos tumores mamários em cadelas.....	15
Tabela 2 – Classificação da concentração sérica de 25(OH)D ₃ nos animais portadores de tumor de mama em relação ao estadio clínico.....	64

Lista de Quadros

Quadro 1 – Classificação dos animais quanto à raça, porte e peso.....	15
Quadro 2 – Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) desenhados e confeccionados para o estudo.....	24
Quadro 3 – Descrição dos anticorpos utilizados no estudo.....	26
Quadro 4 - Pontuação atribuída ao percentual de células marcadas por campo e atribuída à intensidade de coloração das células marcadas por campo, em mamas normais e tumorais de cadelas.....	29
Quadro 5 – Classificação da expressão de HER-2 pelo método HercepTest (Dako).	29
Quadro 6 – Classificação dos tumores mamários em subtipos moleculares considerando a positividade de RE e HER-2 (adaptado de Kim <i>et al.</i> , 2013 e Im <i>et al.</i> , 2013).....	30
Quadro 7 - Análise das amostras emblocadas em parafina e coradas pela técnica de Hematoxilina-Eosina.....	41
Quadro 8 – Análise dos dados pelo teste Kruskal Wallis da expressão gênica realizada por RT-qPCR de <i>RP</i> , <i>RE</i> e <i>HER-2</i> e da expressão proteica realizada por imunohistoquímica de RE e HER-2 comparando entre tumores benignos e carcinomas.....	46
Quadro 9 – Classificação dos tumores de mama quanto aos subtipos moleculares, de acordo com a positividade de RE e HER-2 (n=52).....	52
Quadro 10 – Classificação dos animais em relação à idade nos animais do grupo controle e nas cadelas com tumor de mama.....	56
Quadro 11 – Comparação do número de animais nos grupos controle fêmea, controle macho e tumor em relação ao porte.....	57
Quadro 12 – Classificação da concentração sérica de 25(OH)D ₃ nos animais portadores de tumor de mama em relação ao tipo histológico.....	70
Quadro 13 – Frequência da expressão proteica do VDR classificada nos padrões I, II e III em relação aos tipos histológicos dos tumores de mama (n=49).....	80
Quadro 14 – Frequência da expressão proteica do VDR classificada nos padrões I, II e III em relação tumores mamários benignos e os carcinomas (n=48).....	81
Quadro 15 – Determinação da concentração de vitamina D ₃ tecidual nas cadelas 9, 10 e 28.....	91
Quadro 16 – Determinação da concentração de vitamina D ₂ tecidual nas cadelas 9 e 10.....	92

Quadro 17 – Classificação das amostras normais quanto à resposta ao tratamento de 0,228nM de VD na expressão proteica de Ki-67 em relação ao padrão de marcação de VDR (Teste Chi-quadrado de Pearson, $p=0,329$, $n=39$).....	108
Quadro 18 – Classificação das amostras normais quanto à resposta ao tratamento de 100nM de VD na expressão proteica de Ki-67 em relação ao padrão de marcação de VDR (Teste Chi-quadrado de Pearson, $p=0,715$, $n=38$).....	108
Quadro 19 – Classificação das amostras tumorais quanto à resposta ao tratamento de 2nM de VD na expressão proteica de Ki-67 em relação ao padrão de marcação de VDR (Teste Chi-quadrado de Pearson, $p=0,886$, $n=41$).....	111
Quadro 20 – Classificação das amostras tumorais quanto à resposta ao tratamento de 100nM de VD na expressão proteica de Ki-67 em relação ao padrão de marcação de VDR (Teste Chi-quadrado de Pearson, $p=0,974$, $n=41$).....	111
Quadro 21 – Classificação das amostras normais quanto à resposta ao tratamento de 0,228nM de VD na expressão proteica de CASP3 em relação ao padrão de marcação de VDR (Teste Chi-quadrado de Pearson, $p=0,067$, $n=38$).....	116
Quadro 22 – Classificação das amostras normais quanto à resposta ao tratamento de 100nM de VD na expressão proteica de CASP3 em relação ao padrão de marcação de VDR (Teste Chi-quadrado de Pearson, $p=0,008$, $n=38$).....	116
Quadro 23 – Classificação das amostras tumorais quanto à resposta ao tratamento de 2nM de VD na expressão proteica de CASP3 em relação ao padrão de marcação de VDR (Teste Chi-quadrado de Pearson, $p=0,404$, $n=49$).....	119
Quadro 24 – Classificação das amostras tumorais quanto à resposta ao tratamento de 100nM de VD na expressão proteica de CASP3 em relação ao padrão de marcação de VDR (Teste Chi-quadrado de Pearson, $p=0,997$, $n=49$).....	119

Resumo

Fernandes SC. *Via da vitamina D em tumores de mama de cadelas*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

A vitamina D (VD) pode estar envolvida no controle da proliferação, diferenciação e apoptose em linhagens mamárias. Existem evidências de que mulheres com câncer de mama apresentam menor concentração sérica de $25(\text{OH})\text{D}_3$ ou de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ em relação às mulheres sem câncer. Por outro lado, pouco se sabe se a concentração sérica de VD pode influenciar o desenvolvimento de câncer de mama em cadelas e se o hormônio pode ter efeito quimiopreventivo, inibindo o aparecimento de tumores ou mesmo efeito terapêutico, reduzindo a proliferação de células malignas. Logo, nossos objetivos foram comparar a concentração sérica de $25(\text{OH})\text{D}_3$ em animais com e sem tumor mamário e analisar as ações de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ em glândulas mamárias normais e tumorais de cadelas, utilizando como modelo a cultura de tecidos. Inicialmente foram incluídas 39 cadelas portadoras de tumor de mama e 64 cães sem tumor (controle), sendo que 50 eram fêmeas e 14 eram machos. Observamos que os animais do grupo tumoral possuíam idade mais avançada (mediana de 108 meses) em relação ao grupo controle (mediana de 36 meses para os machos e 24 meses para as fêmeas). No grupo controle, a concentração sérica foi maior nos machos ($32,5 \pm 19,3$ ng/mL) do que nas fêmeas ($22,8 \pm 9,6$ ng/mL), mas não houve diferença em relação ao grupo tumor ($26,62 \pm 14,25$ ng/mL). Em relação à dieta, a concentração sérica de $25(\text{OH})\text{D}_3$ foi maior nas fêmeas do grupo controle que se alimentavam de ração em comparação às que se alimentavam de comida caseira e ração. Entretanto, não houve diferença em relação à exposição ao sol e características da pelagem em todos os animais. No grupo tumoral, houve correlação inversa da concentração sérica de $25(\text{OH})\text{D}_3$ em relação à idade, mas não houve diferença quanto ao tipo histológico ou estadiamento da doença. Foram coletadas 70 amostras de tumor de mama e de tecido mamários normal de cadelas, as quais foram cultivadas em fatias. Dos tecidos tumorais, 50% eram positivos para receptor de estrógeno (acima de 10% de células marcadas) e 44% eram positivos para HER-2 (método HercepTest). Detectou-se expressão gênica e proteica do receptor da vitamina D (VDR) em tecido mamário normal e tumoral, sendo identificado três padrões na imunoistoquímica: I – células epiteliais e mioepiteliais (mais frequentemente encontrada em tecido normal), II – marcação predominante em células mioepiteliais (mais comum em tecido tumoral e III – marcação predominante em células epiteliais. As amostras foram tratadas com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nas concentrações 0,228 nM, 2 nM e 100 nM (concentração fisiológica, farmacológica que não induz hipercalcemia e farmacológica que induz hipercalcemia, respectivamente). O conteúdo de VD tecidual avaliado por cromatografia líquida foi crescente de acordo com as concentrações de VD utilizadas, indicando penetração do hormônio nas fatias. Observou-se indução da expressão de *CYP24A1*, que variou de 27 a 158 vezes dependendo da

concentração utilizada, indicando ativação genômica da via da VD e que o tecido permanece metabolicamente ativo em cultura. Entretanto, não houve diferença da expressão gênica de outros genes envolvidos com o metabolismo da VD (*CYP27B1*), genes envolvidos no controle da proliferação (*CDKN1A* e *CDKN1B*) e genes envolvidos com a imunidade (*CD14*). O tratamento com calcitriol nas diferentes concentrações não induziu a apoptose (expressão proteica de caspase-3 clivada) e não alterou a proliferação nos tecidos normais (expressão proteica de Ki-67), mas diminuiu a proliferação nos tecidos tumorais. Não foi observada correlação entre a indução da apoptose e redução da proliferação com os padrões de expressão proteica de VDR. Concluindo, não observamos diferença na concentração sérica de 25(OH)D₃ entre cadelas com tumor de mama e animais controle. Detectamos que o calcitriol em concentração fisiológica ativa a via genômica de VD em mama normal e tumoral e reduz o índice de proliferação (expressão de Ki-67) nos tumores de mama.

Descritores: Vitamina D, Neoplasias mamárias animais, Técnicas de cultura de tecidos, Receptores de vitamina D, Calcitriol, Expressão gênica, Cães, Imunoistoquímica.

Summary

Fernandes SC. *Vitamin D pathway in canine mammary tumors.* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2013.

Vitamin D (VD) may be involved in the control of proliferation, differentiation and apoptosis of mammary cell lines exposed to high concentrations of the hormone. There is some evidence that women with breast cancer present lower serum level of 25(OH)D₃ or 1,25(OH)₂D₃ compared to women without cancer. Moreover, little is known if serum concentration of VD can influence the development of mammary tumors in dogs and if the hormone may have chemopreventive effect by inhibiting the appearance of tumors or therapeutic effect, reducing the proliferation of malignant cells. Therefore, our goals were to compare the serum 25(OH)D₃ level in animals with and without mammary tumor and to analyze 1,25(OH)₂D₃ effects in normal and tumoral canine mammary glands, using as a model the tissue culture. At first, 39 bitches with mammary tumor and 64 dogs without tumor (control), of which 50 were females and 14 were males were included. Animals in tumor group were older (median 108 months) compared to control group (median 36 months for males and 24 months for females). In control group, serum concentration was higher in males (32.5 ± 19.3 ng/mL) than in females (22.8 ± 9.6 ng/mL), but there was no difference when compared to tumor group (26.62 ± 14.25 ng/mL). Regarding diet, serum 25(OH)D₃ level was higher in control bitches fed commercial pet food compared to those fed homemade and commercial pet food combined. However, there was no difference of serum 25(OH)D₃ concentration, sun exposure and coat features. In tumor group, there was an inverse correlation between serum 25(OH)D₃ and age, but there was no difference in 25(OH)D₃ concentration among bitches with different histological type or clinical stage of the disease. Seventy bitches diagnosed with mammary tumors had tumor and mammary samples collected, sliced and cultured. In tumor tissues, 50% were positive for estrogen receptor (over 10% of cells stained), and 44% were positive for HER-2 (HercepTest method). Vitamin D receptor (VDR) protein and genic expression was detected in normal and tumoral samples. Three patterns of VDR were detected by immunohistochemistry: I – localized in epithelial and myoepithelial cells (more often in normal tissues), II - predominantly in myoepithelial cells (most common in tumor tissues) and III - predominantly in epithelial cells. Normal anmammary slices were treated with 1,25(OH)₂D₃ 0.228 and 100nM concentrations (concentration physiological and pharmacological, respectively) and mammary tumor slices were treated with 1,25(OH)₂D₃ 2 nM concentrations (drug concentration which does not induce hypercalcemia) and 100 nM, for 24 hours. VD tissue content measured by liquid chromatography was higher in samples exposed to high VD concentration, indicating penetration of the hormone in slices. VD treatment induced *CYP24A1* expression, 27 to 158 fold depending on the concentration used, and indicating activation of the VD genomic pathway. This result also suggest that the tissue remains metabolically active in culture. However, no difference in gene

expression of other target genes such as *CYP27B1*, genes involved in proliferation as *CDKN1A* and *CDKN1B* and genes involved in immunity, such as *CD14*. Calcitriol treatment at different concentrations did not induce apoptosis (protein expression of cleaved caspase-3) and did not alter proliferation in normal tissues (expression of protein Ki-67), but decreased proliferation in tumor tissues. No correlation was observed between the induction of apoptosis and reduction of proliferation with the protein expression patterns of VDR. In conclusion, no difference in serum 25(OH)D₃ between bitches with mammary tumor and control animals was observed. In normal and tumoral mammary samples calcitriol physiologic concentration activated VD genomic pathway and in tumor samples calcitriol reduced the proliferation index (Ki-67).

Descriptors: Vitamin D, Mammary neoplasmas animal, Tissue culture techniques, Vitamin D receptors, Calcitriol, Gene expression, Dogs, Immunohistochemistry

1. INTRODUÇÃO

Em cadelas, as neoplasias mamárias são os tumores mais comuns (Benjamin *et al.*, 1999; Misdorp, 2002; De Nardi *et al.*, 2002), representando uma prevalência de 0,2% (Klopffleisch *et al.*, 2011). Na Suécia, a incidência é de 111 casos de tumores de mama a cada 10.000 animais (Egenvall *et al.*, 2005) e no Reino Unido, é de 205 a cada 100.000 cadelas (Dobson *et al.*, 2002). Em nosso país, as neoplasias mamárias malignas são as mais frequentemente diagnosticadas, representando 68,4% dos tumores de mama (De Nardi *et al.*, 2002).

A alta incidência dos tumores mamários na espécie canina é resultante, em parte, do estímulo de hormônios sexuais sobre a glândula mamária. Essa afirmação pode ser observada pelas diferenças significativas da incidência dos tumores de mama entre cadelas castradas e não castradas (Moulton, 1990; Peleteiro, 1994). O risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias em cadelas submetidas à ovariossalpingohisterectomia antes do primeiro cio é de 0,5%; naquelas castradas após o primeiro cio, mas antes do segundo cio, é de 8%; e quando esse procedimento é realizado após o segundo cio, é de 26% (Schneider *et al.*, 1969). A castração realizada tardiamente não reduz o risco de tumores malignos mamários, embora o risco de tumores benignos pareça ser reduzido após ovariectomia, mesmo em idades mais avançadas (Misdorp, 1991).

Outra ocorrência que sustenta a dependência hormonal do tumor de mama é a identificação de receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP) nessas lesões em 40 a 60% dos casos (MacEwen *et al.* 1982; Sartin *et al.*, 1992; Millanta *et al.*, 2005). Tanto o tecido mamário normal como as lesões benignas expressam RE (100% em tecidos normais, hiperplasias e displasias e 95,5% em tumores benignos), enquanto apenas 62% dos carcinomas expressam os receptores, e nos sítios metastáticos, a ocorrência é rara

(MacEwen *et al.*, 1982; De Las Mulas *et al.*, 2005; Millanta *et al.*, 2005). Relata-se, entretanto, que a expressão de RP foi menor tanto nas lesões benignas quanto nas malignas, quando comparadas ao tecido normal (100% de expressão para tecido normal, 86% para hiperplasia e displasia, 50% para tumores benignos e 42% para carcinomas). Todos os carcinomas *in situ* foram positivos para RE e RP (Millanta *et al.*, 2005).

Existe um conjunto de dados significativos que aponta para a possibilidade dos hormônios esteróides desempenharem papel importante na etiologia dos tumores mamários. É possível que ajam como fatores promotores, estimulando a multiplicação celular, mas não como fatores iniciadores, tendo por si só a capacidade de desencadear o desenvolvimento de uma neoplasia. No entanto, ao atuarem em conjunto com outros fatores e em fases diferenciadas da formação do tumor, é possível que desempenhem papel determinante (Peleteiro, 1994).

A vitamina D (VD), outro hormônio esteroídico, também pode estar envolvido com a proliferação celular. A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (calcitriol) é a forma biologicamente ativa da VD e pode ser obtida através de alimentos como peixe e derivados do leite enriquecidos com VD. Tanto a vitamina D_3 (colecalfiferol), de origem animal, quanto a vitamina D_2 (ergocalciferol), sintetizada pelas plantas, podem ser absorvidas a partir da dieta, no duodeno e jejuno. A absorção da VD no intestino requer a presença de sais biliares, por ser lipossolúvel (Cunningham *et al.*, 1986). No entanto, ela é produzida predominantemente de maneira endógena na maioria dos mamíferos, a partir de um precursor existente na pele, o 7-deidrocolesterol, que sob ação dos raios ultravioleta da luz solar transforma-se em colecalfiferol ou pré-vitamina D_3 . Os cães possuem uma menor habilidade de síntese de colecalfiferol na pele quando comparada a muitos outros mamíferos (Gross *et al.*, 2000) e por esse motivo os cães possuem uma maior necessidade de suplementação de VD na dieta do que muitos outros mamíferos, incluindo o homem (How *et al.*, 1994; How *et al.*, 1995; Hazewinkel *et al.*, 2002).

Após a ingestão ou a síntese através da pele, a VD, ao atingir o fígado, sofre uma hidroxilação para formar o 25-hidroxicolecalciferol ou 25(OH)D₃, que é a principal forma circulante da VD no organismo. Ocorre uma segunda hidroxilação nos rins, permitindo a transformação da 25(OH)D₃ em 1,25(OH)₂D₃, pela ação da 1 α hidroxilase (Bouillon *et al.*, 1995).

A VD regula o desenvolvimento e metabolismo ósseo, participando da homeostase do cálcio agindo em ossos, rins, trato digestório, paratireóide, sendo responsável pela absorção de cálcio no intestino e reabsorção óssea (Holick, 1981). A 1,25(OH)₂D₃ aumenta a concentração do cálcio sérico aumentando a absorção intestinal de cálcio e fósforo, mobilizando o cálcio do osso e aumentando a reabsorção no rim (Gross *et al.*, 2000). Em um relato de caso, seis filhotes da raça greyhound diagnosticados com raquitismo possuíam baixa concentração sérica de 25(OH)D₃ (< 3,2 – 9,6 ng/mL) e estavam se alimentando com uma dieta com baixo conteúdo de VD (Malik *et al.*, 1997). Por outro lado, um relato de caso descreveu a presença de hipercalcemia em dois cães devido a uma dieta excessivamente rica em VD que determinou concentração sérica de 25(OH)D₃ de 160 e 175 ng/mL e a de 1,25(OH)₂D₃ de 82 e 136 pg/mL, respectivamente. A suplementação de VD em rações comerciais tem sido pouco estudada em animais de companhia e poucos trabalhos independentes avaliaram a sua quantidade em rações para cães (Mellanby *et al.*, 2005). A Associação de Controle Alimentar Oficial Americana recomenda que as dietas caninas devem conter 500 UI de VD por kg de ração (Gross *et al.*, 2000). Isso forneceria 10 UI de VD por kg de peso corpóreo por dia, semelhante ao recomendado para reposição em seres humanos idosos, que não sintetizam mais a VD pela pele com a mesma facilidade do que quando jovem (400-800 UI/dia para uma pessoa de 60kg). Entretanto, segundo Tran e colaboradores (2007), uma dieta com 650 – 800 UI de VD por kg de ração diminuiu a concentração sérica de VD em todos os grupos onde os 64 cães foram separados.

A concentração sérica de VD diminui com a idade, tornando necessária a suplementação na maioria das mulheres idosas. Além disso, a densidade

mineral óssea decresce após a menopausa, e a suplementação da VD pode aumentar o nível sérico do hormônio, e assim obter benefício na densidade óssea (Dawson-Hughes *et al.*, 1997; Ooms *et al.*, 1995; Chapuy *et al.*, 1992). A concentração sérica normal para humanos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ é 14 - 55 pg/mL e a de $25(\text{OH})\text{D}_3$ é de 8 - 40 ng/mL (Wilson & Foster, 1992). Gerber e colaboradores (2004) relataram que a concentração sérica normal para cães de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ é 23-92 pg/mL e a de $25(\text{OH})\text{D}_3$ é de 19-140 ng/mL, entretanto a dieta dos animais não foi monitorada.

Dados epidemiológicos sugerem que menor nível de exposição solar relacionado à deficiência mesmo leve da forma precursora da VD esteja associado a um maior risco de desenvolver alguns tipos de cânceres bastante comuns na atualidade, como mama, cólon (Garland *et al.*, 1999) e próstata (Hanchette & Schwartz *et al.*, 1992). Estudos indicam que a alta exposição à luz ultravioleta está associada a um menor risco de incidência de linfomas não Hodgkin (Smedby *et al.*, 2005) e que pacientes com diagnóstico de melanoma e maior exposição solar apresentam melhor prognóstico em relação àqueles expostos a menor insolação (Berwick *et al.*, 2005). Um recente estudo epidemiológico não correlacionou as variações sazonais com a incidência ou mortalidade em câncer, mas correlacionaram tumores diagnosticados no verão e outono como apresentando um melhor prognóstico e fizeram essa conexão à exposição solar e consequente à VD (Moan *et al.*, 2010). A suplementação de VD via dieta, ou consequentemente a exposição solar relacionada à gênese da VD, pode ser um fator protetor contra o câncer (Ainsleigh, 1993).

Existem evidências que pacientes com câncer de mama apresentam nível sérico de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ menor que o de mulheres que não possuem câncer (Janowsky *et al.*, 1999; Lyra *et al.*, 2006). Outros autores também encontraram menor concentração sérica de $25(\text{OH})\text{D}_3$ em pacientes com câncer de mama (Lowe *et al.*, 2005; Bertone-Johnson *et al.*, 2005). Uma meta-análise desenvolvida por Gandini e colaboradores (2011) uniu os dados de 35 estudos relacionando concentração sérica de $25(\text{OH})\text{D}_3$ e câncer de próstata,

mama e colorretal. Não houve correlação entre a concentração sérica de 25(OH)D₃ e câncer de mama e próstata, houve apenas no câncer colorretal. Os resultados sugerem que houve diminuição do risco de câncer de mama associada com maior concentração sérica de 25(OH)D₃, mas não foi significativo (Gandini *et al.*, 2011). Estudo de Rassnick et colaboradores (2008) em cães acometidos por tumores revelaram que a concentração sérica de 1,25(OH)₂D₃ varia entre 5-95 pg/mL (mediana de 60 pg/mL).

Em ratos expostos a carcinógeno químico, a administração de análogo da VD causou redução na incidência e maior latência no aparecimento do câncer de mama. Esta ação quimiopreventiva parece mais importante durante a fase de promoção do tumor (Murillo & Mehta, 2005). Entretanto, a associação da VD e câncer em seres humanos ainda não está clara e estudo clínico prospectivo mostrou que a reposição de VD não reduziu a incidência de câncer colorretal (Wactawski-Wende *et al.*, 2006). Entre os fatores que podem ter levado à negatividade dos resultados estão o tempo de seguimento curto e a dose de suplementação, que pode ter sido baixa.

Por outro lado, estudos clínicos demonstram algum benefício quando análogos da VD foram utilizados para o tratamento do câncer. Dezesesseis pacientes com câncer de mama localmente avançado ou com metástase cutânea foram tratadas com análogo tópico e foi observado redução de 50% da lesão em três delas (Bower *et al.*, 1991). Além disso, em pacientes com câncer de próstata hormônio independente tratados com docetaxel associado ao análogo da VD ou placebo, observou-se maior sobrevida global no grupo que recebeu o análogo (Beer *et al.*, 2007).

Na espécie canina, foi relatado o benefício clínico da VD em 10 cães com mastocitoma. Foi avaliado o efeito de DN101, uma formulação oral concentrada de calcitriol, desenvolvida especificamente para terapia contra câncer (Malone *et al.*, 2010). O tratamento induziu remissão em quatro cães (uma remissão completa e três parciais), mas a maioria necessitou descontinuar o tratamento devido a sua toxicidade (quatro cães apresentaram hipercalcemia e cinco apresentaram azotemia reversível). Um estudo

posterior do mesmo grupo avaliou a biodisponibilidade do calcitriol pela via oral e pela via intravenosa, e concluíram que, como nos seres humanos, a variabilidade dos parâmetros farmacocinéticos pela via oral entre os indivíduos é grande, mas a concentração sérica necessária para atividade antitumoral em modelo murino foi atingida (Rassnick *et al.*, 2011). A concentração sérica média de calcitriol após aplicação pela via intravenosa foi de 20ng/mL, com uma meia-vida de 6 horas, e após administração pela via oral foi de 12ng/mL e após 21 dias de 6 ng/mL, com uma meia vida de 8 e 11 horas respectivamente. Os principais efeitos de toxicidade encontrados após administração pela via intravenosa incluem reações de hipersensibilidade e hipercalcemia e enquanto a via oral apresentou apenas hipercalcemia que se resolveu após 72 horas.

A VD exerce seus efeitos via mecanismo genômico pelo receptor da vitamina D (VDR). O VDR é uma fosfoproteína membro da super família de receptores nucleares (Van Den Bemd *et al.*, 2000). O VDR forma um heterodímero com o receptor de ácido retinóico (RXR) agindo como um fator transcricional. Para isso, o VDR liga-se a elementos de resposta à VD, isto é, duas sequências de seis nucleotídeos repetidas, mas separadas por três nucleotídeos aleatórios, sequências estas contidas em regiões promotoras de genes responsivos a VD, entre eles, osteocalcina (Kerner *et al.*, 1989), p21^{waf1} (Liu *et al.*, 1996), TGFβ2 (Wu *et al.*, 1999), 24 hidroxilase (Ohyama *et al.*, 1994). Resultados de nosso grupo indicam que a VD em concentração que não induz hipercalcemia pode ter efeitos transcricionais no tumor da mama (Milani *et al.*, 2010).

Como a ação da 1,25(OH)₂D₃ é mediada por seu receptor VDR, é interessante analisar esta expressão em tecidos normal e tumoral para elucidar potenciais alvos deste hormônio (Narvaez *et al.*, 1996). Em estudo clínico em mulheres com câncer de mama localmente avançada ou metastática que expressavam VDR, foi demonstrado que a administração de análogo de VD pode causar redução da lesão (Bower *et al.*, 1991; Van Den Bemd *et al.*, 2000). Em um recente estudo com cães, comparou-se a

expressão do VDR em mastócitos reativos e neoplásicos e a frequência da expressão de VDR foi significativamente maior no mastocitoma. Os autores concluíram que, embora não seja apropriado utilizar o VDR como um critério para graduação do tumor ou como um fator prognóstico, a presença do receptor sugere um novo alvo para intervenção terapêutica com VD (Russell *et al.*, 2010).

A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ é um regulador de crescimento negativo para células de câncer de mama *in vivo* e *in vitro*. A modulação da via regulatória dessas células pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ parece suprimir a tumorigênese nas células normais mamárias, e pode ser útil para inibir o crescimento de um câncer de mama já existente (Narvaez *et al.*, 2001). Nas células da linhagem de câncer de mama humano MCF-7, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induziu molecularmente sinais de apoptose (Simboli-Campbell *et al.*, 1996).

A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ exerce o seu efeito antiproliferativo inibindo a progressão celular para a fase S através da modulação de moléculas do ciclo celular (Escaleira & Brentani, 1999; Katayama *et al.*, 2003; Verlinden *et al.*, 2000). A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induz a parada do ciclo celular em G1/G0 através do aumento da expressão de inibidores de quinase dependente de ciclina $p21^{\text{waf-1}}$ e $p27^{\text{kip-1}}$ (Campbell & Koeffler, 1997; Hengst & Reed, 1996; Liu *et al.*, 1996), diminuindo a atividade quinase dependente de ciclina 2 (CDK2), e através da hiperfosforilação da proteína retinoblastoma (Kobayashi *et al.*, 1993). Em algumas células, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induz apoptose pela *down-regulation* de genes anti-apoptóticos como Bcl-2 (Elstner *et al.*, 1996; James *et al.*, 1996).

Nos últimos anos, o efeito antitumoral da VD vem sendo também estudado em cães, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Kunakornsawat e colaboradores (2004) demonstraram que células epiteliais e estromais de próstata expressam VDR e que as células epiteliais têm a proliferação inibida quando tratadas com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e $25(\text{OH})\text{D}_3$ em concentração suprafisiológica (elevada), que causa hipercalcemia (100nM). Kaewsakhorn e colaboradores (2005) obtiveram resultados semelhantes, mas com células de carcinoma de células transicionais de bexiga em cães. Tanto o calcitriol

quanto o seu análogo seocalcitol inibiram significativamente o crescimento das células. O calcitriol causou ainda interrupção do ciclo celular em G0/G1 e diminuiu modestamente a expressão de Bcl-2.

Kunakornsawat e colaboradores (2002) analisaram o efeito da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e dois análogos menos calcêmicos (EB1089 e Análogo V) em linhagem de adenocarcinoma canino derivado de glândula apócrina de saco anal transplantados em camundongos. Os três tratamentos diminuíram o tamanho dos tumores, mas não inibiram a reabsorção óssea (provavelmente porque a hipercalcemia maligna é uma síndrome paraneoplásica comum nesse tipo de câncer). Já Rassnick e colaboradores (2008) avaliaram o efeito combinado de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e da cisplatina em tumores mamários, mastocitomas e osteossarcomas de cães, e concluíram que os dois fármacos possuem efeitos antiproliferativos sinérgicos *in vitro* e que a administração endovenosa de altas doses de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ em cães (máxima dose tolerada foi de $3,75\mu\text{g/Kg}$ que associa-se a concentração sérica de 2 nM) pode ser realizada seguramente. Malone e colaboradores (2010) analisaram também o efeito sinérgico do calcitriol (concentrações variando de 0,1 a 25nM) e da quimioterapia (lomustina e vimblastina) ou de inibidores de tirosina quinase (imatinib e toceranib) em linhagem celular de mastocitoma canino, com resultados promissores. As concentrações de calcitriol e lomustina, vimblastina, imatinib ou toceranib necessárias para inibir 50% do crescimento foi de aproximadamente duas a seis vezes menores quando os medicamentos foram utilizadas em combinação, comparado-as quando utilizadas individualmente.

