RENATA AFONSO SOBRAL

**Expressão de PRSS11, MTSS1, CLPTM1, SMYD2,
NOTCH1 e RPL37A em fatias de carcinoma de mama
de cadelas e correlação com resposta à
doxorubicina *in vitro***

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

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dra. Maria Aparecida Azevedo
Koike Folgueira

São Paulo

2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Sobral, Renata Afonso

Expressão de PRSS11, MTSS1, CLPTM1, SMYD2, NOTCH1 e RPL37A em
fatias de carcinoma de mama de cadelas e correlação com resposta à doxorrubicina
in vitro / Renata Afonso Sobral. -- São Paulo, 2006.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Radiologia.

Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira.

Descritores: 1.Neoplasias mamárias animais 2.Cães 3.Doxorrubicina 4.Expressão
gênica 5.Valor preditivo dos testes

USP/FM/SBD-363/06

Dedico este trabalho aos meus pacientes
que, dignamente, lutam
contra uma doença chamada câncer

Agradecimentos

Aos **meus pais, irmãos e sobrinhos** pela compreensão durante os vários momentos de minha ausência.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira** pelo aceite em orientar um trabalho com enfoque veterinário e também pela primorosa dedicação com que esta pesquisa foi conduzida.

À **Profa. Dra. Maria Mitzi Brentani**, pela determinação em estudar a ciência básica do câncer como também pelo incentivo à oncologia veterinária.

Às amigas do grupo mama, **Lúcia**, pelo companheirismo e sempre plena disposição em ajudar; **Suzana**, uma amizade iniciada na faculdade e sedimentada no trabalho que realizamos na clínica oncológica veterinária; **Cíntia, Ticiane, Rosângela, Patrícia, Rosimeire** e, mais recentemente **Ana Paula**, sempre presentes e atuantes durante os momentos de estudo, trabalho e descontração.

Ao meu amigo **Iran**, que me orientou nas minhas primeiras experimentações em biologia molecular.

Aos amigos que encontrei no Lim24, **Flávia, Fátima, Simone Maistro, Karen, Cristina, Lúcia Valéria, Lílian, Bruno, Camila, Simone, Paula, Graziela, Dr. Igor, Dra. Mirian, Mara, Luciana, Patrícia, Andréia, Shigueko, Terezinha, Maria José, Cristina, Claudete, Jair, Willame, Ivanete** pelo agradável convívio, quase diário, em um laboratório de pesquisa básica.

Ao **Prof. Dr. Humberto Torloni** por ter permitido o processamento dos blocos de histopatologia no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer

A **Prof. Dra. Sueli Nanogaki** pelo auxílio na tentativa de padronização da técnica de imunohistoquímica e aos funcionários Carlos Ferreira Nascimento e Severino da Silva Ferreira, pela realização dos cortes histológicos.

À **Prof Dra. Cláudia Naves Battlehner** do Laboratório de Biologia Celular por me orientar na técnica de contagem celular.

À **Dra. Sheila A Coelho Siqueira** do Laboratório de Patologia do Hospital das Clínicas pelo auxílio na mensuração das fatias de tumores

À **Helena Brentani e Diogo Ferreira da Costa Patrão** do Laboratório de Bioinformática do Hospital do Câncer, pela análise para construção dos planos separatórios entre as amostras estudadas.

À **Elisângela Nivardo Dias**, secretária da pós-graduação do Programa de Oncologia, pela atenção dedicada às minhas necessidade como pós-graduanda.

Aos médicos veterinários **Prof. Dr. Nilton Abreu Zanco e Antero Paulo dos Santos Matias** pelo apoio e permissão em utilizar a estrutura do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Metodista de São Paulo para realização da coleta das amostras das pacientes participantes do estudo. Também gostaria de registrar meu agradecimento a todos os funcionários e colaboradores desta instituição na realização deste trabalho

Aos colegas veterinários **Flávia Ponce e Rodrigo Casemiro Machado** pela realização das consultas das pacientes caninas do Hospital Veterinário.

À **Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro (processo 04/04607-8).

Sumário

Lista de Abreviaturas e símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Gráficos

1. Introdução	1
2. Objetivos	18
3. Métodos	20
3.1. Características das pacientes	21
3.2. Coleta e processamento das amostras	22
3.3. Cultura de tecidos e tratamento com doxorrubicina	25
3.3.1. Determinação da concentração ideal de doxorrubicina	25
3.4. Determinação da resposta ao tratamento por meio de contagem do número de células em cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina.	26
3.5. Extração de RNA total	28
3.6. Reação da Transcriptase Reversa (RT) para obtenção do cDNA	29
3.7. Reação de polimerização em cadeia do DNA (PCR) em tempo real	30
3.8. Desenho dos <i>primers</i>	33
3.9. Padronização da reação de polimerização em cadeia do DNA (PCR) em tempo real	34
3.9.1. Análise dos resultados de expressão gênica por PCR em tempo real	36
3.9.2. Avaliação da expressão gênica para classificação das amostras de acordo com a resposta à doxorrubicina.	38

4. RESULTADOS.....	39
4.1. Pacientes	40
4.2. Resposta ao Tratamento.....	43
4.3. Expressão dos genes de interesse em relação à sensibilidade ou resistência à doxorrubicina.....	47
4.4. Distribuição espacial das amostras de acordo com a expressão dos trios de genes de interesse	52
4.5. Correlação entre expressão relativa dos genes de interesse e a variação do número de células entre amostras controle e tratadas com doxorrubicina	61
4.6. Expressão dos genes de interesse em relação ao grau de diferenciação do tumor	63
5. Discussão	67
6. Conclusões	82
7. Anexos.....	84
8. Referências.....	89

Lista de abreviaturas e símbolo

3+	score máximo de marcação de ErbB2 por imunohistoquímica
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
µM	micromolar
≥	maior ou igual
CDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
cm ³	centrímetro cúbico
CMF	ciclofosfamida-metotrexato-fluorouracil
CO ₂	óxido carbônico
Ct	ciclo limiar
DEPEC	dietilpirocarbonato
DMEM	meio modificado de Dulbecco Eagle
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DP	desvio padrão
DTT	dietiltreitol
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
FEC	fluorouracil-epirrubicina-ciclofosfamida
FISH	hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
g	aceleração da gravidade
g	grama
GAPDH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

gpP170	glicoproteína-P 170
HC11	linhagem celular epitelial de camundongo derivada de tecido mamário normal
HE	hematoxilina-eosina
HGF	fator de crescimento de hepatócitos
IGF	fator de crescimento insulina-símile
IGFBP5	proteína ligante do fator de crescimento insulina-símile
log	logarítimo
m	metro
MCF10	linhagem celular epitelial mamária humana derivada de tecido mamário normal
MCF7	linhagem celular epitelial humana bem diferenciada derivada de efusão pleural de adenocarcinoma mamário
MCF7/D40	linhagem celular epitelial humana bem diferenciada derivada de efusão pleural de adenocarcinoma mamário