Estudos em linhagens de câncer nem sempre reproduzem fielmente a complexidade de um modelo *in vivo*. Uma das possíveis explicações é que os estudos utilizando linhagens não levam em consideração a contribuição da interação epitélio-mesênquima. Um modelo para estudo da ação hormonal ou de possíveis tratamentos é a cultura de tecidos. Neste caso, preserva-se a arquitetura estrutural do tecido propiciando condição similar, mais próxima àquela encontrada *in vivo*. Nosso grupo utilizou essa metodologia para avaliar

o tratamento quimioterápico em carcinoma mamário: Sobral e colaboradores (2008) analisaram alvos de resposta para o tratamento com doxorrubicina em fatias de tumores de mama de 38 cadelas, e concluíram que este é um modelo válido para o estudo da atividade de quimioterápicos. Barbosa *et al.* (2004) avaliaram o efeito da VD sobre secções de tecido mamário humano tumoral no sistema ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA). Outros estudos também utilizaram esse modelo, Eigeliene e colaboradores (2006) investigaram a ação de estradiol e medroxiprogesterona em proliferação, apoptose e diferenciação. Em outro estudo, Eigeliene e colaboradores (2008) pesquisaram o efeito de estradiol e medroxiprogesterona no ciclo celular, utilizando cultura de tecido mamário humano normal por até 14 dias. Um recente estudo do nosso grupo avaliou fatias de tumor de mama humano tratados com calcitriol e observou-se que a viabilidade do tecido se manteve pois houve preservação da morfologia, 10% das células tumorais mantiveram-se em proliferação, e ocorreu a indução da expressão de *CYP24A1*, demonstrando que as células estavam com o metabolismo ativo e que a cultura de tecidos é um modelo experimental eficaz (Milani *et al.*, 2010).

Os animais de estimação possuem tumores com similaridades às neoplasias que acometem o homem; entretanto, apresentam também peculiaridades que as distinguem (MacEwen, 1990; Mottollesse *et al.*, 1994; Peleteiro, 1994; Klopffleisch *et al.*, 2011). Algumas semelhanças incluem a alta frequência de metástases e progressão da doença nos casos de carcinoma (MacEwen *et al.*, 1982), alterações nas mesmas vias de regulação de câncer humano (Uva *et al.*, 2009) e os subtipos moleculares, basal com pior prognóstico e luminal com melhor prognóstico (Gama *et al.*, 2008). Embora em fêmeas da espécie canina os tumores mamários sejam os mais comuns, a carcinogênese mamária está longe de ser compreendida, e as opções terapêuticas são escassas. É apenas o início para a compreensão dos mecanismos moleculares dos tumores mamários caninos e da sua aplicação clínica (Klopffleisch *et al.*, 2011).

Em suma, existem evidências de que a via da VD está desregulada em mulheres com câncer de mama, como verificado pela menor concentração sérica de $25(\text{OH})\text{D}_3$ ou de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Por outro lado, pouco se sabe se a concentração sérica de VD pode influenciar o desenvolvimento de câncer de mama em cadelas e se o hormônio pode ter efeito quimiopreventivo inibindo o aparecimento de tumores ou efeito terapêutico reduzindo a proliferação de células malignas. Com todos os estudos descritos nessa revisão pode-se observar que há expressão de VDR em vários tipos de tumores caninos e a VD pode ser utilizada como um agente antiproliferativo. Logo, nosso objetivo é analisar alguns aspectos da via da VD em tumores de mama da espécie canina, utilizando como modelo a cultura de tecidos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar os efeitos da VD em cadelas com tumor de mama.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a concentração sérica de 25(OH)D₃ em cães saudáveis e em cadelas com diagnóstico de tumor de mama e correlacionar com aspectos clínicos como pelagem, exposição solar, dieta, raça/porte e idade;
- Caracterizar as amostras de tumor mamário canino através da expressão de receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) e receptor de fator de crescimento epidérmico humano do tipo 2 (HER-2);
- Avaliar a expressão de receptor de vitamina D (VDR) em tumores mamários caninos e tecidos mamários normais;
- Analisar se os tecidos mamários normal e o tumoral após tratamento com VD expressam enzimas que metabolizam esse hormônio, como 24 hidroxilase (citocromo P450, família 24, subfamília A, polipeptídeo 1 - *CYP24A1*) e 1 α hidroxilase (citocromo P450, família 27, subfamília B, polipeptídeo 1 - *CYP27B1*);
- Analisar se o tratamento dos tecidos mamários normal e tumoral com 1,25(OH)₂D₃ induz a expressão de genes-alvo, como p21 (inibidor de quinase dependente de ciclina 1A - *CDKN1A*), p27 (inibidor de quinase dependente de ciclina 1B - *CDKN1B*) e *CD14* (*cluster of differentiation 14 molecule*);

- Verificar se o tratamento com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ em fatias de mamas normais e tumorais possui efeito antiproliferativo (através da expressão de Ki-67) e pró apoptótico (através da expressão de caspase 3 clivada).

3. MÉTODOS

3.1 Seleção dos Animais

Foram coletadas amostras teciduais de 70 cadelas diagnosticadas com tumor de mama (benigno ou maligno). De cada cadela incluída no estudo, foram coletados fragmentos do tumor e de tecido normal de uma glândula mamária adjacente (que não estava acometida por neoplasia mamária).

Essas amostras foram provenientes do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Paulista (FMV-UNIP), com a colaboração da Profa. Lucia Maria Guedes Silveira (n = 66); do Serviço de Obstetrícia do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), em São Paulo - SP, com a colaboração da Profa. Dra. Clair Motos de Oliveira (n = 3) e do Instituto Brasileiro de Diagnósticos e Especialidades Veterinárias (PROVET), com a colaboração da Dra. Renata Afonso Sobral (n = 1). Foram coletadas amostras de sangue de 39 cadelas portadoras de neoplasias mamárias provenientes da FMV-UNIP e de 64 cães saudáveis provenientes de Campanhas de Castração organizadas pela FMV-UNIP. Esse projeto foi aprovado pela comissão de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) com o protocolo de pesquisa nº1108/09 (Anexo A).

Os proprietários foram informados sobre os procedimentos da pesquisa e após o consentimento por escrito, as amostras de material biológico foram colhidas a partir de seus animais (Anexos B e C).

As pacientes com tumor de mama foram avaliadas por meio de um questionário sobre o tempo de exposição diário ao sol, sobre a pelagem (cor e tamanho), quanto ao tipo de alimentação (comida caseira ou ração), a idade e a raça para posterior comparação com concentração sérica de VD (Anexo D).

Em relação à dieta, a quantificação de VD que era ingerida pelos animais foi classificada quanto ao tipo de alimentação. No caso dos animais que se alimentavam apenas de ração, utilizou-se o rótulo das rações para saber a quantidade de VD em UI que havia em cada kg de ração (Anexo E). Nos animais que ingeriam apenas comida caseira, utilizou-se a quantidade de VD estabelecida para cada alimento (Philippi, 2002), por kg (Anexo F). Caso o animal comesse mais de um tipo de alimento caseiro, foi realizada a média entre eles. No caso dos animais que comiam ambos os tipos (ração e comida caseira), foi realizada a média dos dois tipos.

A avaliação clínica dos animais foi realizada mediante exame físico (incluindo palpação dos linfonodos), assim como hemograma, exames bioquímicos (alanina amino transferase – ALT e creatinina) e exame radiográfico torácico para pesquisa de metástase pulmonar. Caso ocorresse alteração clínica (tamanho/forma) nos linfonodos, realizava-se citologia aspirativa por agulha fina ou biópsia seguida por avaliação histopatológica para análise de invasão neoplásica.

Após esses procedimentos, os animais foram submetidos à técnica cirúrgica de acordo com a localização do nódulo mamário para exérese do mesmo (mastectomia regional ou mastectomia radical).

As pacientes foram classificadas quanto à idade, raça e estadiamento clínico segundo o sistema TNM (tumor, linfonodo e metástase) proposto pela Organização Mundial da Saúde (Tabela 1).

Tabela 1 – Estadiamento clínico dos tumores mamários em cadelas.

T – Tumor primário

T₁ – Menor que 3 cm de diâmetro

T₂ – Entre 3 e 5 cm de diâmetro

T₃ – Maior que 5 cm de diâmetro

N – Linfonodos regionais

N₀ – Sem envolvimento neoplásico

N₁ – Com envolvimento neoplásico

M – Metástases distantes

M₀ – Ausência de metástases distantes

M₁ – Presença de metástases distantes

Estádios

I	–	T ₁	N ₀	M ₀
II	–	T ₂	N ₀	M ₀
III	–	T ₃	N ₀	M ₀
IV	–	Qualquer T	N ₁	M ₀
V	–	Qualquer T	Qualquer N	M ₁

Para simplificar as análises, as raças foram classificadas quanto ao porte e peso em três grupos, descrito no Quadro 1.

Quadro 1 – Classificação dos animais quanto à raça, porte e peso.

Grupo	Porte	Raça	Sem raça definida (SRD)
1	Pequeno	Poodle, Yorkshire, Teckel, Lhasa apso, Pinscher	até 10 kg
2	Médio	Boxer, Cocker spaniel, Schnauzer, Akita	> 10 – 25 kg
3	Grande	Husky siberiano, Pitbull, Labrador, Pastor alemão, Dog alemão, Rottweiler, Bulldog	acima de 25 kg

3.2 Coleta e Processamento das Amostras

Fragmentos de tumor e de mama normal de 1cm³ foram fixados em formol tamponado para realização de exame histopatológico (segundo a classificação de Goldschmidt *et al.*, 2011) e para realização do exame de imunoistoquímica.

Outros fragmentos, destinados à cultura, foram acondicionados em meio de cultura DMEM (Meio Dulbecco Modificado - Gibco BRL), acrescido de ampicilina (concentração final 100 µg/ml) (FURP, Guarulhos, Brasil), estreptomicina (concentração final 100 µg/ml) (FURP, Guarulhos, Brasil) e fungizona (concentração final 2,5 µg/ml) a 4°C durante o período de transporte até o Laboratório de Investigação Médica (LIM 24 – Oncologia Experimental) da FMUSP.

As amostras de soro dos cães foram coletadas no momento do procedimento cirúrgico (com o animal sob efeito anestésico) e transportadas a 4°C até o LIM 24 – FMUSP, onde foram congeladas a -20°C. Durante todo o processo, as amostras foram protegidas da luz.

3.3 Radioimunoensaio (RIE)

Para determinação quantitativa de 25(OH)D₃ em soro canino, foi utilizado o método competitivo de RIE da DiaSorin (DiaSorin S.A, Stillwater, MN, EUA).

A partir do soro dos cães, os metabólitos de VD foram extraídos e purificados. Após esse procedimento, a amostra tratada foi analisada usando procedimento de RIE competitivo com anticorpo policlonal, que foi específico para 25(OH)D₃ marcado com ¹²⁵I. A amostra e o anticorpo foram incubados a 20 – 25 °C, e após duas horas para separação das fases, utilizou-se um

segundo anticorpo de precipitação a 20 – 25 °C. Após 20 minutos de incubação foi centrifugado, e a fração ligada foi quantificada em um contador de raios gama. Os valores foram calculados a partir de uma curva padrão de concentrações conhecidas. A concentração final de 25(OH)D₃ em soro foi expressa por ng/mL e foi comparada entre 39 cadelas com tumor de mama, 50 cadelas saudáveis, e 14 cães machos saudáveis.

3.4 Cultura de Tecidos e Tratamento com Vitamina D

Para esse procedimento, foram utilizadas 68 amostras de tecidos mamários normais e tumorais. As amostras foram seccionadas com espessura de 400-600µm utilizando-se lâminas de bisturi. Todo o procedimento foi realizado em fluxo laminar (Veco do Brasil Indústria e Comércio de Equipamentos Ltda, Unicamp, Brasil) após esterilização por luz UV de todo o material utilizado.

As fatias de tecido foram cultivadas em placas de 24 poços com 2cm² de área (Nunc, Dinamarca), sendo uma fatia por poço. Utilizou-se como meio de cultura o RPMI 1640 (Gibco, Nova Iorque, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino, inativado por calor (Gibco, Nova Iorque, EUA), contendo ampicilina (concentração final 100 µg/ml) (FURP, Guarulhos, Brasil) e estreptomicina (concentração final 100 µg/ml) (FURP, Guarulhos, Brasil), com quantidade total de 2 mL de meio por poço.

Os poços a serem tratados receberam 2 µl de calcitriol (Calciochem®, EUA – cat.nº679101) adicionada ao meio, apresentando concentrações finais de VD de 0,228 nM (concentração fisiológica adaptado de Gerber *et al.*, 2004 e Rassnick *et al.*, 2008) e 100 nM (concentração farmacológica hipercalcêmica) nas fatias de mamas normais e nas fatias de mamas tumorais de 2 nM (dose farmacológica que não induz hipercalcemia adaptado de Rassnick *et al.*, 2008) e 100 nM (dose farmacológica hipercalcêmica). Nos

poços designados como controle, as células foram tratadas com 2 µl do veículo etanol. Tanto nos poços tratados com VD quanto nos controles tratados com etanol, foi obdecida a porcentagem de 0,1% de etanol (veículo) sobre o volume total do meio do poço (Shankar *et al.*, 2008).

O período de tratamento inicial foi de 48 horas, durante as quais as placas foram mantidas em uma incubadora de umidade controlada a 37°C em atmosfera constante de 5% de CO₂. Após análise das lâminas coradas com HE, percebeu-se que algumas fatias estavam entrando em necrose. Decidiu-se manter o tecido em cultura por 24 horas, pois estudos de nosso grupo indicam boa preservação do tecido durante esse período de cultura.

Após o término do cultivo, as fatias foram retiradas do meio de cultura e divididas em duas partes. A primeira foi armazenada em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA e a segunda parte foi armazenada em formol tamponado para realização do exame de imunoistoquímica.

Das 68 amostras, quatro foram utilizadas para padronizações (cadelas 1,2,3 e 4) e cinco foram utilizadas para a realização da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (cadelas 3, 8, 9, 10 e 28). O restante das amostras foi utilizado para os ensaios moleculares.

3.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As concentrações de VD nos tecidos tratados em cultura (tantos os que foram tratados apenas com etanol como os que foram tratados com as diferentes concentrações de VD) foram determinadas por CLAE. Para isso, foram separadas cinco amostras selecionadas aleatoriamente. A análise foi realizada na Divisão de Nutrologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP (FMRP-USP), sob a supervisão do Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior.

A metodologia utilizada foi modificada das técnicas descritas por Silveira *et al.* (2001) e Naves *et al.* (2001). A VD foi extraída dos tecidos congelados através do procedimento adaptado de Stahl *et al.* (1993). As amostras foram homogeneizadas em agitador mecânico com 400 µL de etanol por 1 minuto, sendo então agitadas após acréscimo de 300 µL de n-hexano, também por 1 minuto. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (centrífuga Sorvall, modelo Legend Mach 1.6R) a 10000 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi seco em atmosfera de nitrogênio e ressuspendido em 80 µL de metanol.

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo (modelo LC20AT, Shimadzu, Japão) com sistema de bomba de multissolventes, auto injetor (modelo SIL – 20A) e detector de fotodiodo UV-VIS (modelo SPD-20A, ajustado a 265 nm para a detecção da VD), com coluna C18 de fase reversa (CLC-ODS; 5 µm, 6 mm x 15 cm). Alíquotas de 20 µL foram injetadas no cromatógrafo e a VD foi eluída (1,5 mL/minuto) em fase móvel (acetonitrila – diclorometano – metanol, 4:6:90). A VD foi identificada pela comparação de seu tempo de retenção com o do padrão, e quantificado pelas áreas dos picos.

3.6 Extração de RNA Total

Fragmentos de tecidos congelados de 60 cadelas foram submetidos à extração de RNA total e purificação pelo kit comercial RNeasy Mini Kit (cat no 74104, Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante (Anexo G).

A concentração de RNA foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda de 260nm, a pureza do RNA extraído foi verificada pela razão de absorbância a 260nm por 280nm (NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer, NanoDrop Technologies) e as amostras foram congeladas a -70°C (Anexo H).

3.7 Reação de Transcriptase Reversa (RT) para Obtenção de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA (DNA complementar) foi realizada a partir de 10 ng de RNA diluído em água ultra pura para um total de 12 µl e foram adicionados 200 ng de Random Primer (concentração inicial 516ng/µl) (Promega), 1µl de desoxirribunucleotídeos trifosfatados (dNTPs) a 10mM (Gibco) e água ultra pura para completar um total de 14 µl. A mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos para desnaturação das fitas de RNA e posteriormente colocada no gelo por 1 minuto. A esta solução foram acrescentados 4µl de tampão da enzima Super Script III (Invitrogen), 1µl de dietiltreitol (DTT) a 100 mM (Invitrogen) e 1µl da enzima transcriptase reversa SSII-RT Super Script III (5 UI/ µl) (Invitrogen). A reação foi incubada a 55°C por 55 minutos, para a extensão das fitas de cDNA. Posteriormente, o tubo foi aquecido a uma temperatura de 70°C por 15 minutos, para inativação da enzima. Após este procedimento, o cDNA obtido na concentração final de 6 ng/µL foi estocado a -20°C para posterior amplificação da região de interesse.

3.8 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (RTqPCR)

3.8.1 Descrição da Técnica de RTqPCR

Foi utilizado o sistema de detecção por *SYBR Green I*, que se baseia no uso de uma molécula que, quando intercalada à dupla fita de DNA, emite fluorescência para possibilitar a quantificação total de moléculas de DNA produzidas. A cada ciclo da reação, novas moléculas de fitas duplas são formadas, aumentando proporcionalmente o nível de fluorescência emitida. Quanto menor o ciclo em que a fluorescência atinge um limite determinado, maior é a expressão do transcrito analisado. Valores quantitativos são observados durante os ciclos, e é através da fração do número de ciclos na qual a fluorescência emitida atinge um padrão estabelecido (*Ct - Cycle threshold*) que os valores são analisados (Morrison *et al.*, 1998).

Nesse método de detecção, a confirmação da especificidade da amplificação foi realizada por meio da análise da curva de dissociação. Após o término dos ciclos de amplificação da reação, a temperatura variou gradualmente de 95°C à 60°C e posteriormente a 95°C novamente, fazendo com que os fragmentos amplificados que se dissociaram a 95°C, voltassem a se unir a 60°C, emitindo fluorescência. Essa emissão foi captada pelo aparelho e gerou a curva de dissociação. Cada produto amplificado possuiu uma temperatura de fusão específica, o que permitiu a diferenciação entre os produtos resultantes.

As reações foram realizadas em duplicatas no aparelho *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) em placas de 96 poços – *MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode* (Applied Biosystems) cobertas pelo adesivo ótico – *Optical Adhesive Covers* (Applied Biosystems).

Para as análises de diferença de expressão, foram utilizados 1 µL de cDNA a 6 ng/µL. Cada reação foi realizada a partir de 0,25 µL de *primer forward* (10 µM) e 0,25 µL de *primer reverse* (10 µM), 6,25 µL do kit SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal, 0,25 µL de *ROX Reference Dye* (Invitrogen) e 4,5 µL de água ultra pura (Gibco), resultando em volume final de 12,5 µL. As amostras foram submetidas a uma temperatura de desnaturação inicial de 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de amplificação que consistiram em: desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento dos *primers* a 60-65°C por 30 segundos. A especificidade da reação foi confirmada também por eletroforese em gel de agarose a 1,5% considerando o tamanho do amplificado e a presença de bandas inespecíficas. Para isso, a agarose foi dissolvida em TBE 1X (Tris-base 0,08%, ácido bórico 0,55% e EDTA 0,1M, pH 8.0) e 10% v/v de solução de brometo de etídio. As amostras foram preparadas adicionando-se ao volume total da reação (12,5 µL), 1 µL de tampão de DNA (xileno cianol 10X). Também foram utilizados marcadores de peso molecular *DNA ladder* 100 pb e 50 pb (Invitrogen). A voltagem utilizada foi de 80 – 100 volts.

3.8.2 Escolha dos genes e amostras utilizadas

Foram escolhidos três genes para classificação dos tumores mamários: receptor de estrógeno (*RE*), receptor de progesterona (*RP*) e receptor de fator de crescimento epidérmico humano do tipo 2 (*HER-2*). Para a avaliação da expressão desses genes, foi utilizada uma amostra tumoral de cada cadela.

Como a expressão do VDR é determinante para que o tratamento da VD tenha efeito no núcleo das células dos tecidos tratados em cultura, sua expressão foi avaliada em uma amostra normal e uma amostra tumoral de cada cadela.

Para analisar se o tecido permanece viável em cultura e metaboliza a VD, foram analisados os genes do metabolismo da VD *CYP24A1* (24 hidroxilase) e *CYP27B1* (1 alfa hidroxilase) e ainda os genes candidatos *CDKN1A* (p21), *CDKN1B* (p27) e *CD14*, para detectar possíveis alterações na expressão em relação ao tratamento. Para esses genes, foram utilizadas as amostras de todos os tratamentos realizado em cultura, tanto das amostras normais quanto das amostras tumorais.

Baseando-se em dados da literatura, foram selecionados os genes *RPL32* (proteína ribossomal L32) e o gene *ATP5B* (ATP-sintase subunidade 5B) como constitutivos, para serem os normalizadores da reação (Klopfleisch *et al.*, 2010). Os genes constitutivos são aqueles cuja expressão teoricamente não seria alterada pelo tratamento, utilizado posteriormente para o cálculo da diferença de expressão.

3.8.3 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

O desenho dos *primers* foi realizado através do programa Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), a partir da sequência de mRNA do gene em questão, representada no banco de dados do The Nucleotide database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). Os *primers* foram desenhados seguindo os seguintes critérios:

- localização em éxons diferentes, possibilitando o reconhecimento da amplificação da sequência genômica concomitante;
- escolha de um íntron extenso, minimizando a possibilidade de amplificação de possíveis sequências genômicas concomitantes;
- temperatura de alinhamento dos *primers* entre 59-61°C;
- diferença de temperatura de alinhamento entre os *primers forward* e *reverse* de cada par de até 1°C;

- conteúdo de CG de 50-80%;
- tamanho do amplificado entre 80 e 190 pb;

A análise da homologia com outras sequências foi feita com a ferramenta Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) e a formação de estruturas secundárias foi avaliada pelo programa *OligoTech versão 1.00* (Copyright, 1995).

A lista dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) está descrita no Quadro 2. Os *primers* foram confeccionados pela IDT (Integrated DNA Technologies) a 25nM.

Quadro 2 – Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) desenhados e confeccionados para o estudo.

Gene	Sequência (5' 3') (F) FORWARD (R) REVERSE	Tamanho do produto (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Número de acesso
RE	CAGCTGGCTTGGGGGAACCTGG CTCCACAGCCTCGGCATCCTCA	152	65	NM_001002936.1
RP	GGAGTTGTCTCTAGCTCACAGCGT GGAAACTCAACTCAGTGCCCCG	134	60	NM_001003074.1
HER-2	CGGTACCCTTGCCCCCTGAGAC TCTTGGGGGACAGAGTCTTGGGC	180	65	NM_001003217.1
VDR	GGCAGCCAGGACTACAAGTACCGA CGGGACGGTCTGGGGAGAGAA	169	65	XM_543714.3
CYP24A1	GGATGATGGTAACCCCGGTC GTGCTGGGCTGCTCAGAATA	145	60	XM_003433288.1
CYP27B1	ATGGGGAGACGCCTGGCAGA ACAGTCCGGGTCATTGGCCTGA	116	60	XM_538254.3
CDKN1A	AAACGGCGGCAGACCAGCAT GGTGTAAGAAGGGCCTGGGATGT	143	65	XM_532125.3
CDKN1B	GATGCGCCCCGACAGCCAGAC CGTCTGCTCCACTGAACCCGC	156	65	NM_001002957.1
CD14	TAGATGACGACGATTTCCGCTGCT GGCAATCATACACTGGAATGCGCT	83	60	XM_843653.2
ATP5B	GGAGACCATCAAAGGATTCCAGCAG GCTCTTCAGCCAGCTTGTCAGC	125	60	XM_531639.3
RPL32	GCTTGAAGTGCTGCTGATGTGC TCCACGATGGCTTTGCGGTT	87	65	NM_001252169.1

3.8.4 Cálculo da eficiência da amplificação dos *primers*

Realizou-se a cinética da amplificação para todos os pares de *primers* em uma RT-qPCR utilizando quatro diferentes quantidades de cDNA obtidas por meio da diluição seriada de um “*pool*” contendo várias amostras normais e tumorais. A partir de uma concentração de inicial de 12,5 ng/μL de cDNA, foram obtidas quatro diluições seriadas. Como foram utilizados 1 μL de cada diluição nessas reações, as quantidades de cDNA para cada curva variaram de 12,5 ng a 1,56 ng. As reações foram realizadas em triplicatas para cálculo de eficiência da amplificação ($Ef=10^{(-1/slope)}$), sendo o *slope* correspondente à inclinação da reta obtida quando se constrói uma linha de tendência levando em consideração os Ct's do transcrito e o logaritmo das concentrações de cDNA utilizadas. Foram aceitos eficientes com variação de até 10% (90-110%).

3.8.5 Análise dos dados da expressão

Para o cálculo da expressão diferencial foi utilizado o modelo matemático de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Este cálculo avalia a relação entre um gene normalizador, que teoricamente não tem a sua expressão alterada pela condição biológica testada, e o gene alvo a ser analisado. Ainda avalia a mudança dessa proporção (Gene alvo – Gene normalizador) entre a amostra alvo (tratada) e a amostra referência (controle). Este cálculo tem como premissa de que as eficiências dos genes alvo e do gene normalizador devem ser muito próximas de 100% (Livak e Schmittgen, 2001).

Para a análise da expressão de *RE*, *RP* e *HER-2*, não foram analisadas todas as amostras, pois o objetivo era apenas saber se as amostras tumorais expressavam esses genes e não se a expressão se alterava com o tratamento. O mesmo foi considerado para o *VDR*, mas nesse caso também

foram utilizadas amostras normais para analisar se a glândula mamária normal também expressa esse receptor.

3.9 Reação de Imunoistoquímica

Para a realização da técnica de imunoistoquímica, os blocos de parafina foram cortados em micrótomo, com espessura de 3 μm , e distendidos em lâminas histológicas comerciais (Amitel, São Paulo) com o objetivo de promover maior aderência dos cortes às lâminas de vidro, evitando assim a perda do material durante o processamento. Esse procedimento foi realizado no Laboratório de Patologia Investigativa do Hospital do Câncer A.C. Camargo.

A técnica de imunoistoquímica seguiu o protocolo do Laboratório de Patologia Investigativa do Hospital do Câncer A.C. Camargo, utilizando-se a técnica de polímeros de terceira geração (Anexo I). Os anticorpos utilizados estão descritos na Quadro 3.

Quadro 3 – Descrição dos anticorpos utilizados no estudo.

Proteína Analisada	Nome do Anticorpo	Clones	Diluição	Fabricantes
HER-2	c-erbB-2 Oncoprotein	policlonal feito em coelho	1:500	Dako cat# A0485, Glostrup, Dinamarca
Ki-67	Ki-67 Antigen	MIB-1	1:200	Dako cat# M7240, Glostrup, Dinamarca
RE	Estrogen Receptor α	1D5	1:25	Dako cat# M7047, Glostrup, Dinamarca
VDR	Anti-Vitamin D Receptor	9A7	1:35	Millipore cat#04-1526, Temecula, CA, EUA
CASP3	Cleaved Caspase-3	Asp175	1:100	Cell Signaling cat# 9661S, Beverly, MA, EUA

Foram incluídos controles positivos e negativos nas reações, as quais foram inicialmente padronizadas em amostras humanas, e as diluições dos anticorpos foram ajustadas para as amostras caninas. Como controle negativo, foi utilizado o marcador BSA (*Bovine Serum Albumin* – Albumina de Soro Bovino). A Figura 1 ilustra o marcador BSA em três amostras.

Figura 1 – Reação de imunoistoquímica com BSA (controle negativo) em fatias de tecidos mamários não submetidas à cultura de tecidos **(A)** Amostra normal da cadela 55 – Aumento de 20x **(B)** Amostra tumoral da cadela 32 – Aumento de 10x **(C)** Amostra tumoral da cadela 66 – Aumento de 20x.

Os critérios para análise das amostras foram:

a-) Para RE e CASP3:

Para determinar a expressão foram avaliados cinco campos de cada amostra. Em cada campo foi mensurado o percentual de células marcadas e a intensidade de coloração (Quadro 4). Foi estabelecida uma média dos valores determinados em cada campo.

Quadro 4 - Pontuação atribuída ao percentual de células marcadas por campo e atribuída à intensidade de coloração das células marcadas por campo, em mamas normais e tumorais de cadelas.

Porcentagem de células marcadas	Pontuação I	Intensidade	Pontuação II	Total
<5%	0	fraca	1	Soma das pontuações I e II (varia de 1 a 7)
5-25%	1	moderada	2	
26-50%	2	forte	3	
51-75%	3			
>75%	4			

b-) Para HER-2:

Para determinar a expressão de HER-2 foram avaliados cinco campos de cada amostra. O método de análise foi o HercepTest da Dako (Dutra et al., 2004) segundo o Quadro 5.

Quadro 5 – Classificação da expressão de HER-2 pelo método HercepTest (Dako)

Escore	Avaliação da super-expressão da proteína HER-2	Padrão de marcação
0	Negativo	Sem marcação da membrana ou marcação em menos de 10% das células tumorais.
1+	Negativo	Marcação fraca da membrana detectado em mais de 10% das células tumorais. Marcação apenas em parte da membrana.
2+	Positivo	Marcação completa da membrana, de fraca a moderada, em 10% das células tumorais
3+	Positivo	Forte marcação completa da membrana em mais de 10% das células tumorais

c-) Subtipos moleculares:

Para determinar os subtipos moleculares, utilizamos a porcentagem de células marcadas em RE e HER-2 segundo Kim e colaboradores (2013) e Im e colaboradores (2013) (Quadro 6). A amostra era considerada positiva para RE quando mais que 10% das células apresentasse marcação, e no caso de HER-2 utilizamos o método HercepTest (Dako) citado anteriormente.

Quadro 6 – Classificação dos tumores mamários em subtipos moleculares considerando a positividade de RE e HER-2 (adaptado de Kim *et al.*, 2013 e Im *et al.*, 2013).

Subtipo Luminal A	Subtipo Luminal B	Subtipo Basaloide	Subtipo Superexpressão de HER-2
RE +	RE +	RE -	RE -
HER-2 -	HER-2 +	HER-2 -	HER-2 +

d-) Para VDR:

As amostras foram classificadas quanto à porcentagem de células marcadas e a intensidade, como descrito para o RE, HER-2 e CASP3.

Após essa classificação, as amostras foram divididas em três padrões (I, II, III), onde Padrão I foi designado para marcação mista em células epiteliais e mioepiteliais na mesma proporção; Padrão II para marcação predominante em células mioepiteliais e rara marcação em células epiteliais; Padrão III para marcação predominante em células epiteliais e rara marcação em células mioepiteliais (Figura 2).

Figura 2 – Expressão proteica de VDR em amostras de glândulas mamárias divididas em padrões segundo a localização da marcação nuclear. **(A)** Cadela 55 normal apresentando Padrão I de marcação (marcação mista de VDR em células epiteliais e mioepiteliais na mesma proporção). Aumento 10x. **(B)** Cadela 43 tumoral apresentando Padrão II de marcação (marcação de VDR predominante em células mioepiteliais e rara marcação em células epiteliais). Aumento 4x. **(C)** Cadela 68 tumoral apresentando padrão III de marcação (marcação de VDR predominante em células epiteliais e rara marcação em células mioepiteliais). Aumento 10x.

Para confirmar a marcação das células epiteliais e mioepiteliais, foram selecionadas ao acaso amostras de cada padrão e realizadas reações de imunoistoquímica para os marcadores: α actina de músculo liso (marcador de células mioepiteliais), pancitoqueratina (marcador de células epiteliais e mioepiteliais), vimentina (marcador de células mesenquimais e mioepiteliais) e desmina (marcador de tecido muscular e diferenciação óssea) (Gärtner et al, 1999; Gama *et al.*, 2003). A imunomarcação desses marcadores pode ser visualizada nas Figuras 3 a 6.

Figura 3 – Expressão proteica de α actina de músculo liso em tecidos mamários de cadelas não submetidos à cultura de tecidos (para marcação de células mioepiteliais). **(A)** Amostra tumoral da cadela 32 – Aumento 10x **(B)** Amostra tumoral da cadela 68 – Aumento 20x **(C)** Amostra normal da cadela 55 – Aumento 10x **(D)** Amostra tumoral da cadela 65 – Aumento 20x **(E)** Amostra tumoral da cadela 66 – Aumento 20x **(F)** Amostra tumoral da cadela 36 – Aumento 20x.

Figura 4 – Expressão proteica de pancitoqueratina em tecidos mamários de cadelas não submetidos à cultura de tecidos (para marcação de células epiteliais e mioepiteliais). **(A)** Amostra tumoral da cadela 32 – Aumento 10x **(B)** Amostra tumoral da cadela 68 – Aumento 20x **(C)** Amostra normal da cadela 55 – Aumento 10x **(D)** Amostra tumoral da cadela 65 – Aumento 20x **(E)** Amostra tumoral da cadela 66 – Aumento 20x **(F)** Amostra tumoral da cadela 36 – Aumento 20x.

Figura 5 – Expressão proteica de vimentina em tecidos mamários de cadelas não submetidos à cultura de tecidos (para marcação de células mesenquimais e mioepiteliais). **(A)** Amostra tumoral da cadela 32 – Aumento 10x **(B)** Amostra tumoral da cadela 68 – Aumento 20x **(C)** Amostra normal da cadela 55 – Aumento 10x **(D)** Amostra tumoral da cadela 65 – Aumento 20x **(E)** Amostra tumoral da cadela 66 – Aumento 20x **(F)** Amostra tumoral da cadela 36 – Aumento 20x.

Figura 6 – Expressão proteica de desmina em tecidos mamários de cadelas não submetidos à cultura de tecidos (para marcação de tecido muscular e diferenciação óssea). **(A)** Amostra tumoral da cadela 32 – Aumento 10x **(B)** Amostra tumoral da cadela 68 – Aumento 20x **(C)** Amostra normal da cadela 55 – Aumento 10x **(D)** Amostra tumoral da cadela 65 – Aumento 10x **(E)** Amostra tumoral da cadela 66 – Aumento 20x **(F)** Amostra tumoral da cadela 36 – Aumento 20x.

e-) Para Ki-67

Foram consideradas células imunomarcadas positivas quando havia forte coloração acastanhada nos núcleos para cada 1000 células totais (positivas e negativas). Os resultados foram expressos em porcentagem (onde 100% eram as 1000 células totais).

3.10 Análise Estatística

Para o estudo da expressão gênica, os valores da expressão relativa foram transformados em logaritmo de base 10 com a intenção de diminuir o impacto de valores extremos.

A distribuição dos valores foi verificada utilizando o teste de normalidade de Shapiro-Wilk (Shapiro e Wilk, 1965) ou Kolmogorov – Smirnov (Goodman, 1954). Essas análises de variância detectam a não normalidade de distribuição de um grupo de dados. O teste de Shapiro-Wilk é apropriado para amostras até 50 dados e o teste Kolmogorov - Smirnov até 5000 dados, então, dependendo do número de amostras decidiu-se qual o mais adequado teste de normalidade para utilizar. A hipótese nula (H_0) do teste significa que a amostra apresenta distribuição Normal. Assim, para valores de $p < 0,05$, rejeita-se H_0 , rejeitando a suposição de normalidade. Os resultados desta análise foram utilizados para a escolha do teste estatístico adequado (testes paramétricos se possuírem uma distribuição normal ou não paramétricos se não possuírem uma distribuição normal).

Para determinar o nível de significância das diferenças, foram utilizados testes paramétricos (teste T-Student pareado ou Anova) ou não paramétricos (teste de Wilcoxon, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Qui-quadrado ou Fisher), considerando $p \leq 0,5$, bicaudado. Foi utilizado o programa estatístico “*Statistical Package for the Social Sciences*” v.20.0 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

4. RESULTADOS

4.1 Características dos animais do grupo controle e tumor de mama

No total foram incluídos 134 animais, 70 cadelas com tumores de mama (grupo tumor), 50 cadelas saudáveis (grupo controle fêmea) e 14 cães machos saudáveis (grupo controle macho). Os dados clínicos das 70 pacientes diagnosticadas com tumor de mama estão dispostos no Anexo J. A média de idade das cadelas do grupo controle (n=33) foi de $44,48 \pm 40,98$ meses (4 – 168 meses), dos cães machos do grupo controle (n=10) foi de $45,90 \text{ meses} \pm 39,95$ (3 – 132 meses) e das pacientes com tumores mamários (n=67) foi de $118,21 \pm 28,35$ meses (72 – 192 meses).

Quanto às raças, as mais encontradas no grupo controle fêmea foram os SRD (n=33, 66%), seguidas por Pastor Alemão (n=4, 8%), Teckel (n=4, 8%), Pitbull (n=2, 4%), Poodle (n=2, 4%), Rottweiler (n=2, 4%), Lhasa Apso (n=1, 2%), Shar Pei (n=1, 2%), Pinscher (n=1, 2%). No grupo controle macho, a mais encontrada também foi a SRD (n=11, 79%), seguidas por Poodle (n=1, 7%), Pitbull (n=1, 7%) e Labrador Retriever (n=1, 7%).

Já nas pacientes com tumores mamários, as raças mais encontradas foram: Poodle (n=17; 24%), sem raça definida - SRD (n=11; 16%), Cocker spaniel (n=10; 14%), Boxer (n=7; 10%) e Teckel (n=6; 9%). Outras raças encontradas foram: Rottweiller (n=4; 6%), Pitbull (n=2; 3%), Labrador (n=2; 3%), Pastor alemão (n=2; 3%), Pinsher (n=2; 3%), Husky siberiano (n=1; 1%), Dog alemão (n=1; 1%), Yorkshire (n=1; 1%), Bulldog (n=1; 1%), Schnauzzer (n=1; 1%) e Lhasa apso (n=1; 1%), Akita (n=1; 1%).

Para facilitar as análises, as raças foram separadas em três grupos relacionando a raça e o peso com o porte do animal (conforme citado no item Material e Métodos). Segundo essa classificação, no grupo controle fêmea

38% das cadelas foram agrupadas como pequeno porte, 32% como médio porte e 18% como grande porte, sendo que em 12% das cadelas não conseguimos obter essa informação. No grupo controle macho, 21% eram de pequeno porte, 36% de médio porte e 14% de grande porte, sendo que 29% não conseguimos estabelecer uma classificação. Nas pacientes com tumores mamários, 43% de cadelas foram agrupadas como sendo de pequeno porte, 36% de médio porte e 19% de grande porte, sendo que em 3% não conseguimos incluir nessa classificação.

Para avaliarmos a interferência da VD ingerida pelas pacientes ou produzida pela pele, qualificamos a alimentação dos pacientes e a exposição solar que permitisse a síntese cutânea. Os dados gerais estão dispostos no Anexo K.

Quanto à exposição solar, 52% das cadelas do grupo controle eram expostas ao sol, 6% não era expostas ao sol frequentemente, sendo que os outros 42% restantes não obtemos essa informação. No grupo controle macho, todos os animais que conseguimos essa informação (71%) eram expostos frequentemente ao sol. Já nas pacientes com tumor de mama, 94% eram expostas ao sol diariamente.

Em relação às características da pelagem, conseguimos obter os dados apenas das cadelas do grupo tumoral, sendo que 65% apresentavam pelo curto e 35% apresentavam pelo longo; 35% das cadelas possuíam pelo claro, 52% escuro, 14% malhado (branco e preto).

Quanto ao estadiamento clínico das pacientes com tumores mamários malignos, 28% apresentaram doença estadio I (n=16), 28% estadio II (n=16), 26% estadio III (n=15), 16% estadio IV (n=9) e 2% estadio V (n=1). Ainda no grupo tumoral, 21% das cadelas eram castradas, 3% usaram contraceptivos e 74% apresentavam pseudogestação.

4.2 Caracterização dos tumores

4.2.1 Diagnóstico Histopatológico

Os tumores e amostras normais de glândulas mamárias adjacentes à glândula acometida pelo tumor foram analisados por Hematoxilina-Eosina para avaliação histológica. A descrição por cadela está descrita no quadro a seguir (Quadro 7). As amostras supostas normais que se encontravam comprometidas por tumor no exame histopatológico foram excluídas das análises de expressão gênica e proteica.

Quadro 7 - Análise das amostras emblocadas em parafina e coradas pela técnica de Hematoxilina-Eosina.

Amostra	Histologia da Glândula Mamária Normal Adjacente	Histologia do Tumor Mamário
C1	Discreta Inflamação	Tumor Misto Benigno
C2	Tecido Adiposo	Carcinoma Tubular Simples
C3	Normal	Carcinoma Tubular Simples I
C4	Normal	Carcinoma Tipo Misto I
C5	Áreas de Atipia	Carcinoma Tubular Complexo I
C6	Normal	Carcinoma Tubular Simples II
C7	Glândula Normal e Tecido Cutâneo	Mastocitoma
C8	Normal	Carcinoma Tubular Simples I
C9	Normal	Carcinoma Tipo Misto I
C10	Normal	Carcinoma Tipo Misto I
C11	Normal	Adenoma Complexo
C12	Normal	Carcinoma Tipo Misto I
C13	Normal	Carcinoma Tubular Simples I
C14	Normal	Carcinoma Tubular Simples I
C15	Normal	Adenoma Simples
C16	Normal	Carcinoma Tubular Simples I
C17	Áreas de Atipia	Carcinoma Tubular Simples I
C18	Normal	Fibroadenoma
C19	Áreas de Atipia	Carcinoma Sólido II
C20	Normal	Osteossarcoma
C21	Áreas de Atipia	Carcinoma Tubular Simples I

C22	Normal	Carcinoma Tubular Simples I
C23	Normal	Carcinoma Complexo I
C24	Normal	Carcinoma Complexo I
C25	Normal	Carcinoma Complexo I
C26	Normal	Adenoma Complexo
C27	Comprometida por tumor	Carcinoma Tipo Misto I
C28	Áreas de Atipia	Carcinoma Sólido II
C29	Normal	Carcinoma Complexo I
C30	-	Carcinoma Complexo I
C31	-	Carcinoma Tipo Misto I
C32	Normal	Carcinoma Tubular Simples I
C33	Comprometida por tumor	Carcinoma Tubular Simples II
C34	Normal	Carcinoma Complexo I
C35	Normal	Carcinoma Tipo Misto I
C36	Comprometida por tumor	Adenoma Complexo
C37	Áreas de Atipia	Carcinoma Complexo I
C38	Áreas de Atipia	Fibroadenoma
C39	Carcinoma Tubular Simples	Carcinoma Tipo Misto I
C40	Adenoma	Carcinoma Tipo Misto I
C41	Normal	Carcinoma Tipo Misto I
C42	Áreas de Atipia	Comedocarcinoma
C43	Normal	Carcinoma Tubular Simples I
C44	Normal	Carcinoma Complexo II
C45	Normal	Carcinoma Tipo Misto II
C46	Normal	Carcinoma Complexo I
C47	Áreas de Atipia	Carcinoma Tipo Misto I
C48	Áreas de Atipia	Carcinoma Tubular Simples I
C49	Normal	Carcinoma Tubular Simples I
C50	Normal	Hiperplasia
C51	Normal	Mioepitelioma ou Neoplasia Maligna de Células Fusiformes
C52	Normal	Carcinoma Tipo Misto I
C53	Comprometida por tumor	Adenoma Simples
C54	Adenoma Complexo	Osteossarcoma
C55	Normal	Carcinoma Complexo I
C56	Normal	Carcinoma Complexo I
C57	Normal	Adenoma Complexo
C58	Normal	Sarcoma Fusocelular Mamário
C59	Normal	Carcinoma Complexo I
C60	Normal	Carcinoma Complexo I
C61	Normal	Carcinoma Espinocelular
C62	Normal	Carcinoma Tubular Simples I
C63	Normal	Carcinoma Complexo I
C64	Normal	Carcinoma Complexo I
C65	Normal	Carcinoma Tipo Misto I

C66	Normal	Carcinoma Complexo I
C67	Normal	Mastite
C68	Normal	Carcinoma Tubular Simples II
C69	Normal	Carcinoma Complexo I
C70	Comprometida por tumor	Adenoma Simples

4.2.2 Subtipos moleculares (RP, RE e HER-2)

Foram avaliadas a expressão gênica através de RT-qPCR de *RP*, *RE* e *HER-2* e a expressão proteica de RE e HER-2 através de imunistoquímica para a caracterização dos tumores.

Para analisar as reações de imunistoquímica de RE e HER-2, as amostras foram classificadas pela pontuação (descrito em Material e Métodos), variando de 0 a 7 pontos segundo a intensidade da marcação e porcentagem de células positivas (Figura 7 e 8). Observa-se que a maioria dos tumores expressa pouca marcação de RE devido ao maior número de casos estar concentrado nas pontuações mais baixas (pouca intensidade de marcação e porcentagem baixa de células marcadas). Já em HER-2, observa-se o oposto de RE: um maior número de tumores expressando pontuação alta (intensidade alta de marcação e muitas células marcadas).

Expressão proteica de RE representada pela pontuação

Figura 7 – Expressão proteica de RE em amostras de glândulas mamárias tumorais distribuídas pela classificação em pontuações de 0 a 7 (n=63).

Expressão proteica de Her-2 representada pela pontuação

Figura 8 – Expressão proteica de HER-2 em amostras de glândulas mamárias tumorais distribuídas pela classificação em pontuações de 0 a 7 (n=65).

Comparou-se a expressão gênica relativa realizada por RT-qPCR e a expressão proteica realizada por IHQ de RE e HER-2, através da pontuação. Houve diferença entre a expressão gênica em relação a cada grupo de pontuação da expressão proteica nos dois receptores (Figura 9 e 10).

Figura 9 – Expressão proteica de RE em amostras de glândulas mamárias tumorais realizadas por IHQ distribuídas pela classificação em pontuações de 0 a 7 em comparação com a expressão gênica realizada por RTq-PCR (Teste Wilcoxon, $p=0,005$, $n=59$).

Figura 10 – Expressão proteica de HER-2 em amostras de glândulas mamárias tumorais distribuídas pela classificação em pontuações de 0 a 7 em comparação com a expressão gênica realizada por RTq-PCR (Teste Wilcoxon, $p<0,001$, $n=59$).

As amostras foram separadas entre tumores benignos e carcinomas. A expressão gênica de *RP*, *RE* e *HER-2* e a expressão proteica de *RE* e *HER-*

2 não foram diferentes quando comparamos entre tumores benignos e carcinomas (Quadro 8).

Quadro 8 – Análise dos dados pelo teste Kruskal Wallis da expressão gênica realizada por RT-qPCR de *RP*, *RE* e *HER-2* e da expressão proteica realizada por imunistoquímica de *RE* e *HER-2* comparando entre tumores benignos e carcinomas.

Variável analisada	Tipo de Tumor	Número de amostras	Mediana da Expressão Gênica (mínimo e máximo)	Média ± Desvio Padrão	Valor de p
Expressão gênica de <i>HER-2</i>	Benigno	9	0,97 (0,91 – 2,65)	1,30 ± 0,98	0,972
	Carcinoma	45	1,20 (0,21 – 12,10)	1,55 ± 1,98	
Expressão gênica de <i>RE</i>	Benigno	9	0,78 (0,35 – 1,79)	0,97 ± 0,48	0,313
	Carcinoma	45	1,17 (0,12 – 5,76)	1,36 ± 1,03	
Expressão gênica de <i>RP</i>	Benigno	9	0,74 (0,06 – 19,03)	3,80 ± 6,32	0,685
	Carcinoma	45	0,93 (0,04 – 21,54)	2,34 ± 3,78	
Expressão proteica de <i>HER-2</i>	Benigno	9	6 (1-7)	5 ± 2,18	0,767
	Carcinoma	51	6 (0-7)	5,37 ± 1,43	
Expressão proteica de <i>RE</i>	Benigno	9	2 (0-4)	1,89 ± 1,53	0,982
	Carcinoma	49	1 (0-6)	1,80 ± 1,67	

Os tumores foram classificados em positivos ou negativos para *RE* e *HER-2* através da expressão proteica realizada por IHQ. As amostras eram consideradas positivas para *RE* quando o tumor apresentava mais de 10% de marcação (Figura 11) e positivas para *HER-2* seguindo a classificação do Herceptest (Figura 12), segundo descrito no item Material e Métodos. A marcação de *RE* era nuclear e a marcação de *HER-2* era principalmente citoplasmática.

Figura 11 – Expressão proteica de RE em tecidos mamários tumorais de cadelas não submetidos à cultura de tecidos. **(A)** Cadela 68, amostra negativa, pontuação 0. **(B)** Cadela 62, amostra positivo, pontuação 3. **(C)** Cadela 43, amostra positiva, pontuação 5. **(D)** Cadela 67, amostra positiva, pontuação 6. Aumento 40x.

Figura 12 – Expressão proteica de HER-2 em tecidos mamários tumorais de cadelas não submetidos à cultura de tecidos. **(A)** Cadela 54, amostra negativa, pontuação 1, herceptest 0. Aumento 40X. **(B)** Cadela 68, amostra negativa, pontuação 4, herceptest 0. Aumento 20X. **(C)** Cadela 60, amostra negativa, pontuação 5, herceptest 1. Aumento 40X, **(D)** Cadela 53, amostra mostrando um controle positivo, pontuação 7, herceptest 3. Aumento 40X. **(E)** Cadela 65, amostra positiva, pontuação 7, herceptest 3. Aumento 20x.

Utilizando-se dos critérios do HercepTest para analisar a marcação de HER-2, foram encontradas 24 amostras positivas (44%) e 30 amostras negativas (56%) (Figura 13). Comparamos essa positividade de HER-2 entre os tumores benignos e os carcinomas (n=52). Nos tumores benignos encontramos 4 amostras positivas (57%) e 3 amostras negativas (43%) e nos carcinomas encontramos 19 amostras positivas (42%) e 26 amostras negativas (58%) (Figura 14).

Positividade de Her-2 nos tumores mamários classificados pelo método HercepTest

Figura 13 – Expressão proteica de HER-2 em amostras de glândulas mamárias tumorais distribuídas em positivas ou negativas segundo o método HercepTest (n=54).

Figura 14 – Expressão proteica de HER-2 em amostras de glândulas mamárias tumorais distribuídas em positivas ou negativas segundo o método HercepTest e classificadas em tumores benignos ou em carcinomas (n=52).

Para RE, a positividade foi igualmente distribuída: foram encontradas 31 amostras positivas e 31 negativas (Figura 15). Comparamos essa positividade de RE entre os tumores benignos e os carcinomas (n=57). Nos tumores benignos encontramos 5 amostras positivas (56%) e 4 amostras negativas (44%) e nos carcinomas encontramos uma positividade semelhante: 24 amostras positivas e 24 negativas (Figura 16).

Figura 15 – Expressão proteica de RE em amostras de glândulas mamárias tumorais distribuídas em positivas ou negativas (n=62).

Figura 16 – Expressão proteica de RE em amostras de glândulas mamárias tumorais distribuídas em positivas ou negativas classificadas em tumores benignos ou em carcinomas (n=57).

Os tumores foram classificados quanto aos subtipos moleculares (ver Material e Métodos) e podem ser visualizados no Quadro 9. A maior parte dos tumores era, Luminal B (29% - n=15) e basaloide (29% - n=15), seguido pelo

Luminal A (25% - n=13), e por último o subtipo de superexpressão de HER-2 (17% - n=9).

Quadro 9 – Classificação dos tumores de mama quanto aos subtipos moleculares, de acordo com a positividade de RE e HER-2 (n=52).

Paciente	Subtipos Moleculares
C12	Luminal A
C13	Basaloide
C14	Superexpressão de HER-2
C15	Luminal A
C16	Basaloide
C17	Luminal A
C18	Superexpressão de HER-2
C19	Basaloide
C21	Superexpressão de HER-2
C22	Basaloide
C23	Luminal A
C24	Basaloide
C25	Superexpressão de HER-2
C26	Luminal B
C27	Luminal A
C28	Basaloide
C29	Luminal B
C32	Luminal A
C33	Luminal A
C34	Luminal B
C35	Superexpressão de HER-2
C36	Luminal A
C37	Basaloide
C39	Luminal B
C40	Luminal A
C41	Luminal A
C42	Basaloide
C43	Luminal B
C44	Luminal B
C45	Luminal B
C46	Luminal B
C48	Basaloide
C49	Basaloide

C51	Superexpressão de HER-2
C52	Luminal A
C53	Superexpressão de HER-2
C54	Basaloide
C55	Superexpressão de HER-2
C56	Superexpressão de HER-2
C57	Luminal A
C58	Basaloide
C59	Luminal B
C60	Basaloide
C61	Basaloide
C62	Luminal A
C63	Luminal B
C64	Luminal B
C65	Luminal B
C66	Luminal B
C68	Basaloide
C69	Luminal B
C70	Luminal B

As amostras tumorais foram separadas em positivas e negativas segundo a expressão proteica de RE e comparadas com a expressão gênica, sendo que não foi encontrada diferença significativa (Figura 17). A mesma análise foi realizada para HER-2, mas nesse caso observamos maior expressão gênica em amostras consideradas positivas para a expressão proteica (Figura 18).

Figura 17 – Comparação da expressão gênica relativa de RE realizada através de RT-qPCR com as amostras classificadas como positivas ou negativas segundo a expressão proteica (IHQ) das mesmas amostras de tumor de mama. As amostras foram consideradas positivas quando apresentavam mais de 10% de células marcadas (Teste Wilcoxon, $p=0,016$, $n=59$).

Figura 18 – Comparação da expressão gênica relativa de HER-2 realizada através de RT-qPCR com as amostras classificadas como positivas ou negativas segundo a expressão proteica (IHQ) das mesmas amostras de tumor de mama. As amostras foram analisadas segunda o critério HercepTest, quando apresentavam marcação 0 ou 1+ foram consideradas negativas e 2+ ou 3+ foram consideradas positivas (Teste Wilcoxon, $p=0,014$, $n=54$).

4.3 Dosagem Sérica de 25(OH)D₃

4.3.1 Concentração sérica de 25(OH)D₃ na espécie canina

Um de nossos objetivos era determinar a concentração sérica de 25(OH)D₃ na espécie canina e para isso incluímos 103 animais. Considerando todos os animais, realizamos a dosagem sérica de 25(OH)D₃ de 39 cadelas portadoras de tumor de mama e de 64 animais saudáveis (grupo controle), sendo que 50 destes animais eram fêmeas e 14 destes animais eram machos.

Comparamos a idade dos animais em cada grupo, sendo que alguns animais controle não foram incluídos nesta análise pois não foi possível obter a idade de todos (Figura 19). Houve diferença entre os três grupos, demonstrando que as cadelas do grupo tumoral apresentava idade mais avançada em relação ao grupo controle (Quadro 10).

Figura 19 – Comparação entre a idade nas cadelas sem tumor, nos cães machos sem tumor e nas cadelas com tumor de mama (Teste de Kruskal Wallis, $p < 0,001$, $n = 80$).

Quadro 10 – Classificação dos animais em relação à idade nos animais do grupo controle e nas cadelas com tumor de mama.

Grupo	Número de amostras	Média de Idade (meses) $\pm$ Desvio Padrão	Mediana de Idade (meses)
Controle Fêmea	31	39,61 $\pm$ 36,06	24
Controle Macho	10	45,90 $\pm$ 39,95	36
Tumor	39	114,15 $\pm$ 28,72	108

Comparamos o peso dos animais entre os três grupos e não houve diferença significativa (Figura 20), assim como o porte dos animais entre os três grupos (Figura 21), mostrando que a distribuição dos animais nos grupos tumorais e controle era homogênea (Quadro 11).

Figura 20 – Comparação entre peso e os grupos controle fêmea, controle macho e tumor mamário (Teste de Kruskal Wallis, $p=0,586$, $n=82$).

Distribuição dos animais do grupo tumor e dos grupos controles em relação ao porte

Figura 21 – Distribuição dos animais nos grupos controle fêmea, controle macho e tumor em relação ao porte (Teste de Kruskal Wallis, $p=0,815$, $n=93$).

Quadro 11 – Comparação do número de animais nos grupos controle fêmea, controle macho e tumor em relação ao porte.

Grupos	Pequeno Porte n (%)	Médio Porte n (%)	Grande Porte n (%)	Total n (%)
Tumor	17 (43,6%)	15 (38,5%)	7 (17,9%)	39 (100%)
Controle (Fêmea)	19 (43,2%)	16 (36,4%)	9 (20,5%)	44 (100,0%)
Controle (Macho)	3 (30,0%)	5 (50,0%)	2 (20,0%)	10 (100,0%)
Total	39 (41,9%)	36 (38,7%)	18 (19,4%)	93 (100,0%)

Os valores das concentrações séricas de 25(OH)D₃, realizados através de RIE, estão dispostos nos Anexos L (cadela portadoras de tumor de mama), M (cadela saudáveis) e N (cães machos saudáveis). Observamos que a concentração sérica média dos animais ($n=103$) foi de $25,58 \pm 13,34$ ng/mL (variou entre 3,37 e 82,54 ng/mL).

Comparamos a concentração sérica de 25(OH)D₃ entre os grupos e a concentração não diferiu entre cadela com tumor da mama e cadela do

grupo controle (Figura 22) ou com todos os animais controle (machos e fêmeas sadios, Figura 23).

Figura 22 – Comparação entre concentração sérica de 25(OH)D₃ entre as cadelas sadias (controle) e as cadelas com tumor de mama (Teste Mann-Whitney, $p=0,350$, $n=89$).

Figura 23 – Comparação entre concentração sérica de 25(OH)D₃ entre as cadelas com tumor de mama e o grupo controle (machos e fêmeas) (Teste Kruskal Wallis, $p=0,688$, $n=103$).

Como em seres humanos relata-se menor concentração sérica de 25(OH)D₃ em indivíduos idosos, analisamos se haveria correlação entre a concentração sérica de 25(OH)D₃ e a idade dos animais em todos os grupos (tumoral e controle). Não detectamos, no entanto, correlação entre concentração sérica de 25(OH)D₃ e idade entre as cadelas dos três grupos (Figura 24).

Figura 24 – Correlação entre concentração sérica de 25(OH)D₃ e idade em cadelas sem tumor (n=31), cães machos sem tumor (n=10) e cadelas com tumor de mama (n=39) (Correlação de Pearson, $p=0,464$, $r=-0,830$, $n=80$).

4.3.2 Concentração sérica de 25(OH)D₃ no grupo controle

Analisamos a seguir, com maior particularidade, a concentração sérica de 25(OH)D₃ nos animais saudáveis e observamos que a concentração sérica variou entre 3,37 e 82,54 ng/mL, ($24,95 \pm 12,72$ ng/mL). A concentração de 25(OH)D₃ foi significativamente maior em machos ($32,5 \pm 19,3$ ng/mL) do que em fêmeas ($22,8 \pm 9,6$ ng/mL) (Figura 25).

Figura 25 – Concentração sérica de 25(OH)D₃ em animais controle (Teste T Student bicaudal, $p=0,012$, $n=64$).

Em cadelas sem doença, cuja idade era conhecida ($n = 31$), não observamos correlação entre a concentração sérica de 25(OH)D₃ e a idade (Figura 26).

Figura 26 – Correlação entre concentração sérica de 25(OH)D₃ e idade em cadelas do grupo controle (cadela sadias) (Correlação de Pearson; $p= 0,670$ $n=31$; $r=0,080$).

Avaliamos a concentração sérica média de 25(OH)D₃ em relação à concentração de VD na dieta e verificamos que não houve correlação no grupo controle fêmea (Correlação de Pearson, $p=0,091$, $r=0,352$, $n=24$) e no grupo controle macho (Correlação de Pearson, $p=0,319$, $r=-0,376$, $n=9$).

Comparamos então com o tipo de dieta (apenas comida caseira, apenas ração ou ambas) com a concentração sérica de VD. No grupo controle fêmea, houve diferença significativa, demonstrando que as cadelas que se alimentavam de comida caseira e ração apresentavam concentração sérica mais baixa de VD ($21,80 \pm 6,82$ ng/mL) do que as que se alimentavam apenas de ração ($35,16 \pm 7,38$ ng/mL) (Figura 27).

Figura 27 – Comparação entre concentração sérica de 25(OH)D₃ e tipo de alimentação nas cadelas do grupo controle (cadelas sadias) (Teste Kruskal Wallis, $p=0,001$, $n=30$).

No grupo controle macho, apesar dos cães que se alimentavam de comida caseira e ração apresentarem menor concentração sérica de VD ($28,57 \pm 8,21$ ng/mL) quando comparados aos que se alimentavam apenas de ração ($40,01 \pm 34,98$ ng/mL), não houve diferença significativa entre os tipos de alimentação (Figura 28).

Figura 28 – Comparação entre concentração sérica de 25(OH)D₃ e tipo de alimentação nos cães machos do grupo controle (Teste Kruskal Wallis, $p=0,670$, $n=10$).

No grupo controle fêmea, não houve diferença significativa na comparação entre a concentração sérica de VD e a exposição solar (Figura 29). Nos machos essa comparação não pode ser realizada pois todos os animais eram expostos ao sol diariamente.

Figura 29 – Comparação entre concentração sérica de 25(OH)D₃ e exposição solar nas cadelas fêmeas do grupo controle (Teste Kruskal Wallis, $p=0,943$, $n=29$).

4.3.3 Concentração sérica de 25(OH)D₃ nas cadelas com tumor de mama

Em cadelas com tumor da mama, a concentração sérica média de 25(OH)D₃ foi de $26,62 \pm 14,25$ ng/mL (variou entre 7,48 e 60,33 ng/mL). Observamos neste grupo de cadelas uma correlação inversa significativa entre a concentração sérica de 25(OH)D₃ e a idade (Figura 30), ou seja, quanto maior a idade dos animais, menor era a concentração sérica de VD.

Concentração sérica de 25(OH)D₃ em relação à idade nas cadelas portadoras de neoplasias mamárias

Figura 30 – Correlação entre concentração sérica de 25(OH)D₃ e idade entre as cadelas com tumor de mama (Correlação de Pearson, $p=0,042$, $r=-0,327$, $n=39$).

Comparou-se a concentração de 25(OH)D₃ nos animais portadores de tumor de mama em relação ao estadio clínico (EC). Não houve diferença em relação ao estadio clínico (EC I vs EC II vs EC III vs EC IV vs EC V) ou agrupando doença local (EC I, EC II, EC III) vs doença metastática (EC IV, EC V), ou quanto ao tamanho de tumor (EC I e EC II vs EC III, EC IV, EC V) (Tabela 2).

Tabela 2 – Classificação da concentração sérica de 25(OH)D₃ nos animais portadores de tumor de mama em relação ao estadio clínico.

Estadio Clínico	Número de Amostras	Média ± Desvio Padrão	Análise estatística
I	11	29,3 ± 15,5 ng/mL	Teste Anova p=0,729
II	8	21,0 ± 11,2 ng/mL	
III	8	28,0 ± 12,4 ng/mL	
IV	4	27,4 ± 19,6 ng/mL	
V	1	18,4 ng/mL	
I, II, III	27	26,50 ± 13,68 ng/mL	Teste T Student p=0,979
IV, V	5	27,38 ± 19,61 ng/mL	
I, II	19	25,96 ± 14,33 ng/mL	Teste T Student p=0,526
III, IV, V	13	27,78 ± 14,58 ng/mL	

Comparou-se a concentração de 25(OH)D₃ nos animais portadores de tumor de mama em relação à castração prévia. Os grupos comparados foram de 8 cadelas que foram castradas previamente à cirurgia (19,64 ± 11,01 ng/mL) e de 31 cadelas que foram castradas no momento da cirurgia (28,42 ± 15,59 ng/mL). Apesar da média das cadelas que foram castradas no momento da cirurgia ser aparentemente maior, não houve diferença significativa (Figura 31).

Concentração sérica de 25(OH)D₃ nas cadelas com tumor de mama em relação à castração

Figura 31 – Comparação entre concentração sérica de 25(OH)D₃ e castração nas cadelas com tumor de mama (Teste Mann-Whitney, $p = 0,107$, $n = 39$).

Também não houve diferença significativa (Teste Mann-Whitney, $p = 0,670$) quanto à apresentação de pseudogestação. Os grupos comparados foram de 31 cadelas que apresentaram algum episódio durante a vida ($25,80 \pm 13,56$ ng/mL) e de 8 cadelas que nunca apresentaram pseudogestação (média de $29,76 \pm 17,33$ ng/mL).

Não foi possível analisar a diferença entre as cadelas que usaram contraceptivos hormonais e as que nunca fizeram o uso pois o número de amostras para um dos grupos era muito pequeno. Havia apenas uma cadela que utilizou o contraceptivo hormonal (24,41 ng/mL) e 38 cadelas que nunca utilizaram ($26,94 \pm 14,30$ ng/mL).

Comparamos a concentração sérica de VD com a concentração de VD na dieta, mas não houve correlação significativa (Correlação de Pearson, $p = 0,737$, $r = 0,59$, $n = 35$). A concentração de VD na dieta foi estabelecida através da quantidade de VD nos rótulos das rações e a comida caseira através de Philippi (2002), descritas no item material e métodos.

Comparamos então a concentração sérica de VD com o tipo de dieta (apenas comida caseira, apenas ração ou ambas). Não houve diferença

significativa, mas aparentemente as cadelas que se alimentavam apenas de comida caseira ($16,53 \pm 12,70$ ng/mL) apresentavam uma média de concentração sérica mais baixa quando comparadas às que se alimentavam apenas de ração ($26,22 \pm 10,57$ ng/mL) ou de ração com comida caseira ($27,81 \pm 15,24$ ng/mL) (Figura 32).

Figura 32 – Comparação entre concentração sérica de 25(OH)D₃ e tipo de alimentação nas cadelas do grupo tumoral (Teste Kruskal Wallis, $p=0,446$, $n=30$).

Apesar de aparentemente as cadelas que não eram expostas frequentemente ao sol ($11,79 \pm 6,08$ ng/mL) apresentarem uma média de concentração sérica menor quando comparadas com as que eram expostas ao sol ($27,42 \pm 14,16$ ng/mL), essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 33).

Figura 33 – Comparação entre concentração sérica de 25(OH)D₃ e exposição solar nas cadelas fêmeas portadoras de neoplasia mamária (Teste Kruskal Wallis, $p=0,086$, $n=39$).

Não houve diferença significativa na comparação entre a concentração sérica de 25(OH)D₃ em relação ao comprimento do pelo (Figura 34). As concentrações séricas dos animais com pelos longos ($24,74 \pm 15,95$ ng/mL, $n=13$) e dos animais com pelos curtos ($27,55 \pm 13,56$ ng/mL, $n=26$) foram similares.

Figura 34 – Comparação entre concentração sérica de 25(OH)D₃ e comprimento dos pelos nas cadelas fêmeas portadoras de neoplasia mamária (Teste Kruskal Wallis, $p = 0,404$, $n = 39$).

Não houve diferença significativa na comparação entre a concentração sérica de 25(OH)D₃ em relação à cor do pelo (Figura 35). Os animais com pêlos malhados foram os que demonstraram menor concentração sérica de VD ($21,42 \pm 11,57$ ng/mL, $n = 7$), seguidos pelos animais de pelos escuros ($25,67 \pm 12,48$ ng/mL, $n = 18$) e os de pelos claros ($29,05 \pm 17,11$ ng/mL, $n = 13$).

Figura 35 – Comparação entre concentração sérica de 25(OH)D₃ e cor dos pelos nas cadelas fêmeas portadoras de neoplasia mamária (Teste Kruskal Wallis, $p = 0,580$, $n = 39$).

Não houve diferença significativa na comparação entre a concentração sérica de 25(OH)D₃ em relação aos tipos histológicos dos tumores mamários (Figura 36). No Quadro 12, podemos visualizar a estatística descritiva de cada tipo histológico.

Figura 36 – Comparação entre concentração sérica de 25(OH)D₃ e a histologia dos tumores de mama (Teste Kruskal Wallis, $p = 0,693$, $n = 39$).

Quadro 12 – Classificação da concentração sérica de 25(OH)D₃ nos animais portadores de tumor de mama em relação ao tipo histológico.

Tipo Histológico do Tumor	Número de Amostras	Média ± Desvio Padrão	Mediana
Neoplasia Benigna	6	24,58 ± 16,87	22,96
Carcinoma Complexo	8	26,69 ± 17,13	20,76
Carcinoma Simples	11	26,99 ± 14,32	25,08
Comedocarcinoma	1	18,45	
Carcinoma Sólido	2	40,91 ± 2,81	40,91
Carcinoma Misto	9	27,79 ± 13,02	27,86
Sarcoma	1	10,41	
Mastocitoma	1	19,36	

Separamos os tumores em três grupos, o primeiro com neoplasias benignas, o segundo com carcinomas com bom prognóstico (carcinoma complexo) e o terceiro com carcinoma com mau prognóstico (carcinoma simples, comedocarcinoma, carcinoma sólido e carcinoma misto) para comparação com a concentração sérica de 25(OH)D3. Não houve diferença significativa entre os três grupos (Figura 37).

Figura 37 – Comparação entre concentração sérica de 25(OH)D3 e a histologia dos tumores de mama (Teste Kruskal Wallis, $p=0,781$, $n=37$).

4.4 Expressões gênica e proteica de VDR

Foram avaliadas as expressões gênica (através de RT-qPCR) e proteica (através de imunoistoquímica) de VDR para determinar a presença desses receptores em tecidos normais e tumorais. É necessária a presença desse receptor no núcleo da célula para ocorrer ação da VD nos tratamentos das amostras em cultura.

Como citado no item Material e Métodos (Item X), para analisar e expressão gênica de VDR, foi utilizada a expressão relativa. Já para analisar a expressão proteica nuclear de VDR, as amostras foram classificadas pela pontuação (Item X de Material e Métodos), variando de 1 a 7 segundo a intensidade e porcentagem de células contadas, e classificadas segundo o padrão variando de I a III dependendo da localização da marcação do VDR (células epiteliais ou mioepiteliais).

4.4.1 Tecidos normais

Segundo a pontuação, foram realizadas reações de imunistoquímica em amostras de 44 cadelas, e a distribuição pode ser visualizada na Figura 38. Houve diferença significativa da distribuição, sendo que a maioria dos animais apresenta forte expressão proteica do receptor (nenhum animal apresentou a pontuação 1).

Figura 38 – Porcentagem de animais de acordo com a expressão proteica do VDR em amostras de glândulas mamárias normais distribuídas pela classificação em pontuações de 1 a 7 (Teste Chi-quadrado, $p=0,001$, $n=44$).

Segundo a classificação em três padrões, a expressão de VDR foi distribuída em 40 animais e pode ser visualizada na Figura 39. Analisando o resultado, percebemos que a maior concentração de marcação (85% dos casos) possui localização mista de células epiteliais e mioepiteliais, na mesma proporção (Padrão I) e essa diferença foi significativa.

Figura 39 – Expressão proteica do VDR em amostras de glândulas mamárias normais distribuídas pelos três padrões em comparação com a porcentagem de animais. O maior número de animais expressa marcação Padrão I, ou seja, marcação em células epiteliais e mioepiteliais (Teste Chi-quadrado, $p < 0,001$, $n = 40$).

As amostras foram comparadas entre as expressões gênicas e proteicas. Para analisar a expressão gênica, utilizamos a expressão relativa das amostras e para analisar a expressão proteica, utilizamos a pontuação (Figura 40).

Comparação entre as expressões gênica e proteica de VDR nos tecidos normais

Figura 40 – Expressão gênica do VDR em amostras de glândulas mamárias normais distribuídas pelas pontuações de 1 a 7 classificadas através da expressão proteica (Teste de Friedman, $p < 0,001$, $n = 41$).

Não houve correlação entre a expressão gênica e proteica de VDR nos tecidos normais (Figura 41).

Correlação entre as expressões gênica e proteica de VDR nos tecidos normais

Figura 41 – Correlação entre a expressão gênica do VDR em amostras de glândulas mamárias normais distribuídas pelas pontuações de 1 a 7 classificadas através da expressão proteica (Correlação de Pearson, $p = 0,239$, $r = 0,188$, $n = 41$).

Comparamos as amostras entre as expressões gênicas e proteicas (segundo os padrões), mas não houve diferença (Figura 42).

Figura 42 – Expressão gênica do VDR em amostras de glândulas mamárias normais distribuídas pelos padrões de I a III classificados através da expressão proteica (Teste de Friedman, $p=0,105$, $n=38$).

4.4.2 Tecidos tumorais

Segundo a pontuação, foram realizadas reações de imunoistoquímica em 60 cadelas, e a distribuição pode ser visualizada na Figura 43. Houve diferença significativa entre a distribuição, sendo que a maioria dos animais apresenta de baixa à intermediária expressão do receptor (nenhuma amostra demonstrou marcação da pontuação 1 ou 7, a maioria das amostras apresentou marcação de pontuação 4).

Distribuição dos animais segundo a pontuação da expressão proteica de VDR nos tecidos tumorais

Figura 43 – Porcentagem de animais de acordo com a expressão proteica do VDR em amostras de glândulas mamárias tumorais distribuídas pela classificação em pontuações de 1 a 7 (Teste Chi-quadrado, $p=0,038$, $n=60$).

Segundo a classificação em três padrões, a expressão de VDR foi avaliada em 49 animais e pode ser visualizada na Figura 44. Houve diferença significativa na distribuição, onde a maior porcentagem de animais (51% dos casos) apresenta marcação predominante nas células mioepiteliais (Padrão II), sendo que 33% apresentam marcação de Padrão I e 16% de Padrão III.

Distribuição dos animais segundo o padrão da expressão proteica de VDR nos tecidos tumorais

Figura 44 – Gráfico demonstrando a expressão proteica do VDR em amostras tumorais distribuídas pelos três padrões em comparação com a porcentagem de animais. O maior número de animais expressa marcação Padrão II, ou seja, marcação predominante em células mioepiteliais e rara marcação em células epiteliais (Teste de Chi-quadrado, $p=0,012$, $n=49$).

Foram comparadas a expressão gênica e proteica de VDR. Para analisar a expressão gênica, utilizamos a expressão relativa das amostras e para analisar a expressão proteica, utilizamos a pontuação (Figura 45).

Comparação entre as expressões gênica e proteica de VDR nos tecidos tumorais

Figura 45 – Expressão gênica do VDR em amostras de tumor de mama distribuídas pelas pontuações de 1 a 7 classificadas através da expressão proteica (Teste de Friedman, $p<0,001$, $n=56$).

Não houve correlação entre a expressão gênica e proteica de VDR nos tecidos tumorais (Figura 46).

Figura 46 – Correlação entre a expressão gênica do VDR em amostras de tumores de mama distribuídas pelas pontuações de 1 a 7 classificadas através da expressão proteica (Correlação de Pearson, $p=0,561$, $r=0,079$, $n=56$).

Comparamos as amostras entre as expressões gênicas e proteicas (segundo os padrões), mas não houve diferença (Figura 47).

Figura 47 – Expressão gênica do VDR em amostras de glândulas mamárias tumorais distribuídas pelos padrões de I a III classificados através da expressão proteica (Teste de Friedman, $p=0,180$, $n=45$).

A expressão proteica de VDR segundo os padrões demonstrou diferença entre os tipos histológicos de tumores mamários (Figura 48 e Quadro 13). As neoplasias benignas e os carcinomas simples apresentaram marcação de VDR padrão I predominante, os carcinomas complexos e os mistos apresentaram marcação de VDR padrão II predominante e o comedocarcinoma, carcinoma sólido e o sarcoma apresentaram padrão III (mas esses três tipos tinham apenas uma amostra cada).

Expressão proteica de VDR classificada em padrões em relação ao tipo histológico dos tumores mamários

Figura 48 – Comparação entre a expressão proteica do VDR classificada nos padrões I, II e III em relação aos tipos histológicos dos tumores de mama (Teste Chi-quadrado de Pearson, $p=0,012$, $n=49$).

Quadro 13 – Frequência da expressão proteica do VDR classificada nos padrões I, II e III em relação aos tipos histológicos dos tumores de mama ($n=49$).

Tipos Histológicos	Padrão I	Padrão II	Padrão III	Total
Neoplasia Benigna	3 (18,8%)	2 (8%)	0 (0%)	5 (10,2%)
Carcinoma Complexo	4 (25%)	11 (44%)	1 (12,5%)	16 (32,7%)
Carcinoma Simples	6 (37,5%)	4 (16%)	4 (50%)	14 (28,6%)
Comedo carcinoma	0 (0%)	0 (0%)	1 (12,5%)	1 (2%)
Carcinoma Sólido	0 (0%)	0 (0%)	1 (12,5%)	1 (2%)
Carcinoma Misto	3 (18,8%)	8 (32%)	0 (0%)	11 (22,4%)
Sarcoma	0 (0%)	0 (0%)	1 (12,5%)	1 (2%)
Total	16 (100%)	25 (100%)	8 (100%)	49 (100%)

A expressão proteica de VDR segundo os padrões não demonstrou diferença quando comparados apenas com os tumores benignos e os carcinomas (Figura 49 e Quadro 14). Os carcinomas de bom prognóstico (complexo) e os de mau prognóstico (simples, sólido, misto e comedocarcinoma) apresentaram uma distribuição semelhante, predominando o padrão II.

Figura 49 – Comparação entre a expressão proteica do VDR classificada nos padrões I, II e III em relação aos tumores mamários benignos e os carcinomas (Teste Chi-quadrado de Pearson, $p=0,261$, $n=48$).

Quadro 14 – Frequência da expressão proteica do VDR classificada nos padrões I, II e III em relação tumores mamários benignos e os carcinomas ($n=48$).

Tipos Histológicos	Padrão I	Padrão II	Padrão III	Total
Neoplasia Benigna	3 (18,8%)	2 (8%)	0 (0%)	5 (10,4%)
Carcinoma Complexo	4 (25%)	11 (44%)	1 (14,3%)	16 (33,3%)
Carcinoma Simples	9 (56,2%)	12 (48%)	6 (85,7%)	27 (56,2%)
Total	16 (100%)	25 (100%)	7 (100%)	48 (100%)

4.4.3 Comparação entre tecidos normais e tumorais

Comparamos a expressão gênica de VDR entre as amostras normais e tumorais e verificou-se que não houve diferença (Figura 50).

Figura 50 – Expressão gênica de VDR em amostras de glândulas mamárias normais e tumorais (Teste de Friedman, $p=0,647$, $n=43$).

Comparamos a expressão proteica de VDR entre as amostras normais e tumorais. Segundo a pontuação, a distribuição pode ser visualizada na Figura 51. Podemos perceber que as amostras de glândulas mamárias normais possuem maior expressão (maior pontuação) que as amostras tumorais. Comparando a expressão proteica entre as amostras normais e tumorais (pelas pontuações), houve diferença significativa.

Comparação da expressão proteica de VDR entre as amostras normais e tumorais

Figura 51 – Expressão proteica de VDR em amostras de glândulas mamárias normais e tumorais distribuídas pela classificação em pontuações de 1 a 7 em comparação com a porcentagem de animais ($p < 0,001$, Teste de Friedman, $n = 43$).

Segundo a classificação em três padrões de expressão de VDR, há diferença significativa entre a distribuição dos padrões nos tecidos mamários normais e tumorais (Figura 52). Analisando o resultado, percebemos que as amostras normais possuem maior concentração de expressão de Padrão I (85% - 34/40) e as amostras tumorais possuem maior concentração de marcação nas células mioepiteliais (Padrão II – 51% - 25/49), sendo que 33% (16/49) apresentam marcação de Padrão I e 16% (8/49) de Padrão III. Ou seja, aparentemente no tecido mamário normal a maior marcação de VDR se localiza tanto nas células epiteliais quanto nas mioepiteliais, enquanto que nas amostras tumorais, aparentemente a marcação é predominante em células mioepiteliais.

Comparação entre os padrões de VDR nos tecidos normais e tumorais

Figura 52 – Expressão proteica do VDR em amostras de glândulas mamárias normais e tumorais distribuídas pelos padrões I (marcação mista), II (marcação predominante em células mioepiteliais) e III (marcação predominante em células epiteliais) em comparação com a porcentagem de animais (Teste de Friedman, $p < 0,001$, $n = 34$).

4.5 Cultura de Tecidos e Tratamento com Vitamina D

Das 70 cadelas, foram coletadas amostras de tecidos mamários de apenas 68 cadelas. Duas cadelas possuíam tumor de mama muito pequenos (cadela 30 e cadela 31), o que impossibilitava a divisão da amostra para cultura. Portanto, foram coletados apenas amostra sanguínea para análise da concentração sérica de VD.

As 68 amostras de tecidos mamários normais e tumorais foram seccionadas, submetidas em cultura e tratadas com VD ou etanol por um período de 48 horas. Após análise das lâminas coradas com HE, observou-se que os tecidos estavam entrando em necrose. Decidiu-se manter o tecido em cultura por 24 horas, pois estudos de nosso grupo indicam boa preservação do tecido durante esse tempo de cultura (Figuras 53 – 56).

Figura 53 – Fatias de tecidos de glândulas mamárias normais (cadela 4) após cultura primária e tratamento com 0,228nM de calcitriol **(A)**, 100nM de calcitriol **(B)** e o veículo etanol **(C)** por 48 horas. Lâminas coradas por Hematoxilina e Eosina (HE). Aumento 20x.

Figura 54 – Fatias de tecidos de tumores mamários (cadela 4) após cultura primária e tratamento com 2nM de calcitriol **(A)**, 100nM de calcitriol **(B)** e o veículo etanol **(C)** por 48 horas. Lâminas coradas por Hematoxilina e Eosina (HE). Aumento 20x.

Figura 55 – Fatias de tecidos de glândulas mamárias normais (cadela 36) após cultura primária e tratamento com 0,228nM de calcitriol **(A)**, 100nM de calcitriol **(B)** e o veículo etanol **(C)** por 24 horas. Lâminas coradas por Hematoxilina e Eosina (HE). Aumento 20x.

Figura 56 – Fatias de tecidos de tumores mamários (cadela 35) após cultura primária e tratamento com 2nM de calcitriol **(A)**, 100nM de calcitriol **(B)** e o veículo etanol **(C)** por 24 horas. Lâminas coradas por Hematoxilina e Eosina (HE). Aumento 20x.

Após o término deste período de cultivo, as fatias foram retiradas do meio de cultura e divididas em duas partes. A primeira foi armazenada em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA e a segunda parte foi armazenada em formol tamponado para realização do exame de imunoistoquímica. Cinco das 68 amostras foram congeladas em freezer comum para avaliação do conteúdo de VD tecidual por CLAE (cadela 3, 8, 9, 10 e 28) e quatro das 68 amostras (cadela 1, 2, 3 e 4) foram utilizadas apenas para padronização dos procedimentos (transporte dos tecidos, cultura e tratamento de tecidos, CLAE e reações moleculares).

4.6 Concentração tecidual de vitamina D

Avaliamos o conteúdo tecidual de VD por CLAE em cinco amostras (cadela 3, 8, 9, 10 e 28), sendo que duas amostras foram utilizadas para padronização da reação (cadela 3 e 8), três amostras para dosagem de vitamina D₃ tecidual (cadela 9, 10 e 28) e apenas duas amostras para dosagem de vitamina D₂ tecidual (cadela 9 e 10).

A concentração de vitamina D₃, tanto nos tecidos normais quanto nos tumorais, elevou-se após o tratamento *in vitro* com calcitriol (Figura 57). As concentrações de vitamina D₃ nos tecidos normais e tumorais estão descritas no Quadro 15.

Legenda: C = Cadela; N = Tecido não tumoral; T = Tecido tumoral

Figura 57 – Concentração de Vitamina D₃ tecidual. Comparando o grupo tratado com etanol e o grupo tratado com calcitriol a 100 nM (C9N, C9T, C10N, C10T, C28N e C28T), observou-se um aumento da concentração tecidual de vitamina D₃ significativo ($p=0,028$ – Teste de Wilcoxon).

Quadro 15 – Determinação da concentração de vitamina D₃ tecidual nas cadelas 9, 10 e 28.

Amostra		Tratamento	Massa (g)	Área D ₃	[D ₃] nmol/g
Cadela 9	Normal	Etanol (controle)	0,3820	2446,6	0,038
		Calcitriol 0,228 nM	0,4047	4429,2	0,072
		Calcitriol 100 nM	0,3187	9079,0	0,201
	Tumor	Etanol (controle)	0,4347	8215,3	0,132
		Calcitriol 2 nM	0,4608	14598,5	0,228
		Calcitriol 100 nM	0,5253	17361,6	0,240
Cadela 10	Normal	Etanol (controle)	0,5293	2239,0	0,036
		Calcitriol 0,228 nM	0,7884	4917,6	0,042
		Calcitriol 100 nM	0,5886	3430,6	0,043
	Tumor	Etanol (controle)	0,5688	2538,2	0,036
		Calcitriol 2 nM	0,4450	2741,2	0,049
		Calcitriol 100 nM	0,5925	3335,4	0,042
Cadela 28	Normal	Etanol (controle)	0,5525	5701,5	0,094
		Calcitriol 0,228 nM	0,4923	5676,0	0,105
		Calcitriol 100 nM	0,4343	10429,0	0,218
	Tumor	Etanol (controle)	0,6952	9129,5	0,119
		Calcitriol 2 nM	0,4080	11582,0	0,258
		Calcitriol 100 nM	0,6079	18894,0	0,283

Quanto à concentração de vitamina D₂ tecidual, não foi observada variação, embora na amostra tumoral da cadela 10 haja uma tendência a aumento (Figura 58). As concentrações de vitamina D₂ nos tecidos normais e tumorais estão descritas no Quadro 16.

Legenda: C = Cadela; N = Tecido não tumoral; T = Tecido tumoral

Figura 58 – Concentração de Vitamina D₂ tecidual.

Quadro 16 – Determinação da concentração de vitamina D₂ tecidual nas cadelas 9 e 10.

Amostra		Tratamento	Massa (g)	Área D ₂	[D ₂] nmol/g
Cadela 9	Normal	Etanol (controle)	0,3820	22289,9	0,472
		Calcitriol 0,228 nM	0,4047	17767,5	0,346
		Calcitriol 100 nM	0,3187	14231,2	0,340
	Tumor	Etanol (controle)	0,4347	13838,9	0,241
		Calcitriol 2 nM	0,4608	19553,0	0,338
		Calcitriol 100 nM	0,5253	12335,7	0,174
Cadela 10	Normal	Etanol (controle)	0,5293	34399,5	0,545
		Calcitriol 0,228 nM	0,7884	48840,2	0,529
		Calcitriol 100 nM	0,5886	35832,6	0,512
	Tumor	Etanol (controle)	0,5688	46442,7	0,696
		Calcitriol 2 nM	0,4450	40177,4	0,764
		Calcitriol 100 nM	0,5925	55434,4	0,804

4.7 Expressão de genes do metabolismo da vitamina D (*CYP24A1* e *CYP27B1*)

Foi avaliada a expressão gênica (através de RT-qPCR) de *CYP24A1* e *CYP27B1* nos tecidos normais e tumorais para analisar se ocorria diferença de expressão em decorrência do tratamento. A indução desses genes demonstraria que a via da VD estaria ativa em células viáveis.

4.7.1 Tecidos normais

Comparamos a expressão de *CYP24A1* em relação ao tratamento e houve indução do gene após o tratamento com calcitriol de 27 vezes no tratamento de 0,228nM de VD e de 158 vezes no tratamento com 100nM de VD (Figura 59). Fizemos a comparação então entre cada tratamento separadamente e também ocorreu diferença entre o tratamento 0,228nM e o controle, entre o tratamento 100nM e o controle, e entre os tratamentos de 0,228nM e 100nM (Teste de Wilcoxon, $p < 0,001$, $n = 40$).

Expressão gênica de CYP24A1 nos tecidos normais em relação aos tratamentos realizados em cultura

Figura 59 – Comparação da expressão gênica relativa do *CYP24A1* segundo os tratamentos em amostras de glândulas mamárias normais (Teste Friedman, $p < 0,001$, $n = 40$).

Analizamos a expressão de *CYP27B1*, não houve ocorrência indução do gene (Figura 60).

Expressão gênica de CYP27B1 nos tecidos normais em relação aos tratamentos realizados em cultura

Figura 60 – Comparação da expressão gênica relativa do *CYP27B1* segundo os tratamentos, em amostras de glândulas mamárias normais (Teste de Friedman, $p = 0,592$, $n = 40$).

4.7.2 Tecidos tumorais

Comparamos a expressão gênica relativa de *CYP24A1* entre todos os tratamentos realizados em cultura e houve indução do gene após o tratamento com calcitriol de 36 vezes no tratamento com 2nM de VD e de 102 vezes no tratamento de 100nM de VD (Figura 61). Comparamos então a expressão gênica de *CYP24A1* entre cada um dos tratamentos e o controle etanol, e entre os tratamentos com menor e maior concentração de VD, e todas as análises foram significativas (Teste de Wilcoxon, $p < 0,001$, $n = 45$).

Figura 61 – Comparação da expressão gênica relativa de *CYP24A1* segundo os tratamentos, em amostras de glândulas mamárias tumorais (Teste Friedman, $p < 0,001$, $n = 45$).

Analisamos a expressão de *CYP27B1* e apesar de parecer que há um aumento na expressão no tratamento de 2nM em relação ao grupo controle, não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos realizados (Figura 62).

Figura 62 – Comparação da expressão gênica relativa de *CYP27B1* segundo os tratamentos, em amostras de glândulas mamárias tumorais (Teste de Friedman, $p=0,165$, $n=45$).

4.7.3 Comparação entre tecidos normais e tumorais

Houve diferença significativa na comparação entre a expressão gênica de *CYP24A1* entre as amostras normais e tumorais (Figura 63).

Figura 63 – Expressão gênica de *CYP24A1* das amostras normais e amostras tumorais entre todos os tratamentos em cultura (Teste de Friedman, $p < 0,001$, $n = 34$).

Comparamos então a expressão gênica de *CYP24A1* entre os tratamentos e não apresentou diferença significativa entre amostra normal tratada com 0,228nM ante amostra tumoral tratada com 2nM (Teste de Wilcoxon, $p = 0,089$, $n = 34$) e nem entre a amostra normal tratada com 100 nM ante amostra tumoral tratada com 100 nM (Teste de Wilcoxon, $p = 0,663$, $n = 34$), mas apresentou diferença significativa entre a amostra normal tratada com etanol ante amostra tumoral tratada com etanol (Teste de Wilcoxon, $p = 0,048$, $n = 34$). A mediana de expressão relativa gênica de *CYP24A1* do grupo controle (etanol) nos tecidos normais foi de 0,15 e nos tecidos tumorais foi de 0,11, mostrando que essa diferença era muito suave.

Não houve diferença significativa na comparação da expressão de *CYP27B1* entre as amostras normais e tumorais (Figura 64).

Comparação da expressão gênica de CYP27B1 entre os tecidos normais e tumorais nos diferentes tratamentos utilizados em cultura

Figura 64 – Gráfico comparando a expressão gênica de *CYP27B1* das amostras normais e tumorais considerando todos os tratamentos em cultura (Teste de Friedman, $p=0,310$, $n=34$).

4.8 Expressão de genes candidatos (*CDKN1A*, *CDKN1B* e *CD14*)

Foi avaliada a expressão gênica (através de RT-qPCR) de *CDKN1A*, *CDKN1B* e *CD14* nos tecidos normais e tumorais para analisar a expressão em decorrência do tratamento.

4.8.1 Tecidos normais

Analisando a expressão gênica de *CDKN1A*, *CDKN1B* e *CD14*, não houve indução dos genes nos tratamentos (Figura 65 – 67).

Figura 65 – Comparação da expressão gênica relativa do *CDKN1A* (p21) segundo os tratamentos, em amostras de glândulas mamárias normais (Teste de Friedman, $p=0,535$, $n=40$).

Figura 66 – Comparação da expressão gênica relativa do *CDKN1B* (p27) segundo os tratamentos, em amostras de glândulas mamárias normais (Teste de Friedman, $p=0,187$, $n=40$).

Figura 67 – Comparação da expressão gênica relativa do *CD14* segundo os tratamentos, em amostras de glândulas mamárias normais (Teste de Friedman, $p=0,273$, $n=40$).

4.8.2 Tecidos tumorais

Analisando a expressão de *CDKN1A*, *CDKN1B* e *CD14*, não houve indução dos genes nos tratamentos com calcitriol e etanol realizados em cultura. (Figura 68 – 70).

Figura 68 – Comparação da expressão gênica relativa do *CDKN1A* (p21) segundo os tratamentos, em amostras tumorais (Teste de Friedman, $p=0,853$, $n=44$).

Figura 69 – Comparação da expressão gênica relativa do *CDKN1B* (p27) segundo os tratamentos, em amostras tumorais (Teste de Friedman, $p=0,239$, $n=44$).

Figura 70 – Comparação da expressão gênica relativa do *CD14* segundo os tratamentos, em amostras tumorais (Teste de Friedman, $p=0,218$, $n=44$).

4.8.3 Comparação entre tecidos normais e tumorais

Comparamos a seguir a expressão relativa dos três genes entre as amostras normais e tumorais.

No caso do gene *CDKN1A*, houve diferença entre os tratamentos nos tecidos normais e tumorais (Figura 71). Quando comparamos a expressão gênica de *CDKN1A* nos tecidos normais e tumorais em relação a cada tratamento, todas as análises foram significativas: tratamento controle (etanol) entre os tecidos normais e tumorais (Teste de Wilcoxon, $p=0,006$, $n=34$); tratamento de 0,228nM das amostras normais com 2nM das amostras tumorais (Teste de Wilcoxon, $p=0,038$, $n=34$); tratamento de 100nM entre os tecidos normais e tumorais (Teste de Wilcoxon, $p=0,011$, $n=34$).

Figura 71 – Comparação da expressão proteica de *CDKN1A* (p21) realizada através da reação de imunohistoquímica em amostras de glândulas mamárias normais e tumorais (Teste de Friedman, $p=0,001$, $n=34$).

No caso do gene *CDKN1B*, houve diferença entre os tratamentos nos tecidos normais e tumorais (Figura 72). Quando comparamos a expressão gênica de *CDKN1B* nos tecidos normais e tumorais em relação a cada tratamento, apenas as análises que foram tratadas com VD apresentaram diferenças significativas, o controle (etanol) não apresentou diferença entre os tratamentos: tratamento controle (etanol) entre os tecidos normais e tumorais (Teste de Wilcoxon, $p=0,379$, $n=34$); tratamento de 0,228nM das amostras normais com 2nM das amostras tumorais (Teste de Wilcoxon, $p=0,003$, $n=34$); tratamento de 100nM entre os tecidos normais e tumorais (Teste de Wilcoxon, $p=0,026$, $n=34$).

Figura 72 – Comparação da expressão proteica de *CDKN1B* (p27) realizada através da reação de imunistoquímica em amostras de glândulas mamárias normais e tumorais (Teste de Friedman, $p=0,011$, $n=34$).

No caso do gene *CD14*, não houve diferença entre os tratamentos nos tecidos normais e tumorais (Figura 73).

Figura 73 – Comparação da expressão proteica de *CD14* realizada através da reação de imunistoquímica em amostras de glândulas mamárias normais e tumorais (Teste de Friedman, $p=0,584$, $n=34$).

4.9 Análise da proliferação (expressão protéica de Ki-67)

Foi avaliada a proliferação das células através da expressão proteica de Ki-67 (por imunohistoquímica) nas amostras normais e tumorais para analisar se ocorria diferença de expressão em decorrência do tratamento. Para quantificar a expressão, foram contadas as células positivas para cada 1000 células contadas por amostra (1000 células considerando as células positivas e negativas). Separamos a análise em amostras normais e tumorais, e depois comparamos as normais com as tumorais.

4.9.1 Tecidos normais

A Figura 74 exemplifica a imunomarcação de Ki-67 nos três tratamentos utilizados (VD a 0,228nM, VD a 100nM e o controle etanol).

Figura 74 – Expressão proteica de Ki-67 em amostras normais submetidas à cultura de tecidos (cadela 65). **(A)** Tratamento com 0,228nM de VD **(B)** Tratamento com 100nM de VD **(C)** Tratamento com o controle etanol. Aumento de 20X.

Não houve diferença significativa da expressão proteica de Ki-67 em relação ao tratamento (Figura 75).

Figura 75 – Comparação da expressão proteica de Ki-67 representada em porcentagem (células positivas em 1000 células tumorais) realizada através da reação de imunoistoquímica em amostras de glândulas mamárias normais (Teste de Friedman, $p=0,311$, $n=42$).

Separamos as amostras entre as que responderam ao tratamento e as que não responderam. Para isso, consideramos como resposta as que diminuíram a expressão proteica de Ki-67 em mais de 25%, comparando o tratamento com VD com o controle etanol. Após essa divisão, separamos as amostras entre os padrões de marcação de VDR, para saber se a resposta estava associada ao tratamento de 0,228nM de VD (Quadro 17) e de 100nM de VD (Quadro 18), mas observamos que o Padrão de VDR (I, II e III) não se associou a queda de Ki-67 (resposta ao tratamento).

Quadro 17 – Classificação das amostras normais quanto à resposta ao tratamento de 0,228nM de VD na expressão proteica de Ki-67 em relação ao padrão de marcação de VDR (Teste Chi-quadrado de Pearson, $p=0,329$, $n=39$).

	Resposta	Não Resposta	Total
Padrão I	16 (48,5%)	17 (51,5%)	33 (100%)
Padrão II	1 (20%)	4 (80%)	5 (100%)
Padrão III	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)
Total	17 (43,6%)	22 (56,4%)	39 (100%)

Quadro 18 – Classificação das amostras normais quanto à resposta ao tratamento de 100nM de VD na expressão proteica de Ki-67 em relação ao padrão de marcação de VDR (Teste Chi-quadrado de Pearson, $p=0,715$, $n=38$).

	Resposta	Não Resposta	Total
Padrão I	13 (40,6%)	19 (59,4%)	32 (100%)
Padrão II	2 (40%)	3 (60%)	5 (100%)
Padrão III	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)
Total	15 (39,5%)	23 (60,5%)	38 (100%)

4.9.2 Tecidos tumorais

A Figura 76 exemplifica a imunomarcagem de Ki-67 nos três tratamentos utilizados (VD a 2nM, VD a 100nM e o controle etanol).

Figura 76 – Expressão proteica de Ki-67 em amostras tumorais submetidas à cultura de tecidos (cadela 68). **(A)** Tratamento com 2nM de VD **(B)** Tratamento com 100nM de VD **(C)** Tratamento com o controle etanol. Aumento de 20X.

Houve diferença significativa na comparação da expressão proteica de Ki-67 em relação aos tratamentos utilizados em cultura (Figura 77). Comparando cada concentração utilizada de VD com o etanol, houve diferença significativa entre os tratamentos 2nM e o controle etanol (Teste de Wilcoxon, $p=0,033$, $n=47$) e 100nM e o controle etanol (Teste de Wilcoxon, $p=0,009$, $n=47$).

Figura 77 – Comparação da expressão proteica de Ki-67 representada em porcentagem (células positivas em 1000 células tumorais) realizada através da reação de imunohistoquímica em amostras de tumores mamários (Teste de Friedman, $p=0,002$, $n=47$).

Separamos as amostras entre as que responderam ao tratamento e as que não responderam. Para isso, consideramos como resposta as que diminuíram a expressão proteica de Ki-67 em até 25%, comparando o tratamento com VD com o controle etanol. Após essa divisão, separamos as amostras entre os padrões de marcação de VDR, para saber se a resposta estava associada ao tratamento de 2nM de VD (Quadro 19) e de 100nM de VD (Quadro 20). Não observamos associação entre padrão de VDR (I, II e III) e redução da proliferação (resposta aos tratamentos).

Quadro 19 – Classificação das amostras tumorais quanto à resposta ao tratamento de 2nM de VD na expressão proteica de Ki-67 em relação ao padrão de marcação de VDR (Teste Chi-quadrado de Pearson, $p=0,886$, $n=41$).

	Resposta	Não Resposta	Total
Padrão I	7 (53,8%)	6 (46,2%)	13 (100%)
Padrão II	10 (47,6%)	11 (52,4%)	21 (100%)
Padrão III	4 (57,1%)	3 (42,9%)	7 (100%)
Total	21 (51,2%)	20 (48,8%)	41 (100%)

Quadro 20 – Classificação das amostras tumorais quanto à resposta ao tratamento de 100nM de VD na expressão proteica de Ki-67 em relação ao padrão de marcação de VDR (Teste Chi-quadrado de Pearson, $p=0,974$, $n=41$).

	Resposta	Não Resposta	Total
Padrão I	8 (61,5%)	5 (38,5%)	13 (100%)
Padrão II	13 (61,9%)	8 (38,1%)	21 (100%)
Padrão III	4 (57,1%)	3 (42,9%)	7 (100%)
Total	25 (61%)	16 (39%)	41 (100%)

4.9.3 Comparação entre tecidos normais e tumorais

Analisando a expressão de Ki-67 entre as amostras normais e tumorais, houve diferença significativa entre os tratamentos realizados em cultura (Figura 78).

Figura 78 – Comparação da expressão proteica de Ki-67 representada em porcentagem (células positivas em 1000 células tumorais) realizada através da reação de imunoistoquímica em amostras de glândulas mamárias normais e tumorais (Teste de Friedman, $p=0,018$, $n=35$).

Segundo o teste Wilcoxon, as amostras não apresentaram diferença significativa quando comparadas entre si: amostra normal tratada com 0,228nM versus amostra tumoral tratada com 2nM ($p=0,077$, $n=35$); amostra normal tratada com etanol versus amostra tumoral tratada com etanol ($p=0,112$, $n=35$); amostra normal tratada com 100 nM versus amostra tumoral tratada com 100 nM ($p=0,287$, $n=35$).

4.10 Análise de apoptose (expressão proteica de caspase-3 clivada)

Foi avaliada a apoptose das células através da expressão proteica de CASP3 clivada (por imunoistoquímica) nas amostras normais e tumorais para analisar se ocorria diferença de expressão em decorrência do tratamento. Para analisar as reações de imunistoquímica, as amostras foram classificadas pela pontuação (Item X de Material e Métodos), variando de 1 a 7 pontos segundo a intensidade e porcentagem de células contadas.

4.10.1 Tecidos normais

A Figura 79 exemplifica a imunomarcção de CASP3 nos três tratamentos utilizados (VD a 0,228nM, VD a 100nM e o controle etanol).

Figura 79 – Expressão proteica de CASP3 em amostras normais da Cadela 33 submetidas à cultura de tecidos. **(A)** Tratamento com o controle etanol **(B)** Tratamento com 0,228nM de VD **(C)** Tratamento com 100nM de VD. Aumento de 40X.

Segundo o teste Friedman, as amostras não demonstraram diferença significativa em relação à expressão (Figura 80).

Figura 80 – Expressão proteica de CASP3 (representada pela pontuação) realizada através da reação de imunistoquímica em amostras de glândulas mamárias normais (Teste de Friedman, $p=0,247$, $n=41$).

Separamos as amostras entre as que responderam ao tratamento e as que não responderam. Para isso, consideramos como resposta as que aumentaram a expressão proteica de CASP3 em até 25%, comparando o tratamento com VD com o controle etanol. Após essa divisão, separamos as amostras entre os padrões de marcação de VDR, para saber se a resposta estava associada ao tratamento de 0,228nM de VD (Quadro 21) e de 100nM de VD (Quadro 22).

Quadro 21 – Classificação das amostras normais quanto à resposta ao tratamento de 0,228nM de VD na expressão proteica de CASP3 em relação ao padrão de marcação de VDR (Teste Chi-quadrado de Pearson, $p=0,067$, $n=38$).

	Resposta	Não Resposta	Total
Padrão I	5 (15,6%)	27 (84,4%)	32 (100%)
Padrão II	2 (40%)	3 (60%)	5 (100%)
Padrão III	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)
Total	8 (43,6%)	30 (56,4%)	38 (100%)

Quadro 22 – Classificação das amostras normais quanto à resposta ao tratamento de 100nM de VD na expressão proteica de CASP3 em relação ao padrão de marcação de VDR (Teste Chi-quadrado de Pearson, $p=0,008$, $n=38$).

	Resposta	Não Resposta	Total
Padrão I	2 (6,2%)	30 (93,8%)	32 (100%)
Padrão II	1 (20%)	4 (80%)	5 (100%)
Padrão III	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)
Total	4 (10,5%)	34 (89,5%)	38 (100%)

4.10.2 Tecidos tumorais

A Figura 81 exemplifica a imunomarcação de CASP3 nos três tratamentos utilizados (VD a 2nM, VD a 100nM e o controle etanol).

Figura 81 – Expressão proteica de CASP3 em amostras tumorais da cadela 29 submetidas à cultura de tecidos. **(A)** Tratamento com o controle etanol **(B)** Tratamento com 2nM de VD **(C)** Tratamento com 100nM de VD. Aumento de 20X.

Segundo o teste Friedman, a expressão proteica de CASP3 não demonstrou diferença significativa em relação ao tratamento (Figura 82).

Figura 82 – Expressão proteica de CASP3 (representada pela pontuação) realizada através da reação de imunoistoquímica em amostras de glândulas mamárias tumorais (Teste de Friedman, $p=0,310$, $n=60$).

Separamos as amostras entre as que responderam ao tratamento e as que não responderam. Para isso, consideramos como resposta as que aumentaram a expressão proteica de CASP3 em até 25%, comparando o tratamento com VD com o controle etanol. Após essa divisão, separamos as amostras entre os padrões de marcação de VDR, para saber se a resposta estava associada ao tratamento de 2nM de VD (Quadro 23) e de 100nM de VD (Quadro 24).

Quadro 23 – Classificação das amostras tumorais quanto à resposta ao tratamento de 2nM de VD na expressão proteica de CASP3 em relação ao padrão de marcação de VDR (Teste Chi-quadrado de Pearson, $p=0,404$, $n=49$).

	Resposta	Não Resposta	Total
Padrão I	2 (12,5%)	14 (87,5%)	16 (100%)
Padrão II	7 (28%)	18 (72%)	25 (100%)
Padrão III	1 (12,5%)	7 (87,5%)	8 (100%)
Total	10 (20,4%)	39 (79,6%)	49 (100%)

Quadro 24 – Classificação das amostras tumorais quanto à resposta ao tratamento de 100nM de VD na expressão proteica de CASP3 em relação ao padrão de marcação de VDR (Teste Chi-quadrado de Pearson, $p=0,997$, $n=49$).

	Resposta	Não Resposta	Total
Padrão I	4 (25%)	12 (75%)	16 (100%)
Padrão II	6 (24%)	19 (76%)	25 (100%)
Padrão III	2 (25%)	6 (75%)	8 (100%)
Total	12 (24,5%)	37 (75,5%)	49 (100%)

4.10.3 Comparação entre tecidos normais e tumorais

Analisando a expressão de CASP3, não houve diferença significativa entre as amostras normais e tumorais (Figura 83).

Figura 83 – Comparação da expressão proteica de CASP3 realizada através da reação de imunoistoquímica representada pela pontuação em amostras de glândulas mamárias normais e tumorais (Teste de Friedman, $p=0,599$, $n=41$).

5. DISCUSSÃO

Alguns estudos demonstram uma menor concentração sérica de VD em mulheres com câncer de mama em relação a mulheres sem câncer (Lowe *et al.*, 2005; Bertone-Johnson *et al.*, 2005; Lyra *et al.*, 2006), e duas recentes meta-análises indicam uma tendência a menor risco de desenvolver câncer de mama associada a uma maior concentração sérica de 25(OH)D₃ (Yin *et al.*, 2010; Gandini *et al.*, 2011). Além disso, um estudo envolvendo 310 mulheres observou que menor concentração sérica de 25(OH)D₃ relaciona-se com aumento do risco de recorrência de câncer de mama e com um prognóstico nos tumores do subtipo luminal (Kim *et al.*, 2011).

De modo similar, na espécie canina, em um recente estudo com 87 Labradores Retrievers, relata-se menor concentração sérica de 25(OH)D₃ em 33 deles que possuíam mastocitoma em relação ao grupo controle, composto por 54 animais saudáveis (Wakshlag *et al.*, 2011). No presente estudo, comparou-se a concentração sérica de 25(OH)D₃ entre cadelas portadoras de tumor de mama e cães não portadores de tumores mamários (machos e fêmeas), mas não foi encontrada diferença significativa que indicasse a relação da concentração sérica de 25(OH)D₃ na carcinogênese mamária. Esse é o primeiro estudo que compara a concentração sérica de 25(OH)D₃ em cadelas com tumor de mama.

Em relação ao sexo (somente do grupo controle), os machos apresentaram concentração sérica de 25(OH)D₃ significativamente maior em relação às fêmeas. Essa diferença de concentração em relação ao sexo foi citada por outros autores (Tran *et al.*, 2007), onde também foi encontrada uma maior concentração sérica de VD nos machos. Esse fato pode ser importante para a fabricação de rações comerciais; talvez haja a necessidade de uma formulação específica para as fêmeas, contendo um maior conteúdo de VD por kg de ração.

Em seres humanos, há correlação inversa entre a concentração sérica de 25(OH)D₃ e a idade. Uma das explicações para isso é que, conforme as pessoas envelhecem, diminui a quantidade de precursores de VD na pele e, portanto, a síntese cutânea, que é a principal fonte para aquisição de VD nos seres humanos, também se torna prejudicada. Outra explicação para esse fato é que a VD também diminui em mulheres após a menopausa, sendo necessária a suplementação de VD e de cálcio para evitar a osteoporose (Lyra et al., 2006; Maeda et al., 2010).

A comparação entre a concentração sérica de 25(OH)D₃ e a idade não demonstrou correlação significativa entre animais com e sem tumor, provavelmente pela heterogeneidade das amostras coletadas. As amostras dos animais sadios foram provenientes de campanhas de castração (animais mais jovens) e as cadelas com neoplasias mamárias normalmente apresentam uma idade mais avançada. Mas quando essa comparação foi realizada somente entre os animais com tumor, houve uma correlação inversa significativa, demonstrando que a concentração de VD sérica era menor em pacientes idosas. Também no estudo dos 87 Labradores Retrievers, onde alguns eram portadores de mastocitomas, a concentração sérica de 25(OH)D₃ apresentou tendência a correlação inversa com a idade, mas essa análise não foi significativa (Wakshlag et al., 2011).

Comparamos a concentração sérica de 25(OH)D₃ e a dieta. Não houve correlação da quantidade de VD ingerida pelos animais e a concentração sérica de 25(OH)D₃, provavelmente porque não foi possível determinar exatamente quanto cada animal ingeria de cada alimento caseiro, e nos casos dos animais que se alimentavam de ração e comida caseira, qual a proporção e quantidade que os proprietários davam de cada um. Wakshlag e colaboradores (2011) tentaram comparar a dieta com a concentração sérica de 25(OH)D₃, e também não acharam correlação. Uma das explicações que usaram e que também pode se adequar ao presente estudo é que os cálculos de ingestão de VD pode não ser precisa, pois muitos fabricantes de rações comerciais não têm todos os seus compostos analisados em relação ao teor

de VD e só fornecem informações baseadas na VD (colecalfiferol) que foram suplementadas à ração. Em outro recente estudo pesquisou-se a quantidade de vitaminas e minerais em 95 rações comerciais na Alemanha e observou-se que muitas rações possuíam uma quantidade de VD inferior à dose mínima recomendada, e que as rações que possuíam baixa concentração de VD geralmente não incluíam fígado ou óleo de fígado de bacalhau na sua composição (Dillitzer et al., 2011).

Entretanto, em nosso estudo um resultado interessante foi observado em relação ao nível sérico de 25(OH)D₃ e o tipo de dieta em todos os animais. No caso do grupo controle, os animais que se alimentavam apenas de ração, apresentavam uma concentração sérica de 25(OH)D₃ maior dos que os que comiam comida caseira combinada com ração. Essa diferença foi significativa nas fêmeas mas nos machos foi apenas sugestiva (apesar da concentração média de 25(OH)D₃ em machos que comiam apenas ração ser mais alta, o número de animais em cada grupo era muito pequeno). Nas cadelas do grupo tumor, aquelas que se alimentavam de comida caseira combinada com ração ou aquelas que recebiam apenas ração possuíam concentração sérica de 25(OH)D₃ semelhantes, mas as que se alimentavam apenas de comida caseira apresentaram tendência a uma concentração menor, apesar dessa diferença não ser significativa. Observou-se que os rótulos das rações apresentavam quantidade de VD variável entre 460 a 5000 UI por kg (de ração) e sabe-se que dentre os alimentos caseiros que mais contêm VD estão os peixes, ovos e leites fortificados, alimentos que raramente são administrados para animais. Um recente relato avaliou um cão da raça São Bernardo de 8 meses que se alimentava apenas com comida caseira e apresentou diversas alterações associadas à desnutrição, incluindo deficiência de VD (Hutchinson et al., 2012).

Essa análise do presente estudo é muito importante para questionar se as formulações das rações comerciais estão fornecendo quantidades adequadas de VD, já que a dieta é a principal fonte de VD em animais da espécie canina (How et al., 1994; How et al., 1995; Gross et al., 2000;

Hazewinkel *et al.*, 2002; Wakshlag *et al.*, 2011). Algumas rações comerciais não fornecem as quantidades diárias necessárias, levando o animal a apresentar doenças relacionadas à falta ou excesso de VD (Malik *et al.*, 1997; Mellamby *et al.*, 2005). Um estudo confirma a importância da suplementação de VD na alimentação dos cães (Tran *et al.*, 2007). Observa-se também em doença inflamatória intestinal e conseqüente hipovitaminose D que a absorção intestinal da VD é fundamental para a manutenção de níveis séricos adequados (Gow *et al.*, 2011). Galler e colaboradores (2012) relataram a hipovitaminose D em relação à insuficiência renal crônica, pois a $25(\text{OH})\text{D}_3$ sofre hidroxilação nos rins para se transformar em $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, demonstrando a necessidade de uma homeostase entre os órgãos envolvidos no metabolismo da VD. A patogênese ainda necessita ser esclarecida, mas já é conhecida a importância da nutrição no metabolismo da VD, e conseqüentemente a necessidade da sua suplementação adequada e da saúde dos órgãos envolvidos no metabolismo do calcitriol. Sabe-se que animais portadores de neoplasias apresentam alteração metabólica, e talvez isso também influencie no metabolismo da VD.

Mesmo estando cientes de que a principal fonte de VD para a espécie canina é a dieta, resolvemos comparar alguns fatores que teriam relação com a síntese cutânea de VD e a concentração sérica de $25(\text{OH})\text{D}_3$. Só conseguimos obter as características da pelagem do grupo tumoral, mas não houve diferença entre a concentração sérica de $25(\text{OH})\text{D}_3$ e o comprimento ou a cor dos pêlos. Em relação à exposição solar, tanto o grupo controle quanto o grupo tumoral não apresentaram diferença em relação à exposição dos animais ao sol. Mesmo sendo o número de animais que não eram expostos ao sol frequentemente muito pequeno em ambos os grupos, a média da concentração de $25(\text{OH})\text{D}_3$ em cadelas com tumor de mama que não eram expostas ao sol frequentemente mostrou-se menor do que as que eram expostas ao sol diariamente.

Não houve diferença significativa entre a concentração sérica de $25(\text{OH})\text{D}_3$ e alguns parâmetros clínicos das cadelas portadoras de neoplasias

mamárias como raça, peso, porte, apresentação de pseudogestação e estadiamento clínico do tumor. Em relação ao uso de contraceptivos hormonais, apenas uma cadela fez uso e não pudemos realizar análise. Quanto à castração prévia, apesar das cadelas castradas apresentarem concentração sérica de 25(OH)D₃ menor, não houve diferença significativa. Não há estudos veterinários que correlacionem esses parâmetros à concentração sérica de 25(OH)D₃.

Para finalizar, comparamos a concentração sérica de 25(OH)D₃ entre tipos histológicos de tumores mamários, mas não houve diferença entre eles. Aparentemente houve tendendência à maior concentração de 25(OH)D₃ em cadelas com carcinoma sólido, e menor concentração em cadelas com comedocarcinoma, sarcoma e mastocitoma. Mas como havia um número pequeno de animais com esses tipos histológicos de tumor, não podemos confirmar essa suspeita.

Avaliamos então a expressão gênica de *RE*, *RP* e *HER-2* e a expressão proteica de *RE* e *HER-2* nos tumores mamários das cadelas incluídas no estudo. Analisamos primeiramente a expressão proteica classificada pela pontuação. A expressão proteica de *RE* foi baixa, pois a maioria das amostras foram concentradas nas pontuações menores (intensidade de marcação baixa e poucas células marcadas). Em contrapartida, a expressão proteica de *HER-2* foi alta, pois a maior parte das amostras estavam localizadas nas pontuações mais altas (com marcação forte e com grande número de células marcadas).

A seguir, para avaliar se a expressão desses receptores possui controle transcricional, avaliamos a expressão gênica de *RE* e *HER-2* através de RT-qPCR e comparamos com a expressão proteica realizada por IHQ classificada pela pontuação. Em relação ao *RE*, aparentemente um controle pós-transcricional parece estar envolvido pois não houve aumento no conteúdo de RNAm em comparação com as amostras com maior ou menor expressão proteica do receptor. Já no caso de *HER-2*, o aumento da pontuação da expressão proteica segue a expressão gênica.

Comparamos a expressão gênica de *RE*, *RP* e *HER-2* e a expressão proteica de *RE* e *HER-2* em relação aos tumores benignos e malignos mas não houve diferença em nenhuma comparação.

Analizamos as amostras quanto à positividade de *RE* e *HER-2* através da expressão proteica para podermos classificar os tumores quanto aos subtipos moleculares. Para analisar *RE*, consideramos como positiva as amostras que apresentavam marcação em pelo menos 10% das células. Para analisar *HER-2*, utilizamos a metodologia preconizada no Herceptest onde consideramos a marcação completa da membrana como positivo para superexpressão de *HER-2* em amostras de seres humanos.

Detectamos que 50% das pacientes apresentavam tumor de mama *RE* positivo enquanto que 44% apresentam tumor *HER-2* positivo. Comparamos essa positividade em tumores benignos e carcinomas para os dois receptores. Em *HER-2*, encontramos maior positividade nos tumores benignos (apesar do número de amostras para esse grupo ser pequena) e maior negatividade nos carcinomas. Em *RE*, encontramos maior positividade nos tumores benignos e nos carcinomas encontramos metade das amostras positivas e metade negativas. A positividade para esses receptores foram bastante variáveis na literatura: nos tumores benignos, a positividade para *HER-2* variou de nenhuma expressão até 50% de positividade e para *RE* variou de 53,5% a 95,5%. Já nos tumores malignos a positividade para *HER-2* variou de 19,1% a 45%, e para *RE* variou de 23% a 92,3% (Rungsipat *et al.*, 1999; Dutra *et al.*, 2004; Millanta *et al.*, 2005; De Las Mulas *et al.*, 2005; Hsu *et al.*, 2009; Toniti *et al.*, 2009; Beha *et al.*, 2012; Singer *et al.*, 2012; Im *et al.*, 2013; Ressel *et al.*, 2013).

Um dos motivos para essa grande quantidade de tumores apresentando positividade para *HER-2* é a classificação do método HercepTest. Na classificação humana, as amostras que são 2+ são consideradas inconclusivas, e é utilizado o exame FISH (hibridização *in situ* por fluorescência) para detectar amplificação gênica de *HER-2* e assim re-classificar essas amostras 2+ em positivas ou negativas (Wolff *et al.*, 2007).

Como consideramos todas as amostras 2+ positivas, provavelmente algumas dessas amostras na verdade são negativas.

Segundo a classificação dos subtipos moleculares, a maioria dos animais se encontraram no subtipo Luminal B e basaloide (ambos 29%), seguido por Luminal A (25%) e por último o de superexpressão de HER-2 (17%). Na literatura, o tipo Luminal A costuma ser o mais frequente (40-60%), seguido pelos tipos Luminal B (7,1-36%), Triplo negativo (6,7-39%) e HER-2 (7,1-20%) (Beha et al., 2012; Ribeiro et al., 2012; Im et al., 2013). Outro estudo separou apenas em triplo negativo e não triplo negativo e encontrou 19% de tumores com os três receptores negativos e 81% não triplo-negativos (Kim et al., 2013). No presente estudo, o número dos animais que apresentavam o subtipo Basaloide era maior do que o esperado. Isso pode ser devido ao fato de que não realizamos os marcadores de células basais utilizados para identificar o subtipo normal like (como por exemplo CK5/6/14/19, ou p63) e como esse subtipo apresenta os três receptores negativos, eles foram somados ao subtipo triplo negativo. Outro dado que difere dos outros estudos é o subtipo Luminal A. Como já foi explicado anteriormente, consideramos como positivas para HER-2 as amostras que tinham 2+, e provavelmente algumas dessas amostras eram negativas, o que aumentaria o número de tumores com o subtipo Luminal A.

Também caracterizamos as amostras de glândula mamária normal e tumoral quanto à expressão gênica e proteica de VDR. Segundo a expressão gênica, não houve diferença de expressão entre as amostras normais e as tumorais. Entretanto, em relação à expressão proteica, observamos uma maior expressão de VDR em amostras normais em relação às tumorais. Segundo a classificação pela pontuação, a maioria das amostras normais apresentou forte expressão proteica do receptor (quanto maior a pontuação, maior a intensidade de marcação e maior porcentagem de células marcadas). Em contrapartida, a maioria das amostras tumorais apresentou expressão do receptor entre baixa à intermediária (nenhuma amostra demonstrou marcação da pontuação 1 ou 7, a maioria das amostras apresentou marcação de

pontuação 4). Russell e colaboradores (2010) pesquisaram a presença de VDR em mastocitomas e observaram maior expressão nos mastócitos neoplásicos em relação aos mastócitos reativos, inferindo que o VDR poderia ser utilizado futuramente como um critério de graduação do tumor (mesmo que a diferença entre os graus não tenha sido significativa), um fator prognóstico e até ser um alvo para intervenção terapêutica.

Detectamos padrões específicos de expressão de VDR em tecidos normais e tumorais não previamente descritos. Em tecido mamário normal, observou-se a expressão de VDR em 85% das amostras de modo proporcional nas células epiteliais e mioepiteliais. Em tecido mamário tumoral, observou-se que 51% das amostras apresentavam marcação predominante em células mioepiteliais. A expressão de VDR em tumores caninos foi descrita previamente apenas em osteossarcoma (Davies *et al.*, 2012 e Gallanger *et al.*, 2012), mastocitomas (Russell *et al.*, 2010) e carcinoma de células transicionais (Kaewsakhorn *et al.*, 2005). Este é o primeiro estudo avaliando a expressão de VDR em glândulas mamárias de cães.

Comparamos a seguir a expressão gênica e a proteica de VDR, mas tanto nos tecidos normais quanto nos tumorais não houve correlação entre elas. Possivelmente um controle pós-transcricional estaria envolvido pois não houve maior conteúdo de RNAm em amostras com maior expressão proteica de VDR em comparação àquelas com menor expressão. Comparamos também a expressão gênica com os três padrões de VDR apresentados à imunoistoquímica, mas também não houve relação entre eles.

A expressão proteica de VDR segundo os três padrões foi diferente entre os tipos histológicos de tumores mamários: as neoplasias benignas e os carcinomas simples apresentaram expressão de VDR padrão I predominante (células epiteliais e mioepiteliais), os carcinomas complexos e os mistos apresentaram expressão de VDR padrão II predominante (predominante em células mioepiteliais) e o comedocarcinoma, carcinoma sólido e o sarcoma apresentaram padrão III (mas esses três tipos histológicos estavam representados por apenas uma amostra cada um). Este tipo de padrão de

expressão de VDR, em diferentes tipos celulares, ainda não havia sido descrito, entretanto no presente estudo ele foi claramente reconhecido. Os controle negativos foram satisfatórios e a marcação nuclear de VDR foi muito específica, sem marcação inespecífica característica de ruído, indicando que estamos realmente frente a um novo achado.

A cultura organotípica foi anteriormente utilizada com sucesso pelo nosso grupo (Milani *et al.*, 2010; Milani *et al.*, 2013) para avaliar os efeitos da VD em fatias de tecido mamário tumoral de mulheres. Observamos que o tecido se mantém viável em cultura por 24 horas pela preservação da morfologia dos tecidos corados com HE, pela incorporação de BRDU (demonstrando a viabilidade das células tumorais através da proliferação celular), e que a expressão do RNAm da enzima *CYP24A1* é induzida após tratamento com calcitriol (demonstrando que a via da VD estava funcional). Além disso, estudo prévio demonstrou que este modelo pode ser utilizado para análise de tumores de mama na espécie canina (Sobral *et al.*, 2008).

Demonstramos através da cromatografia líquida que a concentração tecidual de vitamina D₃ aumenta conforme o aumento da concentração utilizada nos diferentes tratamentos, indicando penetração do calcitriol pelo tecido. Além disso, aparentemente as células tumorais apresentam uma maior absorção de vitamina D₃ que as células normais. Husain e colaboradores (2009) avaliaram a concentração de vitamina E em pâncreas normais e tumoral em camundongos e relataram que o microambiente do tecido tumoral, quando comparados com o tecido normal, apresenta alterações do metabolismo de medicamentos, o que poderia explicar esse aumento de absorção da VD pelas células tumorais no presente estudo.

Um outro teste que utilizamos para analisar a viabilidade da cultura de tecidos foi o RTq-PCR. Através da expressão gênica de *CYP24A1*, averiguamos que conforme aumentava a concentração de VD, a expressão desse gene também aumentava. Esse gene é alvo direto do hormônio pois apresenta vários elementos de resposta à VD (VDRE) em sua região promotora. Em tecidos normais, o tratamento com calcitriol induziu a

expressão de *CYP24A1* em 27 vezes utilizando-se 0,228nM de VD e em 158 vezes utilizando-se 100nM de VD. Em tumores, observou-se indução de *CYP24A1* da ordem de 36 vezes em tratamento com 2nM de VD e de 102 vezes em tratamento de 100nM de VD. A mesma análise foi utilizada por Milani e colaboradores (2013), e o resultado em fatias de tumor de mama de mulheres foi semelhante.

A expressão gênica de *CYP27B1* não foi alterada com os diferentes tratamentos, entretanto este não é um gene alvo. A enzima *CYP27B1* atua na via da VD apenas para hidroxilar a 25(OH)D₃, transformando-a na forma com maior atividade biológica 1,25(OH)₂D₃ (Bouillon et al., 1995).

Analizamos os efeitos do tratamento com VD em alguns genes candidatos como *CDKN1A*, *CDKN1B* e *CD14*, que foram anteriormente descritos como alvos do hormônio. Em um estudo humano, o tratamento com análogos da VD aumentou a expressão proteica de *CDKN1A* (p21) e *CDKN1B* (p27) em um estágio inicial, bloqueando a transição G1/S e inibindo o crescimento de células de linhagem de câncer pancreático (Kawa *et al.*, 1997). Contrariando esse resultado, no presente estudo o tratamento de tecidos normais e tumorais com calcitriol não alterou a expressão dos genes *CDKN1A* e *CDKN1B*.

Quando comparamos as amostras normais com as tumorais, observamos diferença de expressão de RNAm de *CDKN1A* entre amostras submetidas a tratamento com as várias concentrações de VD. Diferença de expressão do gene *CDKN1B* ocorreu apenas na comparação entre as amostras que foram tratadas com VD, mas não ocorreu nas amostras que foram tratadas com VD. Como descrito por Klopffleisch e Gruber (2009), as amostras de adenocarcinomas apresentaram um aumento da expressão de p21 (*CDKN1A*) e redução da expressão de p27 (*CDKN1B*), e as metástases e os adenomas apresentaram uma expressão heterogênea tanto de p21 quanto de p27. Talvez seja por essa alteração da expressão do tumor que o tratamento com VD não proporcione uma diferença significativa da expressão.

Talvez um número maior de amostras para cada classificação histológica proporcione uma análise mais detalhada da expressão desses genes.

CD14 é uma proteína de membrana expressa em monócitos e macrófagos e essa proteína está envolvida com a resposta imune (Devitt *et al.*, 1998) e também com a apoptose e involução de glândulas mamárias de camundongos (Stein *et al.*, 2004). Segundo um estudo do nosso grupo, houve aumento de expressão gênica e proteica de *CD14* após tratamento em cultura com VD nas doses de 0,5 nM e 100 nM em tecidos de carcinoma mamário (Milani *et al.*, 2013). No presente estudo, o gene *CD14* não demonstrou alteração significativa entre os tratamentos tanto nas amostras de glândulas mamárias normais quanto nas tumorais. Talvez esse gene não esteja envolvido na via da VD em glândulas e tumores mamários de cadelas.

Por fim, analisamos se a exposição ao calcitriol por um curto período de tempo interfere na proliferação e apoptose. Verificamos que o tratamento com VD não alterou a proliferação celular (através da expressão proteica de Ki-67) nos tecidos normais, mas reduziu nos tecidos tumorais. É possível que esse resultado possa ser explicado pela característica das células tumorais, as quais apresentam grande capacidade proliferativa e também pelo próprio metabolismo celular da célula tumoral estar alterado ou pelo tumor absorver mais o calcitriol, como foi descrito anteriormente (Husain *et al.*, 2009). O tratamento com VD ainda não havia sido realizado em tecidos mamários caninos, mas já havia sido realizado em linhagens celulares de tumores mamários, mastocitomas e osteossarcomas, associado ou não com quimioterápicos, demonstrando-se efeito antiproliferativo *in vitro* (Rassnick *et al.*, 2008). O calcitriol foi utilizado em linhagem de mastocitoma canino, acompanhado de quimioterápicos ou inibidores de tirosina quinase, observando-se efeito aditivo antiproliferativo, sugerindo que a VD possa ser empregada para adicionar um efeito antiproliferativo às drogas usuais, possibilitando assim a diminuição de suas dosagens e consequentes efeitos colaterais, potencializando somente a ação benéfica (Malone *et al.*, 2010). No estudo citado, o tratamento de 10 animais com um análogo da VD associou-

se com a remissão completa da doença em um cão e remissão parcial em outros três animais, demonstrando que o tratamento com VD pode exercer um efeito anti-tumoral. Em um estudo de nosso grupo, mulheres com câncer de mama foram suplementadas com calcitriol oral, e ocorreu uma tendência à redução na expressão de Ki-67 (Urata *et al.*, 2013).

Através da análise da expressão proteica de CASP3 realizada por IHQ, não se observou alteração da porcentagem de células em apoptose após o tratamento com VD, tantos nos tecidos normais quanto nos tumorais. A morte celular ocorre por diversas vias, e talvez seja necessária a análise de diversos marcadores para concluir se o tratamento com VD realmente atua na apoptose. Outro fator para ser discutido é o tempo de cultura. Talvez apenas 24 horas de tratamento com a VD não seja o suficiente para desencadear a morte das células. São necessários mais estudos, com um período de tratamento mais longo para comprovar a eficiência desse tratamento na apoptose celular.

Comparamos também se os três padrões de expressão de VDR classificados através da marcação proteica tinham alguma relação com a resposta ao tratamento com VD, mas não houve correlação tanto para a proliferação quanto para a apoptose. São necessários estudos futuros com um maior número de animais com cada padrão de VDR e com cada tipo histológico para comprova o significado clínico dos padrões de VDR e se essa classificação realmente interfere na resposta ao tratamento com VD.

6. CONCLUSÕES

Não observamos diferença entre a concentração sérica de 25(OH)D₃ em cadelas com tumor de mama e animais controle.

Não houve correlação da concentração sérica de 25(OH)D₃ e castração, pseudociese, uso de contraceptivos hormonais, exposição solar, características da pelagem, peso, raça/porte e quantidade de VD na dieta, mas houve associação com o tipo de alimentação que os animais ingeriam (comida caseira e/ou ração) e com o sexo dos animais do grupo controle (machos apresentaram maior concentração em relação às fêmeas). Também houve correlação inversa entre a concentração sérica de 25(OH)D₃ e a idade nas cadelas com tumor de mama.

Sugere-se uma reavaliação dos rótulos de ração e da necessidade diária de VD dos cães. Talvez as fêmeas necessitem de uma quantidade maior de VD diária, assim como os animais mais velhos. Caso os animais sejam alimentados com comida caseira, precisa ser avaliada a necessidade de suplementação da dieta com VD.

Este é o primeiro estudo avaliando conjuntamente a concentração sérica de VD e expressão de VDR em tumores de mama de cadelas. Demonstrou-se que as glândulas mamárias normais e tumorais expressam VDR, mas observou-se localização diferencial de VDR em células epiteliais. Em tecido mamário normal, o VDR está mais comumente expresso em células epiteliais e mioepiteliais, enquanto que em amostras tumorais, a marcação é predominante em células mioepiteliais.

Observou-se que a cultura de tecidos é um procedimento viável para análise da ação hormonal, pois o conteúdo de VD é maior nos tecidos conforme o aumento da dose de tratamento e a expressão do gene *CYP24A1*, gene alvo da VD, aumentou nos tecidos conforme o acréscimo da dose de

tratamento. Entretanto, não houve indução da expressão em *CYP27B1*, *CDKN1A*, *CDKN1B* e *CD14*.

Não conseguimos identificar com as técnicas empregadas alteração no padrão de proliferação nas amostras normais, somente nas tumorais, e de apoptose nos tecidos normais e tumorais. Portanto, a via genômica da VD está ativa, entretanto, o período de tratamento (24 horas) pode ter sido curto para exercer efeitos antitumorais em proliferação e apoptose.

7. ANEXOS

- ANEXO A -

Aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa da FMUSP

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 04/11/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1108/09**, intitulado: **"VIA DA VITAMINA D EM TUMORES DE MAMA DE CADELAS"** apresentado pelo Departamento de **RADIOLOGIA E RADIOTERAPIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira**

Pesquisador (a) Executante: **Simone Crestoni Fernandes**

CAPPesq, 05 de Novembro de 2009

Aprovado em 10, 12, 09
 Prof. Dr. Roger Chammas
 Presidente da Comissão Coordenadora do Programa
 Oncologia - FMUSP

 Prof. Dr. Eduardo Massad
 Presidente da Comissão de
 Ética para Análise de Projetos
 de Pesquisa

- ANEXO B -

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Estamos solicitando o consentimento do senhor(a) para realizar uma pesquisa. O seu animal é portador de um tumor na mama e por isso será submetido à cirurgia para retirá-lo. Uma fração deste tumor será encaminhada para determinar o diagnóstico e o restante do material não será utilizado.

Esta pesquisa denomina-se “Via da vitamina D em tumores de mama de cadelas”. Em mulheres com câncer de mama a concentração de vitamina D no sangue pode estar diminuída em relação a mulheres sem câncer. Outras alterações nesta via também foram descritas em mulheres com câncer de mama. Em cadelas, ainda não há dados e por isso estamos realizando este estudo, na tentativa de ampliar nosso conhecimento sobre causas e possíveis tratamento do tumor da mama em cadelas.

Solicitamos uma amostra do produto da cirurgia, que seria desprezado, bem como uma amostra de 5 mL de sangue, para realizar o estudo. Esta pesquisa em nada vai interferir com o tratamento do seu animal, não vai trazer danos a ele e não implica em qualquer custo. A pesquisa também não trará benefícios diretos ao animal. Entretanto, é possível que a melhor compreensão sobre a doença nos ajude, no futuro, a oferecer maneiras mais efetivas de prevenção e tratamento. A amostra de sangue será utilizada para determinar a concentração de vitamina D. A amostra de tecido será utilizada para avaliar a expressão de genes envolvidos no metabolismo e genes alvo de vitamina D. Estas análises serão realizadas nas dependências do Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM 24 - FMUSP).

DECLARAÇÃO DO MÉDICO VETERINÁRIO

Eu declaro que expliquei essa proposta de tratamento, com todos os detalhes necessários para o proprietário. No meu julgamento, houve acesso à todas informações disponíveis, incluindo os riscos e benefícios, para que se possa fazer uma decisão informada.

Nome do médico veterinário: _____

CRMV: _____ Data: _____

Assinatura do médico veterinário: _____

DECLARAÇÃO DO PROPRIETÁRIO

Declaro ter sido esclarecido sobre a pesquisa, e concordar com sua execução.

Declaro também que a minha participação é voluntária.

Nome do proprietário: _____

RG: _____ Data: _____

Proprietário(a) do animal (nome do animal): _____

Assinatura do proprietário: _____

- ANEXO C -

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

(Grupo Controle)

Estamos solicitando o consentimento do senhor(a) para realizar uma pesquisa. O seu animal está saudável, e por isso solicitamos que ele participe de um estudo onde fará parte do grupo controle.

Esta pesquisa denomina-se “Via da vitamina D em tumores de mama de cadelas”. Em mulheres com câncer de mama a concentração de vitamina D no sangue pode estar diminuída em relação a mulheres sem câncer. Outras alterações nesta via também foram descritas em mulheres com câncer de mama. Em cadelas, ainda não há dados e por isso estamos realizando este estudo, na tentativa de ampliar nosso conhecimento sobre causas e possíveis tratamento do tumor da mama em cadelas. O seu animal será parte do grupo controle, ou seja, do grupo que servirá para futura comparação com o grupo de cadelas portadoras de tumor de mama.

Para isso, necessitamos de uma amostra de 5 mL de sangue do seu animal que será utilizada para determinar a concentração de vitamina D. Esta pesquisa em nada vai trazer danos a seu animal e não implica em qualquer custo. A pesquisa também não trará benefícios diretos ao animal. Entretanto, é possível que a melhor compreensão sobre a doença nos ajude, no futuro, a oferecer maneiras mais efetivas de prevenção e tratamento.

DECLARAÇÃO DO MÉDICO VETERINÁRIO

Eu declaro que expliquei essa proposta com todos os detalhes necessários para o proprietário. No meu julgamento, houve acesso à todas informações disponíveis, incluindo os riscos e benefícios, para que se possa fazer uma decisão informada.

Nome do médico veterinário: _____

CRMV: _____ Data: _____

Assinatura do médico veterinário: _____

DECLARAÇÃO DO PROPRIETÁRIO

Declaro ter sido esclarecido sobre a pesquisa, e concordar com sua execução.

Declaro também que a minha participação é voluntária.

Nome do proprietário: _____

RG: _____ Data: _____

Proprietário(a) do animal (nome do animal): _____

Assinatura do proprietário: _____

- ANEXO D -

Ficha de Consulta de Cadelas Portadoras de Tumor de Mama

Cirurgião: _____

Data: _____ () PROVET () FMVZ-USP () UNIP

Nome	Idade	Raça	RG no hospital
Proprietário(a)		Cidade	Telefone
Tempo de aparecimento dos nódulos:			
Já teve outros tumores de mama? () Sim () Não		Recidiva? () Sim () Não Há quanto tempo foi feita a mastectomia? _____	
Informações Gerais			
Apresenta alguma doença crônica? () Não () Sim – Qual? _____		Faz uso crônico de algum medicamento? () Não () Sim – Qual(ais)? _____	
Estado geral atual: () excelente () bom () razoável () ruim		Apresenta emagrecimento recente? () Não () Sim – Quanto perdeu de peso no último mês? _____	
Exame Físico			
Mucosas aparentes: () normocoradas () pálidas () congestas () ictéricas		Hidratação: () normal () desidratado – Quanto: ____%	Temperatura retal: _____°C
Peso: ____ kg			
Auscultação: FC ____ bpm FR ____ mrp Estertores: () Não () Sim – tipo? _____			
Alterações à ausculta cardíaca: () arritmia () sopro () hipofonese () hiperfonese		Palpação abdominal: () NDN () alteração – Qual? _____	
Vitamina D			
Tipo de alimentação: () ração – qual? _____ () comida caseira – Ingredientes: _____ () peixe () fígado () suplemento alimentar/vitaminas – qual? _____ quanto tempo? _____			
Comprimento do pêlo: () Curto () Comprido	Cor do pêlo: () Branco () Claro () Negro () Escuro () Malhado		
Exposição solar: () Não () Sim – Quantos dias por semana? _____ - Quanto tempo por dia? _____			
Época da consulta: () Verão () Inverno () Primavera () Outono			
Histórico Reprodutivo			
() Não Castrada () Castrada Qual idade a paciente tinha na época da castração? _____		Motivo de castração: () conveniência () piometra () outros _____	
Uso de anticoncepcional: () Nunca () Sim – Número de aplicações: _____			
Coberturas e gestações: () Nunca “cruzou” () “Cruzou” mas nunca teve gestação () “Cruzou” e teve gestação – Número de gestações: _____			
Pseudociese: () Nunca () Sim – Número de episódios: _____		Fez uso de medicamentos? () Não () Sim – Qual? _____	

Tem conhecimento de algum parente da paciente que tenha tido tumor de mama? () Não () Sim - Tipo de parentesco: () avó () mãe () irmã () filha () neta					
Exame das Mamas U= ulcerado T= tamanho dos nódulos em cm					
Cadeia direita	M1	M2	M3	M4	M5
Linfonodos direitos	Axilar () NDN () aumentado			Inguinal () NDN () aumentado	
Cadeia esquerda	M1	M2	M3	M4	M5
Linfonodos esquerdos	Axilar () NDN () aumentado			Inguinal () NDN () aumentado	
Pesquisa de Metástases Distantes					
Radiografia torácica: Posições? () latero-lateral direita () latero-lateral esquerda () tóraco-lombar () sem evidências de metástase pulmonar () presença de metástase pulmonar () dúvida					
Ultrassom abdominal: () sem evidências de metástase abdominal () presença de metástase abdominal – Qual órgão? _____ () dúvida					
Exames Complementares					
() Hemograma – Alteração: _____ () Uréia – Valor: _____ () Creatinina – Valor: _____ () ALT – Valor: _____ () FA – Valor: _____			() Cálcio sérico – Valor: _____ () Glicose – Valor: _____ () ECG – Valor: _____ () Ecocardiograma – Valor: _____ () Outros: _____		

- ANEXO E -

Quantidade de VD nas Rações

RAÇÃO	UI de VD / kg de ração
Vitta Natural Cães Adultos Frango	1.056
Vitta Natural Cães Filhotes Frango	1.104
Golden Formula Cães Adultos Carne e Arroz	1.134
Golden Formula Cães Adultos Mini Bits Salmão e Arroz	1.134
Golden Formula Cães Adultos Mini Bits Frango e Arroz	1.134
Golden Formula Cães Filhotes Mini Bits Frango e Arroz	1.134
Golden Formula Cães Filhotes Frango e Arroz	1.134
Golden Formula Cães Adultos Frango e Arroz	1.134
Golden Formula Cães Filhotes Carne e Arroz	1.134
Golden Formula Cães Adultos Salmão e Arroz	1.134
Golden Formula Cães Adultos Mini Bits Light Frango e Arroz	1.156,68
Golden Formula Cães Adultos Light Frango e Arroz	1.156,68
Golden Special Cães Adultos Frango e Carne	1.134
Golden Mega Cães Adultos Raças Grandes Frango e Arroz	1.134
Golden Mega Cães Filhotes Raças Grandes Frango e Arroz	1.200
Golden Mega Cães Filhotes Raças Grandes e Gigantes Frango e Arroz	1.200
Golden Power Cães Filhotes Frango e Arroz	1.134
Golden Power Cães Adultos Treinamento e Competição Frango e Arroz	1.134
Golden Power Training Cães Adultos Frango e Arroz	1.005
Premier Formula Cães Adultos Frango e Arroz	1.365
Premier Formula Cães Filhotes Frango e Arroz	1.456
Premier Formula Raças Grandes Adultos	1.005
Premier Formula Raças Grandes Filhotes	1.380
Premier Formula Raças Pequenas Adultos	1.365
Premier Formula Raças Pequenas Filhotes	1.456
Premier Formula Cães Adultos Light	1.200
Premier Ambientes Internos Cães Filhotes Papinha Desmame	1.800
Premier Ambientes Internos Cães Filhotes Frango e Salmão	1.800
Premier Ambientes Internos Cães Adultos Frango e Salmão	1.600
Premier Ambientes Internos Cães Adultos Light	1.600
Premier Ambientes Internos Cães Adultos Anti - Idade	1.600
Premier Ambientes Internos Senior	1.400
Premier Raças Específicas Cães Adultos Bulldog	1.200
Premier Raças Específicas Cães Filhotes Bulldog	1.200
Premier Raças Específicas Cães Adultos Cocker	1.700
Premier Raças Específicas Cães Adultos Dachshund	1.800
Premier Raças Específicas Cães Adultos Golden Retriever	1.520

Premier Raças Específicas Cães Adultos Labrador	1.200
Premier Raças Específicas Cães Filhotes Labrador	1.200
Premier Raças Específicas Cães Adultos Lhasa Apso	1.600
Premier Raças Específicas Cães Filhotes Lhasa Apso	1.200
Premier Raças Específicas Cães Adultos Maltês	1.900
Premier Raças Específicas Cães Filhotes Maltês	1.200
Premier Raças Específicas Cães Adultos Pitt Bull	1.800
Premier Raças Específicas Cães Filhotes Pitt Bull	1.200
Premier Raças Específicas Cães Adultos Poodle	1.200
Premier Raças Específicas Cães Filhotes Poodle	1.200
Premier Raças Específicas Cães Adultos Rottweiler	1.850
Premier Raças Específicas Cães Filhotes Rottweiler	1.200
Premier Raças Específicas Cães Filhotes Shih Tzu	1.600
Premier Raças Específicas Cães Adultos Yorkshire	1.200
Premier Raças Específicas Cães Filhotes Yorkshire	1.200
Líder	1300
Royal Canin Junior (mini, medium e maxi)	1000
Royal Canin adult maxi	1200
Canibelo	2625
Nero	1300
Pedigree (todas)	510
Dog Chow	600
Dog Show	1500
Alpo	5000
Big Boss	2000
Special Dog	1500
Special Dog Vegetais	2000
Foster e Foster Mix	950
Max Performance	2000
Max Junior	2500
Premiatta Premium	1000
Premiatta Junior	1600
Champ	460
Excellence (Light)	1050
Proplan Adulto	600
Proplan Senior	1200
Canitos adulto	500-800

- ANEXO F -

Quantidade de VD nos Alimentos (Comida Caseira)

(Philippi, 2002)

Alimento	Quantidade de VD por Alimento (UI/kg)
Osso	-
Coração de Boi	120
Carne	120
Frango	118
Fígado	120
Peixe espada	400
Pescada	672
Truta	400
Salmão	1200
Atum	2152
Sardinha	4800
Ovo	2400
Leite	400 - 48000
Queijo Branco	80
Pão	80
Pêra	0
Maçã	0
Banana	0
Melão	0
Melancia	0
Mamão	0
Cenoura	0
Granola	-
Arroz	0
Feijão	-
Batata	0
Latinha de ração pastosa	230
Cápsula W3	0
Alface	0
Tomate	0

- ANEXO G -

EXTRAÇÃO de RNA pelo *RNeasy Mini Kit* (Qiagen)

(adaptado da página 39 do *RNeasy Mini Handbook*)

Deixar antecipadamente preparado:

1. Lavar material com dextran e água corrente e secar com papel toalha. Após secar, limpar com etanol 70% DEPC;
2. Pegar 3 “sets” de eppendorfs (ex: se você tiver 1 amostra, pegar 3 tubos. Se tiver 2 amostras, pegar 6 tubos);
3. Colocar N₂ líquido em um isopor grande;
4. Pegar H₂O DEPC e etanol 70% DEPC para lavar o material entre as amostras;
5. Pegar o kit de extração e preparar os dois MIXs;
6. MIX 1: Adicionar 10 uL de β -Mercaptoetanol para 1 mL do Buffer RLT (do kit). Multiplicar pelo número de amostras para obter a quantidade total. Após a diluição, colocar o mix no gelo (pois ele precisa estar gelado quando for usar). Após o uso, esse mix pode ser armazenado por apenas 1 mês, em temperatura ambiente.
7. MIX 2: Adicionar 4 volumes de etanol (96-100%) para diluir o Buffer RPE. 1 amostra = 1000 uL MIX 2.

Pulverização:

1. Colocar o suporte do pulverizador no N₂ líquido para gelar;
2. Colocar 600 uL do MIX 1 nos tubos eppendorf e deixar no gelo;
3. Pegar os tecidos com uma pinça anatômica e pulverizar no polytron. Colocar um pouco de N₂ líquido e repetir a pulverização.;
4. Pegar a amostra pulverizada e transferir para o respectivo tubo, contendo o MIX 1 gelado e armazenar o tubo com a amostra no gelo;
5. Lavar o material com H₂O DEPC e limpar com etanol 70% DEPC para próxima amostra.

Extração do RNeasy:

1. Centrifugar por 3 minutos na velocidade máxima;
2. Transferir o sobrenadante cuidadosamente com uma pipeta para um novo tubo 1,5 mL;
3. Adicionar 600 uL de etanol 70% DEPC. Misturar bem com a pipeta;
4. Transferir 700 uL da amostra para a coluna. Centrifugar por 15 segundos a 10.000 RPM. Descartar o filtrado;
5. Transferir o restante da amostra para a coluna e repetir a centrifugação;
6. Adicionar 700 uL Buffer RW1 na coluna. Feche a tampa suavemente. Centrifugar por 15 segundos a 10.000 RPM. Descartar filtrado;
7. Adicionar 500 uL MIX 2. Centrifugar por 15 segundos a 10.000 RPM. Descartar filtrado;
8. Adicionar 500 uL MIX 2. Centrifugar por 2 minutos a 10.000 RPM. Descartar filtrado;
9. Centrifugar novamente por 1 minuto para secar a membrana com a tampa do tubo aberta (lembrar que a centrífuga gira no sentido horário, então a tampa aberta tem que ficar pro lado direito do tubo para não fechar). Descartar o filtrado;
10. Transferir a coluna para um tubo 1,5 mL novo (do kit);
11. Adicionar 30 uL H₂O RNase free (do kit) diretamente na membrana e centrifugar 1 minuto por 10.000 RPM.

- ANEXO H -

Concentração de espectrofotometria em comprimento de onda de 260nm e integridade do RNA extraído pela razão de absorbância a 260nm por 280nm

Amostra		Tratamento	260/280	[] (ng/μL)
C5	normal	0,228 nM VD	2,05	154,6
		100 nM VD	2,01	172,5
		etanol	2,02	99,2
	tumoral	2nM VD	1,96	330,0
		100 nM VD	1,95	392,5
		etanol	1,90	130,0
C6	normal	0,228 nM VD	2,07	77,5
		100 nM VD	2,01	88,2
		etanol	2,04	142,5
	tumoral	2nM VD	1,98	251,8
		100 nM VD	2,02	271,1
		etanol	2,00	333,1
C7	normal	0,228 nM VD	2,02	155,5
		100 nM VD	1,99	69,0
		etanol	2,05	132,6
	tumoral	2nM VD	2,29	12,4
		100 nM VD	1,98	15,7
		etanol	1,99	31,1
C11	normal	0,228 nM VD	1,86	470,0
		100 nM VD	1,87	229,6
		etanol	1,93	167,4
	tumoral	2nM VD	1,87	190,1
		100 nM VD	1,84	350,9
		etanol	1,84	243,7
C12	normal	0,228 nM VD	2,00	123,7
		100 nM VD	2,04	124,7
		etanol	2,06	105,2
	tumoral	2nM VD	2,02	138,7
		100 nM VD	2,01	177,6
		etanol	2,01	210,1
C13	normal	0,228 nM VD	2,03	164,9
		100 nM VD	2,00	94,8
		etanol	2,04	86,6
	tumoral	2nM VD	2,00	224,9
		100 nM VD	1,98	150,4
		etanol	1,97	250,6
C14	normal	0,228 nM VD	1,97	150,3
		100 nM VD	2,03	87,8

	tumoral	etanol	1,95	39,6
		2nM VD	1,89	24,2
		100 nM VD	1,97	67,1
		etanol	1,98	73,8
C15	normal	0,228 nM VD	2,07	150,2
		100 nM VD	2,00	390,9
		etanol	2,05	216,0
	tumoral	2nM VD	2,06	179,8
		100 nM VD	2,01	316,5
		etanol	2,04	135,8
C16	normal	0,228 nM VD	2,02	43,9
		100 nM VD	2,07	88,1
		etanol	2,03	58,4
	tumoral	2nM VD	2,06	127,7
		100 nM VD	2,04	155,2
		etanol	2,01	54,2
C17	normal	0,228 nM VD	2,01	69,8
		100 nM VD	1,93	43,5
		etanol	2,02	119,5
	tumoral	2nM VD	2,02	98,2
		100 nM VD	2,02	148,4
C18	normal	0,228 nM VD	2,02	134,9
		100 nM VD	2,02	90,1
		etanol	1,97	34,8
	tumoral	2nM VD	2,02	103,6
		100 nM VD	2,01	175,8
		etanol	2,01	79,4
C19	normal	0,228 nM VD	2,04	258,0
		100 nM VD	1,94	223,3
		etanol	1,96	106,4
	tumoral	2nM VD	2,06	93,6
		100 nM VD	1,91	116,5
		etanol	1,82	33,7
C20	normal	0,228 nM VD	2,02	48,4
		100 nM VD	2,03	192,4
		etanol	1,98	170,4
	tumoral	2nM VD	2,07	122,8
		100 nM VD	2,06	61,3
		etanol	2,05	169,6
C21	normal	0,228 nM VD	1,95	89,7
		100 nM VD	2,01	237,4
		etanol	1,98	149,5
	tumoral	2nM VD	1,69	58,8
		100 nM VD	1,97	200,9
		etanol	1,97	194,8

C22	normal	0,228 nM VD	1,87	274,1
		100 nM VD	2,12	68,7
		etanol	2,00	74,4
	tumoral	2nM VD	1,85	327,5
		100 nM VD	1,94	93,0
		etanol	1,79	24,2
C23	normal	0,228 nM VD	1,88	302,2
		100 nM VD	2,07	94,4
		etanol	2,00	123,4
	tumoral	2nM VD	1,93	108,6
		100 nM VD	1,92	87,3
		etanol	1,92	97,2
C24	normal	0,228 nM VD	1,96	52,2
		100 nM VD	1,89	34,4
		etanol	1,81	27,0
	tumoral	2nM VD	2,09	97,4
		100 nM VD	2,03	158,6
		etanol	1,87	271,2
C25	normal	0,228 nM VD	2,06	77,0
		100 nM VD	2,04	110,5
		etanol	2,01	44,4
	tumoral	2nM VD	1,95	135,4
		100 nM VD	2,03	101,9
		etanol	2,01	114,2
C26	normal	0,228 nM VD	1,96	120,6
		100 nM VD	1,97	191,7
		etanol	2,02	177,7
	tumoral	2nM VD	2,00	345,7
		100 nM VD	2,03	171,1
		etanol	2,00	179,2
C27	normal	0,228 nM VD	2,04	97,2
		100 nM VD	2,02	79,1
		etanol	2,05	63,7
	tumoral	2nM VD	2,02	128,4
		100 nM VD	2,07	67,4
		etanol	2,04	110,8
C29	normal	0,228 nM VD	2,12	48,9
		100 nM VD	2,08	142,9
		etanol	2,14	39,7
	tumoral	2nM VD	1,94	625,7
		100 nM VD	1,99	322,7
		etanol	1,96	334,1
C32	normal	0,228 nM VD	1,44	11,3
		100 nM VD	1,53	36,6
		etanol	1,61	4,0

	tumoral	2nM VD	1,90	93,2
		100 nM VD	1,94	180,4
		etanol	1,88	109,6
C33	normal	0,228 nM VD	2,03	119,2
		100 nM VD	1,99	97,2
		etanol	1,90	126,3
	tumoral	2nM VD	1,99	127,0
		100 nM VD	1,97	121,3
		etanol	1,87	135,1
C34	normal	0,228 nM VD	2,02	176,9
		100 nM VD	1,58	37,9
		etanol	2,02	115,1
	tumoral	2nM VD	1,96	72,3
		100 nM VD	1,52	92,2
		etanol	2,03	61,3
C35	normal	0,228 nM VD	2,04	62,8
		100 nM VD	1,98	47,4
		etanol	2,03	136,2
	tumoral	2nM VD	2,02	113,6
		100 nM VD	1,99	167,8
		etanol	2,00	219,3
C36	normal	0,228 nM VD	1,89	25,6
		100 nM VD	1,84	47,6
		etanol	1,99	60,6
	tumoral	2nM VD	1,99	313,8
		100 nM VD	1,90	36,0
		etanol	2,01	27,7
C37	normal	0,228 nM VD	1,98	18,3
		100 nM VD	2,04	71,4
		etanol	1,98	59,4
	tumoral	2nM VD	1,94	46,2
		100 nM VD	1,91	37,2
		etanol	1,93	98,9
C38	normal	0,228 nM VD	2,01	115,1
		100 nM VD	1,94	55,7
		etanol	2,02	101,8
	tumoral	2nM VD	2,00	142,6
		100 nM VD	1,96	44,6
		etanol	2,08	130,1
C39	normal	0,228 nM VD	1,94	121,0
		100 nM VD	1,99	41,7
		etanol	1,86	477,5
	tumoral	100 nM VD	2,02	17,4
		etanol	1,94	69,4
C40	normal	0,228 nM VD	2,47	14,4

		100 nM VD	1,97	62,3
		etanol	1,97	46,6
	tumoral	2nM VD	1,99	47,4
		100 nM VD	2,02	81,1
		etanol	1,96	47,3
C41	normal	0,228 nM VD	1,95	26,0
		100 nM VD	1,94	65,9
		etanol	1,97	73,0
	tumoral	2nM VD	1,84	147,0
		100 nM VD	1,89	244,0
		etanol	1,77	156,7
C42	normal	0,228 nM VD	2,12	59,1
		100 nM VD	2,05	243,4
		etanol	2,03	185,9
	tumoral	2nM VD	2,03	176,9
		100 nM VD	2,00	253,6
		etanol	1,88	307,9
C43	normal	0,228 nM VD	2,00	80,6
		100 nM VD	2,03	61,3
		etanol	1,98	41,3
	tumoral	2nM VD	2,02	268,7
		100 nM VD	2,03	105,7
		etanol	2,04	187,0
C44	normal	0,228 nM VD	2,15	23,8
		100 nM VD	2,06	32,5
		etanol	2,01	44,3
	tumoral	2 nM VD	2,68	12,8
		100 nM VD	2,04	38,4
		etanol	2,19	33,3
C45	normal	0,228 nM VD	2,30	27,2
		100 nM VD	2,05	118,4
		etanol	2,02	12,1
	tumoral	2 nM VD	1,99	42,6
		100 nM VD	2,07	69,2
		etanol	2,04	140,1
C46	normal	0,228 nM VD	2,00	10,7
		100 nM VD	1,94	9,0
		etanol	1,93	5,9
	tumoral	2 nM VD	2,00	126,8
		100 nM VD	1,97	58,0
		etanol	2,00	256,6
C47	normal	0,228 nM VD	1,81	5,3
		100 nM VD	1,84	9,1
		etanol	1,66	8,1
	tumoral	2 nM VD	1,86	10,9

		100 nM VD	1,88	17,3
		etanol	1,94	47,9
C48	normal	0,228 nM VD	1,81	12,1
		100 nM VD	1,98	60,9
		etanol	1,84	20,6
	tumoral	2 nM VD	2,00	49,2
		100 nM VD	1,96	19,2
		etanol	1,98	33,8
C49	normal	0,228 nM VD	2,03	15,2
		100 nM VD	2,01	20,3
		etanol	2,02	61,0
	tumoral	2 nM VD	2,03	102,0
		100 nM VD	2,03	87,7
		etanol	2,01	111,9
C50	normal	0,228 nM VD	2,02	67,3
		100 nM VD	2,77	2,5
		etanol	2,05	13,0
	tumoral	2 nM VD	2,06	85,0
		100 nM VD	2,05	92,0
		etanol	2,09	54,7
C51	normal	0,228 nM VD	2,00	19,1
		100 nM VD	1,89	11,4
		etanol	2,03	65,2
	tumoral	2 nM VD	2,20	19,5
		100 nM VD	2,11	76,9
		etanol	2,23	4,6
C52	normal	0,228 nM VD	1,82	19,3
		100 nM VD	1,83	12,0
		etanol	1,91	8,2
	tumoral	2 nM VD	2,02	38,6
		100 nM VD	2,01	292,2
		etanol	2,01	101,7
C53	normal	0,228 nM VD	1,85	14,1
		100 nM VD	2,01	70,5
		etanol	2,09	37,9
	tumoral	2 nM VD	2,03	243,1
		100 nM VD	2,05	127,0
		etanol	2,04	101,5
C54	normal	0,228 nM VD	1,90	13,3
		100 nM VD	1,94	43,0
		etanol	2,06	110,4
	tumoral	2 nM VD	1,82	5,1
		100 nM VD	2,02	236,8
		etanol	1,85	21,4
C55	normal	0,228 nM VD	1,96	98,0

		100 nM VD	1,93	87,9
		etanol	1,90	42,6
	tumoral	2 nM VD	1,91	288,9
		100 nM VD	1,89	137,3
		etanol	1,88	193,3
C56	normal	0,228 nM VD	1,94	92,8
		100 nM VD	1,94	346,1
		etanol	1,89	249,9
	tumoral	2 nM VD	1,96	391,8
		100 nM VD	1,97	181,0
		etanol	1,96	316,5
C57	normal	0,228 nM VD	1,96	161,7
		100 nM VD	1,92	146,4
		etanol	1,92	72,7
	tumoral	2 nM VD	1,93	147,8
		100 nM VD	1,91	85,0
		etanol	1,96	180,4
C58	normal	0,228 nM VD	2,04	97,6
		100 nM VD	1,91	19,0
		etanol	2,02	66,6
	tumoral	2 nM VD	2,01	52,3
		100 nM VD	2,04	127,2
		etanol	2,06	129,0
C59	normal	0,228 nM VD	1,95	47,0
		100 nM VD	1,94	19,9
		etanol	1,99	79,7
	tumoral	2 nM VD	2,02	40,5
		100 nM VD	2,05	140,6
		etanol	1,95	40,9
C60	normal	0,228 nM VD	2,03	88,0
		100 nM VD	1,94	48,9
		etanol	1,92	159,0
	tumoral	2 nM VD	2,05	113,9
		100 nM VD	2,01	111,7
		etanol	1,99	48,5
C61	normal	0,228 nM VD	2,01	84,3
		100 nM VD	1,81	20,6
		etanol	2,03	45,9
	tumoral	2 nM VD	2,01	538,0
		100 nM VD	2,05	811,3
		etanol	1,99	423,6
C62	normal	0,228 nM VD	2,00	66,9
		100 nM VD	2,00	74,6
		etanol	1,99	168,1
	tumoral	2 nM VD	1,97	384,9

		100 nM VD	1,96	194,2
		etanol	2,02	172,1
C63	normal	0,228 nM VD	2,03	168,0
		100 nM VD	1,97	65,8
		etanol	2,00	241,5
	tumoral	2 nM VD	2,01	282,5
		100 nM VD	2,03	273,0
		etanol	2,00	350,3
C64	normal	0,228 nM VD	2,02	131,5
		100 nM VD	2,02	152,6
		etanol	2,00	115,6
	tumoral	2 nM VD	2,03	182,3
		100 nM VD	2,00	77,3
		etanol	2,00	126,3
C65	normal	0,228 nM VD	2,03	145,7
		100 nM VD	2,02	86,4
		etanol	2,01	82,2
	tumoral	2 nM VD	2,00	158,1
		100 nM VD	1,99	189,0
		etanol	2,00	251,8
C66	normal	0,228 nM VD	2,09	27,6
		100 nM VD	2,04	72,5
		etanol	1,80	4,0
	tumoral	2 nM VD	2,04	133,2
		100 nM VD	2,10	19,8
		etanol	2,55	6,2
C67	normal	0,228 nM VD	2,04	24,1
		100 nM VD	2,08	34,6
		etanol	1,98	50,9
	tumoral	2 nM VD	2,09	56,4
		100 nM VD	2,05	74,6
		etanol	2,08	44,9
C68	normal	0,228 nM VD	2,03	58,7
		100 nM VD	2,05	122,9
		etanol	2,00	60,0
	tumoral	2 nM VD	1,97	307,5
		100 nM VD	2,05	133,1
		etanol	2,08	21,1
C69	normal	0,228 nM VD	1,95	42,5
		100 nM VD	2,04	55,4
		etanol	2,05	93,0
	tumoral	2 nM VD	2,06	81,8
		100 nM VD	2,05	56,4
		etanol	2,06	145,7
C70	normal	0,228 nM VD	1,84	388,5

		100 nM VD	2,00	219,0
		etanol	2,01	90,2
	tumoral	2 nM VD	1,98	165,7
		100 nM VD	2,00	144,6
		etanol	2,01	145,1

- ANEXO I -

Protocolo da reação de imunistoquímica

1. Desparafinização dos cortes de 3 μ m de espessura, do material incluído em parafina, e deixadas por 24 horas em estufa 60°C;
2. Xilol a 60°C por 20 minutos;
3. Xilol à temperatura ambiente por 20 minutos;
4. Etanol 100% por 30 segundos;
5. Etanol 85% por 30 segundos;
6. Etanol 70% por 30 segundos;
7. Lavar as lâminas em água corrente e destilada;
8. Ferver a solução tampão citrato 10 mM pH 6.0 em panela de pressão (Solar, Rapid Express, Tramontina®) destampada;
9. Mergulhar as lâminas na solução em ebulição;
10. Lacrar a panela com a válvula seletora de pressão no número 2;
11. Após a pressurização total cronometrar 3 minutos;
12. Girar a válvula seletora de pressão para liberação de vapor e deixar a panela fechada sob água corrente até a depressurização total;
13. Destampar a panela e lavar as lâminas em água corrente e destilada;
14. Proceder ao bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3%, com 4 trocas de 5 minutos cada;
15. Lavar em água corrente e destilada;
16. Lavar com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10 mM pH 7.4 por 5 minutos;
17. Incubar com o Protein Block (Leica cat#RE7158, Newcastle, Reino Unido) por 5 minutos à temperatura ambiente;
18. Desprezar o bloqueador e incubar as lâminas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN₃) 0,1%, por 30 minutos à 37°C e por 18 horas à 4°C em câmara úmida;
19. Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada;
20. Incubar por 30 minutos à 37° C com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer, Leica cat# RE7260-k, Reino Unido);
21. Lavar com tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada;
22. Incubar com o NovoLink Polymer por 30 minutos à 37° C. Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada;
23. Incubar as lâminas em solução substrato: 100 mg de 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, cat# D-5637, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) (JT Baker, Phillipsburg, NJ, EUA); 1 mL de H₂O₂ 6%; 100 mL de PBS; por 5 minutos à 37°C, ao abrigo da luz;
24. Observar ao microscópio, nas lâminas controles, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação;
25. Lavar em água corrente e água destilada por 3 minutos;
26. Contracorar com Hematoxilina de Harris por 1 minuto;
27. Lavar bem em água corrente e destilada;
28. Imergir 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada;
29. Desidratar as lâminas em:
 - a. Etanol 80%, 30 segundos;
 - b. Etanol 95%, 30 segundos;
 - c. Etanol 100% 2 vezes, 30 segundos cada;
30. Xilol 4 vezes, 30 segundos cada;
31. Montagem das lâminas em Entellan neu (Merck, 1.07961, Alemanha).

- ANEXO J -

Dados clínicos das pacientes portadoras de tumor de mama

Paciente	Idade (anos)	Raça	Castrada	Contraceptivos	Pseudogestação	T	N	M	Estadio Clínico
C1*	8	Husky Siberiano	Não	Não	Sim	3	0	0	III
C2*	9	Poodle	Sim	Não	Sim	3	0	0	III
C3*	ND	SRD	ND	ND	ND	3	0	0	III
C4*	7	SRD	ND	ND	ND	2	0	0	II
C5	10	SRD	Sim	Não	Sim	2	0	0	II
C6	10	Poodle	Sim	Não	Não	3	0	0	III
C7	7	Cocker Spaniel	Sim	Não	Sim	2	0	0	II
C8	7	Teckel	Não	Não	Não	1	0	0	I
C9	12	SRD	Não	Não	Sim	3	0	0	III
C10	8	Dog Alemão	Sim	Não	Sim	3	0	0	III
C11	7	Yorkshire	Não	Não	Sim	2	0	0	II
C12	12	Teckel	Não	Não	Sim	1	0	0	I
C13	6	Rottweiler	Sim	Não	Sim	3	0	0	III
C14	8	Pitbull	Não	Não	Sim	2	0	0	II
C15	7	Poodle	Não	Não	Sim	1	0	0	I
C16	7	Boxer	Não	Não	Sim	3	0	1	V
C17	11	Teckel	Sim	Não	Sim	2	0	0	II
C18	10	Poodle	Sim	Não	Sim	1	0	0	I
C19	11	SRD	Não	Não	Sim	3	0	0	III
C20	13	SRD	Não	Não	Sim	3	1	0	IV
C21	13	Teckel	Não	Não	Sim	2	0	0	II
C22	9	SRD	Não	Não	Sim	1	0	0	I
C23	8	SRD	Não	Não	Sim	2	0	0	II
C24	8	Boxer	Não	Não	Sim	1	0	0	I
C25	9	Labrador	Não	Não	Sim	2	0	0	II
C26	7	Teckel	Não	Não	Sim	1	0	0	I
C27	8	Pastor Alemão	Não	Não	Sim	2	0	0	II
C28	9	Poodle	Não	Não	Não	3	1	0	III
C29	9	SRD	Não	Não	Sim	1	0	0	I
C30**	12	Poodle	Não	Não	Sim	1	0	0	I
C31**	6	Poodle	Não	Não	Não	1	0	0	I
C32	12	Boxer	Não	Não	Sim	3	1	0	IV
C33	15	Poodle	Não	Não	Sim	3	0	0	III
C34	11	Cocker spaniel	Não	Não	Sim	3	0	0	III
C35	7	Poodle	Não	Não	Sim	1	0	0	I
C36	8	Pinscher	Não	Não	Sim	1	0	0	I
C37	8	Boxer	Não	Não	Sim	2	0	0	II
C38	14	Rottweiler	Sim	Não	Não	3	0	0	III
C39	10	Cocker spaniel	Não	Não	Sim	1	0	0	I
C40	8	Poodle	Não	Não	Sim	1	0	0	I
C41	14	Cocker spaniel	Não	Sim	Não	2	0	0	II
C42	11	Boxer	Não	Não	Não	3	1	0	IV
C43	9	Poodle	Não	Não	Não	1	1	0	IV
C44	10	Labrador	Sim	Não	Sim	3	0	0	III
C45	8	Teckel	Não	Sim	Não	1	0	0	I
C46	9	Bulldog	Sim	Não	Sim	1	0	0	I
C47	12	Boxer	Não	Não	Sim	3	0	0	III
C48	11	SRD	Não	Não	Não	3	1	0	IV
C49	10	Schnauzzer	Sim	Não	Sim	2	0	0	II
C50	13	Poodle	Sim	Não	Não	2	0	0	II
C51	9	Lhasa apso	Não	Não	Não	2	0	0	II
C52	8	Boxer	Não	Não	Sim	3	0	0	III
C53	9	Rottweiler	Não	Não	Sim	3	0	0	III
C54	14	Poodle	Não	Não	Sim	2	0	0	II

C55	8	Cocker spaniel	Não	Não	Não	2	0	0	II
C56	10	Pitbull	Não	Não	Sim	3	0	0	III
C57	10	Cocker spaniel	Não	Não	Não	3	0	0	III
C58	12	Poodle	Não	Não	Sim	3	1	0	IV
C59	14	SRD	Não	Não	Sim	3	1	0	IV
C60	13	Cocker spaniel	Não	Não	Sim	2	1	0	IV
C61	11	Akita	Não	Não	Não	2	0	0	II
C62	8	Cocker spaniel	Não	Não	Sim	1	0	0	I
C63	9	Poodle	Não	Não	Sim	1	0	0	I
C64	16	Poodle	Sim	Não	Sim	2	0	0	II
C65	11	Poodle	Não	Não	Sim	2	0	0	II
C66	11	Pinscher	Não	Não	Não	3	1	0	IV
C67	7	Rottweiler	Não	Não	Sim	3	0	0	III
C68	14	Poodle	Não	Não	Não	3	1	0	III
C69	8	Pastor Alemão	Não	Não	Sim	1	0	0	I
C70	10	Cocker spaniel	Não	Não	Não	3	0	0	III

* Essas amostras foram utilizadas como ensaio piloto.

** Foram coletadas apenas amostra de sangue; o tumor era muito pequeno para tratamento em cultura.

ND = não disponível

- ANEXO K -

Dados das pacientes portadoras de tumor de mama relacionados com a vitamina D

Amostr a	Ração	Comida Caseira/Suplementos	Exposiçã o solar	Pêlo
C5	Friskie (Nestlé) – vegetais	Não	Sim	Curto/Escuro
C6	Canibelo	Carne moída/Frango/Pão/Fruta	Sim	Curto/Escuro
C7	Premier (Golden)	Não	Sim	Comprido/Escuro
C8	Pedigree	Cenoura/Frutas	Sim	Curto/Escuro
C9	Nero	Tudo	Sim	Curto/Malhado
C10	Ração – não lembra	Não	Sim	Curto/Escuro
C11	Pedigree	Arroz/carne/frutas	Sim	Curto/Malhado
C12	Pedigree	Peixe	Sim	Curto/Escuro
C13	Premier (Rott)	Não	Sim	Curto/Escuro
C14	Lider Chips	Carne	Sim	Curto/Escuro
C15	Royal Canin	Não	Sim	Comprido/Claro
C16	Foster	Carne/Frango/Arroz	Sim	Curto/Claro
C17	Pedigree (Raças pequenas)	Carne/Frango/Arroz/Pão/ Mamão/Queijo Branco	Sim	Curto/Escuro
C18	Não	Carne/Frango/Arroz/ Cenoura/Batata	Não	Comprido/Claro
C19	Pedigree	Coração de boi/ Fígado/Leite	Sim	Comprido/Claro
C20	Canitos adulto	Carne/Pão/Leite	Sim	Curto/Intermediári o
C21	Alpo	Carne/Frango/Mamão	Sim	Curto/Escuro
C22	Master (amarelo)	Carne/Frutas/Leite/Latinha/Fígad o	Sim	Curto/Claro
C23	Não	Restos	Sim	Curto/Escuro
C24	Proplan (Senior)	Carne/Frutas	Sim	Curto/Claro
C25	Excelence (Light)	Legumes/Cápsulas W3	Sim	Curto/Escuro
C26	Dog Show	Frutas/Arroz	Sim	Curto/Escuro
C27	Pedigree	Frutas/Carne	Sim	Comprido/Escuro
C28	Magnus Premium	Não	Sim	Comprido/Claro
C29	Pedigree/Dog Chow	Arroz/Cenoura/Frutas	Sim	Curto/Claro
C30	Foster mix	Fruta/Salada/Arroz/Carne/Frango	Sim	Curto/Claro
C31	Proplan (Adulto)	Frango/Arroz	Sim	Curto/Escuro
C32	Big Boss	Carne/Arroz/Leite	Sim	Curto/Malhado
C33	Não	Carne/Frango/Sardinha/Legume/ Arroz/Fígado/Leite/Granola/Peixe	Sim	Curto/Escuro
C34	Champ	Carne/Pão/Leite/Arroz/Osso	Sim	Comprido/Escuro
C35	Alpo	Carne/Frango/Peixe/Fígado	Sim	Comprido/Claro
C36	Pedigree (Senior)	Carne/Frango/Peixe	Sim	Curto/Escuro
C37	Pedigree (Senior)	Carne/Frango/Arroz	Sim	Curto/Malhado
C38	Sopão/Foster/Lí der	Carne/Leite	Sim	Comprido/Escuro
C39	Excelence (Light)	Não	Não	Comprido/Claro

C40	Pedigree – raças pequenas adulto	Frango/Carne	Sim	Comprido/Malhado
C41	Nero	Carne/Frango/Peixe/Fígado/ Arroz/Feijão/Leite/Legumes	Sim	Comprido/Malhado
C42	Royal Canin (special croc)	Não	Sim	Curto/Escuro
C43	Royal Canin	Pão/Leite/Frutas	Sim	Comprido/Claro
C44	Smart (adulto)	Arroz/Pão/Carne	Sim	Curto/Claro
C45	Premier Adulto Salmão	Vegetais	Sim	Curto/Escuro
C46	Royal Canin Senior	Não	Sim	Curto/Claro
C47	Eukanuba Senior	Não	Sim	Curto/Claro
C48	Não Lembra	Carne/Frango/Peixe/ Fígado/Arroz/Leite	Sim	Comprido/Escuro
C49	Pedigree Junior	Arroz/Frango/Legume/ Carne/Maçã/Leite	Sim	Comprido/Malhado
C50	Royal Canin Hepatic	Não	Sim	Comprido/Claro
C51	Pedigree (senior)	Mamão/Maçã	Sim	Comprido/Branco
C52	Maxi + Nhoc	Pão/Fruta/Verdura/Osso/Carne/ Peixe	Sim	Curto/Escuro
C53	Champion (pacote laranja)	Carne/Leite	Sim	Curto/Escuro
C54	Não	Arroz/Carne	Sim	Comprido/Branco

- ANEXO L -

Dosagem sérica de 25(OH)D₃ de cadelas portadoras de neoplasias mamárias

Amostra	[] sérica ng/mL das amostras
C5	14,78
C6	22,08
C7	19,36
C8	28,62
C9	28,08
C10	27,86
C11	15,79
C12	48,38
C13	41,47
C14	18,26
C15	32,87
C16	18,37
C17	14,47
C18	7,49
C19	42,89
C20	10,41
C21	7,78
C22	25,08
C23	11,06
C24	58,61
C25	36,47
C26	51,61
C27	31,03
C28	38,92
C29	22,17
C30	19,35
C31	45,69
C32	29,35
C33	31,05
C34	10,11
C35	27,67
C36	30,13
C37	40,99
C38	9,61
C39	16,09
C40	10,89
C41	14,41
C42	18,45
C43	60,33

* valores de referência: 19 – 140 ng/mL (Gerber *et al.*, 2004)

- ANEXO M -

Dosagem sérica de 25(OH)D₃ de cadelas saudáveis

Amostra	[] sérica ng/mL das amostras
1	30,19
2	17,31
3	24,45
5	16,54
6	7,73
8	16,66
10	17,90
11	24,38
12	10,58
15	17,11
16	12,19
17	14,08
18	32,59
19	9,05
20	9,36
21	17,31
22	8,84
24	28,74
25	27,64
27	20,45
29	27,26
30	5,05
31	23,74
33	34,17
34	26,18
35	44,22
38	13,74
39	15,55
40	19,06
43	15,16
44	18,18
45	31,15
46	33,89
47	33,03
48	28,22
49	19,20
50	19,28
52	26,07
53	20,99
54	23,61
55	19,34
56	42,59
58	22,83
60	24,70
63	28,94
64	14,88
67	30,30
69	40,67
70	43,81
71	33,11

* valores de referência: 19 – 140 ng/mL (Gerber *et al.*, 2004)

- ANEXO N -

Dosagem sérica de 25(OH)D₃ de cães machos saudáveis

Amostra	[] sérica ng/mL das amostras
4	52,91
7	29,63
9	3,37
13	32,59
14	29,78
26	48,30
32	32,07
36	24,22
42	18,45
51	21,25
59	18,10
61	82,54
65	20,69
68	40,68

* valores de referência: 19 – 140 ng/mL (Gerber *et al.*, 2004)

8. REFERÊNCIAS

Ainsleigh HG. Beneficial effects of sun exposure on cancer mortality. *Preventive medicine*. 1993; 22(1): 132-140.

Barbosa EM, Nonogaki S, Katayama ML, Folgueira MA, Alves VF, Brentani MM. Vitamin D3 modulation of plasminogen activator inhibitor type-1 in human breast carcinomas under organ culture. *Virchows Archiv: an international journal of pathology*. 2004; 444(2): 175-82.

Beer TM, Ryan CW, Venner PM, Petrylak DP, Chatta GS, Ruether JD, Redfern CH, Fehrenbacher L, Saleh MN, Waterhouse DM, Carducci MA, Vicario D, Dreicer R, Higano CS, Ahmann FR, Chi KN, Henner WD, Arroyo A, Clow FW; ASCENT Investigators. Double-blinded randomized study of high-dose calcitriol plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel in androgen-independent prostate cancer: a report from the ASCENT Investigators. *Journal of Clinical Oncology*. 2007; 25(6): 669-74.

Beha G, Brunetti B, Asproni P, Muscatello LV, Millanta F, Poli A, Sarli G, Benazzi C. Molecular portrait-based correlation between primary canine mammary tumor and its lymph node metastasis: possible prognostic-predictive models and/or stronghold for specific treatments? *BMC Vet Res*. 2012; 8: 219.

Benjamin SA, Lee AC, Saunders WJ. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. *Veterinary Pathology*. 1999; 36(5): 423-436.

Bertone-Johnson ER, Chen WY, Holick MF, Hollis BW, Colditz GA, Willett WC, Hankinson SE. Plasma 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D and risk of breast cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*. 2005; 14(8):1991-1997.

Berwick M, Armstrong BK, Ben-Porat L, Fine J, Kricker A, Eberle C, Barnhill R. Sun exposure and mortality from melanoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005; 97(3):195-199.

Bouillon R, Okamura WH, Norman AW. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocrine reviews*. 1995; 16(2): 200-57.

Bower M, Colston KW, Stein RC, Hedley A, Gazet JC, Ford HT, Combes RC. Topical calcipotriol treatment in advanced breast cancer. *Lancet*. 1991; 337(8743): 701-702.

Campbell MJ, Koeffler HP. Toward therapeutic intervention of cancer by vitamin D compounds. *J Natl Cancer Inst*. 1997; 89: 182-185.

Chapuy MC, Arlot ME, Duboeuf F, Brun J, Crouzet B, Arnaud S, Delmas PD, Meunier PJ. Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in the elderly women. *The New England journal of medicine*. 1992; 327(23): 1637-1642.

Cunningham NS, Lee BS, Henry HL. The renal mitochondrial metabolism of 25-hydroxyvitamin D-3: a possible role for phospholipids. *Biochimica et biophysica acta*. 1986; 881(3): 480-8.

Davies J, Heeb H, Garimella R, Templeton K, Pinson D, Tawfik O. Vitamin D receptor, retinoid x receptor, ki-67, survivin, and ezrin expression in canine osteosarcoma. *Vet Med Int*. 2012; 2012:761034.

Dawson-Hughes B, Harris SS, Krall EA, Dallal GE. Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older. *The New England journal of medicine*. 1997; 337(10): 670-6.

De Las Mulas JM, Millán Y, Dios R. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Vet Pathol*. 2005; 42(2): 200-212.

De Nardi AB, Rodaski S, Sousa RS, Costa TA, Macedo TR, Rodigheri SM, Rios A, Piekarczyk CH. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. *Archives of Veterinary Science*. 2002; 7(2): 15-26.

Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature*. 1998; 392(6675):505-509.

Dillitzer N, Becker N and Kienzle E. Intake of minerals, trace elements and vitamins in bone and raw food rations in adult dogs. *British Journal of Nutrition*, 2011; 106 (S1) S53-S56.

Dobson JM, Samuel S, Milstein H, Rogers K, Wood JL. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *The Journal of small animal practice*. 2002; 43(6): 240-246.

Dutra AP, Granja NVM, Schmitt FC, Cassali GD: c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2004; 37: 1673-1681.

Egenvall A, Bonnett BN, Ohagen P, Olson P, Hedhammar A, 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*. 2005; 69(1-2): 109-127.

Eigeliene N, Härkönen P, Erkkola R. Effects of estradiol and medroxyprogesterone acetate on morphology, proliferation and apoptosis of human breast tissue in organ cultures. *BMC Cancer*. 2006; 6:246.

Eigeliene N, Härkönen P, Erkkola R. Effects of estradiol and medroxyprogesterone acetate on expression of the cell cycle proteins cyclin D1, p21 and p27 in cultured human breast tissues. *Cell Cycle*. 2008; 7(1):71-80.

Elstner E, Heber D, Koeffler HP. 20-Epi-vitamin D3 analogs. Potent modulators of proliferation and differentiation of breast cancer cell lines in vitro. *Adv Exp Med Biol*. 1996; 399:53-70.

Escaleira MT, Brentani MM. Vitamin D₃ receptor (VDR) expression in HC-11 mammary cell: regulation by growth-modulatory agents, differentiation, and H_a-ras transformation. *Breast Cancer Res. Treat.* 1999; 54(2): 123-133.

Gallagher R, Keighley J, Tancabelic J, Garimella R, Pinson D, Templeton K, Tawfik O. Clinicopathologic correlation of vitamin D receptor expression with retinoid X receptor and MIB-1 expression in primary and metastatic osteosarcoma. *Ann Diagn Pathol*. 2012;16(5):323-9.

Galler A, Tran JL, Krammer-Lukas S, Höller U, Thalhammer JG, Zentek J, Willmann M. Blood vitamin levels in dogs with chronic kidney disease. *The Veterinary Journal*. 2012; 192: 226–231.

Gama A.; Alves A.; Gartner F.; Schmitt F. p63: a novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues. 2003; *Veterinary Pathology*. 40(4):412-20.

Gama A, Alves A, Schmitt F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Archiv: an international journal of pathology*. 2008; 453(2): 123-132.

Gandini S, Boniol M, Haukka J, Byrnes G, Cox B, Sneyd MJ, Mullie P, Autier P. Meta-analysis of observational studies of serum 25-hydroxyvitamin D levels and colorectal, breast and prostate cancer and colorectal adenoma. *Int J Cancer*. 2011; 128(6): 1414-24.

Garland CF, Garland FC, Gorham ED: Calcium and vitamin D. Their potential roles in colon and breast cancer prevention. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999; 889: 107-19.

Gärtner F, Geraldés M, Cassali, GD et al. DNA measurement and immunohistochemical characterization of epithelial and mesenchymal cells in canine mixed mammary tumours: putative evidence for a common histogenesis. 1999; *Veterinary Journal*. 158: 39-47.

Gerber B, Hauser B, Reusch CE: Serum levels of 25-hydroxycholecalciferol and 1,25-dihydroxycholecalciferol in dogs with hypercalcaemia. *Veterinary research communications*. 2004; 28(8): 669-680.

Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V: Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol*. 2011; 48(1):117-31.

Gow AG, Else R, Evans H, Berry JL, Herrtage ME, Mellanby RJ. Hypovitaminosis D in dogs with inflammatory bowel disease and hypoalbuminaemia. *J Small Anim Pract*. 2011; 52(8):411-8.

Gross KL, Wedekind KJ, Cowell CS, Schoenherr WD, Jewell DE, Zicker SC, Debraekeleer J, Frey RA. Nutrients. In: Hand MS, Thatcher CD, Remmildard RL, Roudebush P. *Small Animal Clinical Nutrition*. 4^a ed. Kansas: Mark Morris Institute, 2000, p. 84-86.

Hanchette CL, Schwartz GG. Geographic patterns of prostate cancer mortality. Evidence for a protective effect of ultraviolet radiation. *Cancer*. 1992; 70(12): 2861-2869.

Hazewinkel HAW, Tryfonidou MA. Vitamin D3 metabolism in dogs. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2002; 197:23-33.

Hutchinson D, Freeman LM, McCarthy R, Anastasio J, Shaw SP, Sutherland-Smith J. Seizures and severe nutrient deficiencies in a puppy fed a homemade diet. *J Am Vet Med Assoc*. 2012; 241(4):477-83.

Hengst L, Reed SI. Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science*. 1996; 271:1861-1864.

Holick MF. The cutaneous photosynthesis of previtamin D3: a unique photoendocrine system. *The Journal of investigative dermatology*. 1981; 77(1):51-58.

How KL, Hazewinkel HA, Mol JA. Dietary vitamin D dependence of cat and dog due to inadequate cutaneous synthesis of vitamin D. *Gen Comp Endocrinol*. 1994; 96(1):12-8.

How KL, Hazewinkel HA, Mol JA. Photosynthesis of vitamin D in the skin of dogs, cats and rats. *Veterinary Quarterly*. 1995; 17(Suppl 1):S29.

Hsu WL, Huang HM, Liao JW, Wong ML, Chang SC. Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. *Vet J*. 2009; 180(1):116-23.

Husain K, Francois RA, Hutchinson SZ, Neuger AM, Lush R, Coppola D, Sebt S, Malafa MP. Vitamin E delta-tocotrienol levels in tumor and pancreatic tissue of mice after oral administration. *Pharmacology*. 2009; 83(3):157-63.

Im KS, Kim NH, Lim HY, Kim HW, Shin JI, Sur JH. Analysis of a New Histological and Molecular-Based Classification of Canine Mammary Neoplasia. *Vet Pathol*. 2013 Sep 3. [Epub ahead of print]

James SY, Mackay AG, Colston KW. Effects of 1,25 dihydroxyvitamin D3 and its analogues on induction of apoptosis in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1996; 58:395-401.

Janowsky EC, Lester GE, Weinberg CR, Millikan RC, Schildkraut JM, Garrett PA, Hulka BS. Association between low levels of 1,25-dihydroxyvitamin D and breast cancer risk. *Public health nutrition*. 1999; 2(3): 283-91.

Kaewsakhorn T, Kisseberth WC, Capen CC, Hayes KA, Calverley MJ, Inpanbutr N. Effects of calcitriol, seocalcitol, and medium-chain triglyceride on a canine transitional cell carcinoma cell line. *Anticancer Research*. 2005; 25(4):2689-2696.

Katayama MLH, Pasini FS, Folgueira MAAK, Snitcovsky IML, Brentani MM. Molecular targets of 1,25(OH)2D3 in HC11 normal mouse mammary cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003; 84(1): 57-69.

Kerner SA, Scott RA, Pike JW. Sequence elements in the human osteocalcin gene confer basal activation and inducible response to hormonal vitamin D3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989, 86(12):4455-9.

Kim HJ, Lee YM, Ko BS, Lee JW, Yu JH, Son BH, Gong GY, Kim SB, Ahn SH. Vitamin D deficiency is correlated with poor outcomes in patients with luminal-type breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2011; 18(7):1830-6.

Kim NH, Lim HY, Im KS, Kim JH, Sur JH. Identification of Triple-negative and Basal-like Canine Mammary Carcinomas using Four Basal Markers. *Journal of Comparative Pathology*. 2013; 148(4): 298–306.

Klopfleisch R, Gruber AD. Differential expression of cell cycle regulators p21, p27 and p53 in metastasizing canine mammary adenocarcinomas versus normal mammary glands. *Res Vet Sci*. 2009; 87(1):91-6.

Klopfleisch R, Klose P, Costa A, Brunnberg L, Gruber AD. HEPACAM1 and 2 are differentially regulated in canine mammary adenomas and carcinomas and its lymph node metastases. *BMC Veterinary Research* 2010; 6:15.

Klopfleisch R, von Euler H, Sarli G, Pinho SS, Gärtner F, Gruber AD. Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: news from an old disease. *Vet Pathol*. 2011; 48(1): 98-116.

Kobayashi T, Hashimoto K, Yoshikawa K. Growth inhibition of human keratinocytes by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is linked to dephosphorylation of retinoblastoma gene product. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993; 196: 487-493.

Kunakornsawat S, Rosol TJ, Capen CC, Omdahl JL, Leroy BE, Inpanbutr N. Effects of 1,25(OH)₂D₃, 25OHD₃, and EB1089 on cell growth and Vitamin D receptor mRNA and 1 α -hydroxylase mRNA expression in primary cultures of the canine prostate. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2004; 89-90: 409-412.

Kunakornsawat S, Rosol TJ, Capen CC, Reddy GS, Binderup L, Inpanbutr N. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃] and its analogues (EB1089 and analog V) on canine adenocarcinoma (CAC-8) in nude mice. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2002; 25(5): 642-647.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* (San Diego, Calif.) [Internet]. Elsevier; 2001 Dec [cited 2012 Oct 3];25(4):402–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202301912629>

Liu M, Lee MH, Cohen M, Bommakanti M, Freedman LP. Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D₃ leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev*. 1996; 10: 142-153.

Lowe LC, Guy M, Mansi JL, Peckitt C, Bliss J, Wilson RG, Colston KW. Plasma 25-hydroxy vitamin D concentrations, vitamin D receptor genotype and breast cancer risk in a UK Caucasian population. *European journal of cancer*. 2005; 41(8):1164-9.

Lyra EC, Silva IA, Katayama ML, Brentani MM, Nonogaki S, Góes JC, Folgueira MA. 25(OH)D₃ and 1,25(OH)₂D₃ serum concentration and breast tissue expression of 1 α -hydroxylase, 24-hydroxylase and Vitamin D receptor in women with and without breast cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2006; 100(4-5): 184-192.

MacEwen EG. Spontaneous tumors in dogs and cats: Models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer and Metastases Review*. 1990; 9(1): 125-136.

MacEwen EG, Patnaik AK, Harvey HJ, Panko WB. Estrogen receptors in canine mammary tumors. *Cancer Research*. 1982; 42: 2255-2259.

Maeda SS, S Kunii IS, Hayashi LF, Lazaretti-Castro M. Increases in summer serum 25-hydroxyvitamin D (25OHD) concentrations in elderly subjects in São

Paulo, Brazil vary with age, gender and ethnicity. *BMC Endocrine Disorders*. 2010; 10:12.

Malik R, Laing C, Davis PE, Allan GS, Wigney DI. Rickets in a litter of racing greyhounds. *Journal of Small Animal Practice*. 1997; 38(3): 109-114.

Malone EK, Rassnick KM, Wakshlag JJ, Russell DS, Al-Sarraf R, Ruslander DM, Johnson CS, Trump DL. Calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) enhances mast cell tumour chemotherapy and receptor tyrosine kinase inhibitor activity *in vitro* and has single-agent activity against spontaneously occurring canine mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*. 2010; 8(3): 209-20.

Mellanby RJ, Mee AP, Berry JL, Herrtage ME. Hypercalcaemia in two dogs caused by excessive dietary supplementation of vitamin D. *Journal of Small Animal Practice*. 2005; 46(7): 334-338.

Milani C, Welsh J, Katayama ML, Lyra EC, Maciel MS, Brentani MM, Folgueira MA. Human breast tumor slices: a model for identification of vitamin D regulated genes in the tumor microenvironment. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010; (1-2):151-5.

Milani C, Katayama ML, de Lyra EC, Welsh J, Campos LT, Brentani MM, Maciel Mdo S, Roela RA, del Valle PR, Góes JC, Nonogaki S, Tamura RE, Folgueira MA. Transcriptional effects of 1,25 dihydroxyvitamin D(3) physiological and supra-physiological concentrations in breast cancer organotypic culture. *BMC Cancer*. 2013;13:119.

Millanta F, Calandrella M, Bari G, Niccolini M, Vannozzi I, Poli A. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Res Vet Sci*. 2005; 79: 225-232.

Misdorp W. Progestogens and mammary tumors in dogs and cats. *Acta Endocrinol (Copen)*. 1991; 125(suppl): 27-31.

Misdorp W. Tumors of the mammary gland. In: Meuten DJ. *Tumors in Domestic Animals*. 4a. ed. Iowa: Blackwell Publishing Company, 2002; p.575-606.

Moan J, Lagunova Z, Bruland O, Juzeniene A. Seasonal variations of cancer incidence and prognosis. *Dermato Endocrinology*. 2010; 2:2, 55-57;

Morrison TB, Weiss JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR green I monitoring during amplification. *Biotechniques*. 1998; 24(6): 954-958, 960, 962.

Mottollesse M, Morelli L, Agrimi U, Benevolo M, Sciarretta F, Antonucci G, Natali GN. Spontaneous Canine Mammary Tumors – A Model for Monoclonal

Antibody Diagnosis and Treatment of Human Breast Cancer. *Laboratory Investigation*. 1994; 71(2): 182.

Moulton JE. Tumor of the mammary gland. In: Moulton JE. *Tumors in domestic animals*. 3th ed, University of Californi Press. 1990; 518-549.

Murillo G, Mehta RG. Chemoprevention of chemically-induced mammary and colon carcinogenesis by 1alpha-hydroxyvitamin D₅. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2005; 97(1-2):129-36,.

Narvaez CJ, VanWeelden K, Byrne I, Welsh JE. Characterization of a Vitamin D₃ resistant MCF-7 cell line. *Endocrinology*. 1996; 137: 400-409.

Narvaez CJ, Zinser G, Welsh JE. Functions of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in mammary gland: from normal development to breast cancer. *Steroids*. 2001; 66: 301-308.

Naves, MMV, Silveira ER, Dagli MLZ, Moreno FS. Effects of β -carotene and vitamin A on oval cell proliferation and connexin 43 expression during hepatic differentiation in the rat. *J. Nutr. Biochem*. 2001; 12: 685-692.

Ohyama Y, Ozono K, Uchida M, Shinki T, Kato S, Suda T, Yamamoto O, Noshiro M, Kato Y. Identification of a vitamin D-responsive element in the 5'-flanking region of the rat 25-hydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase gene. *The Journal of biological chemistry*. 1994; 269(14): 10545-10550.

Ooms ME, Roos JC, Bezemer PD, van der Vijgh WJ, Bouter LM, Lips P. Prevention of bone loss by vitamin D supplementation in elderly women: a randomized double-blind Trial. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1995; 80(4):1052-1058.

Peleteiro MC. Tumores mamários na cadela e na gata. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 1994; 89(509); 10-29.

Philippi ST. Tabela de Composição de Alimentos: Suporte para Decisão Nutricional 2a. Edição -135 páginas – 2002.

Rassnick KM, Muindi JR, Johnson CS, Balkman CE, Ramnath N, Yu WD, Engler KL, Page RL, Trump DL. *In vitro* and *in vivo* evaluation of combined calcitriol and cisplatin in dogs with spontaneously occurring tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008; 62: 881-891.

Rassnick KM, Muindi JR, Johnson CS, Bailey DB, Trump DL. Oral bioavailability of DN101, a concentrated formulation of calcitriol, in tumor-bearing dogs. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011; 67(1): 165-71.

Ressel L, Puleio R, Loria GR, Vannozzi I, Millanta F, Caracappa S, Poli A. HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and

neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. *Res Vet Sci.* 2013; 94(2):299-305.

Ribeiro GM, Bertagnolli AC, Rocha RM, Cassali GD. Morphological aspects and immunophenotypic profiles of mammary carcinomas in benign-mixed tumors offemale dogs. *Vet Med Int.* 2012; 2012:432763.

Rungsipipat A, Tateyama S, Yamaguchi R, Uchida K, Miyoshi N, Hayashi T. Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. *J Vet Med Sci.* 1999; 61(1): 27-32.

Russell DS, Rassnick KM, Erb HN, Vaughan MM, McDonough SP. An Immunohistochemical Study of Vitamin D Receptor Expression in Canine Cutaneous Mast Cell Tumours. *J. Comp. Path.* 2010; 143(2-3): 223-6.

Sartin EA, Barners S, Kwapien RP, Wolfe LG. Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. *American Journal of Veterinary Research.* 1992; 53(11): 2196-2200.

Schneider R, Dorn CR, Taylor DO. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *Journal of the National Cancer Institute.* 1969; 43(6): 1249-1261.

Shankar K, Liu X, Singhal R, Chen JR, Nagarajan S, Badger TM, Ronis MJ. Chronic ethanol consumption leads to disruption of vitamin D3 homeostasis associated with induction of renal 1,25 dihydroxyvitamin D3-24-hydroxylase (CYP24A1). *Endocrinology.* 2008; 149(4): 1748-1756.

Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality. *Biometrika* 1965; 52(3): 591-599.

Simboli-Campbell M, Narvaez CJ, Tenniswood M, Welsh, JE. 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ induces morphological and biochemical indices of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1996; 58: 367-376.

Singer J, Weichselbaumer M, Stockner T, Mechtcheriakova D, Sobanov Y, Bajna E, Wrba F, Horvat R, Thalhammer JG, Willmann M, Jensen-Jarolim E. Comparative oncology: ErbB-1 and ErbB-2 homologues in canine cancer are susceptible to cetuximab and trastuzumab targeting. *Mol Immunol.* 2012; 50(4): 200-9.

Silveira ER, Naves, MMV, Vannuchi H, Jordão Jr. AA, Dagli MLZ, Moreno FS. Vitamin A and all-trans and 9-cis retinoic acids inhibit cell proliferation during the progression phase of hepatocarcinogenesis in Wistar rats. *Nutr. Cancer.* 2001; 39: 244-251.

Smedby KE, Hjalgrim H, Melbye M, Torrang A, Rostgaard K, Munksgaard L, Adami J, Hansen M, Porwit-MacDonald A, Jensen BA, Roos G, Pedersen BB, Sundstrm C, Glimelius B, Adami HO. Ultraviolet radiation exposure and risk of malignant lymphomas. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005; 97(3): 199-209.

Sobral RA, Honda, ST, Katayama MLH, Brentani H, Brentani MM, Patro DFC, Folgueira MAAK. Tumor slices as a model to evaluate doxorubicin in vitro treatment and expression of trios of genes PRSS11, MTSS1, CLPTM1 and PRSS11, MTSS1, SMYD2 in canine mammary gland cancer. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2008; 50: 27.

Stahl M, Sundquist AR, Hanusch M, Schwarz W, Sies H. Separation of beta-carotene and lycopene geometrical isomers in biological samples. *Clin Chem*. 1993; 39: 810-814.

Stein T, Morris JS, Davies CR, Weber-Hall SJ, Duffy MA, Heath VJ, Bell AK, Ferrier RK, Sandilands GP, Gusterson BA. Involution of the mouse mammary gland is associated with an immune cascade and an acute-phase response, involving LBP, CD14 and STAT3. *Breast Cancer Res*. 2004;6(2):R75-91.

Toniti W, Buranasinsup S, Kongcharoen A, Charoonrut P, Puchadapirom P, Kasorndorkbua C. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptors in canine mammary tumors. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2009;10(5): 907-11.

Tran JL, Horvath C, Krammer S, Hller U, Zentek J. Blood vitamin concentrations in privately owned dogs fed non-standardized commercial diets and after intake of diets with specified vitamin concentrations. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2007; 91(1-2):40-7.

Urata YN, Lyra EC, Katayama MLH, Basso RA, Assis PEZ, Cardoso APT, Roela RA, Nonogaki S, Ges JCGS, Brentani MM, Folgueira MAAK. Calcitriol supplementation effects on Ki67 expression and transcriptional profile of breast cncer specimens from post-menopausal patients. *Clinical Nutrition*. 2013, [Epub ahead of print].

Uva P, Aurisicchio L, Watters J, Loboda A, Kulkarni A, Castle J, Palombo F, Viti V, Mesiti G, Zappulli V, Marconato L, Abramo F, Ciliberto G, Lahm A, La Monica N, de Rinaldis E. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics*. 2009; 10: 135.

Van Den Bermd GJ, Pols HA, van Leeuwen JP. Anti-tumor effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and vitamin D analogs. *Current pharmaceutical design*. 2000; 6(7): 717-32.

Verlinden L, Verstuyf A, Camp MV, Marclis S, Sabbe K, Zhao PD, Clereq PD, Vanderwalle M, Bouillon R. Two novel 14-epi-analogues of 1,25-

dihydroxyvitamin D₃ inhibit the growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2000; 60(10): 2673-2679.

Wactawski-Wende J, Kotchen JM, Anderson GL, Assaf AR, Brunner RL, O'Sullivan MJ, Margolis KL, Ockene JK, Phillips L, Pottner L, Prentice RL, Robbins J, Rohan TE, Sarto GE, Sharma S, Stefanick ML, Van Horn L, Wallace RB, Whitlock E, Bassford T, Beresford SA, Black HR, Bonds DE, Brzyski RG, Caan B, Chlebowski RT, Cochrane B, Garland C, Gass M, Hays J, Heiss G, Hendrix SL, Howard BV, Hsia J, Hubbell FA, Jackson RD, Johnson KC, Judd H, Kooperberg CL, Kuller LH, LaCroix AZ, Lane DS, Langer RD, Lasser NL, Lewis CE, Limacher MC, Manson JE. Women's Health Initiative Investigators: Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of colorectal cancer. *The New England journal of medicine.* 2006; 354(7): 684-96.

Wakshlag JJ, Rassnick KM, Malone EK, Struble AM, Vachhani P, Trump DL, Tian L. Cross-sectional study to investigate the association between vitamin D status and cutaneous mast cell tumours in Labrador retrievers. *British Journal of Nutrition.* 2011; 106 (S1): S60–S63.

Wilson JD, Foster DW, Williams, Textbook of Endocrinology, 8th ed. Philadelphia: Saunders, 1992.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007; 25(1):118-45.

Wu Y, Craig TA, Lutz WH, Kumar R. Identification of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ response elements in the human transforming growth factor beta 2 gene. *Biochemistry.* 1999; 38(9): 2654-2660.

Yin L, Grandi N, Raum E, Haug U, Arndt V, Brenner H. Meta-analysis: Serum vitamin D and breast cancer risk. *European Journal of Cancer.* 2010; 46: 2196–2205.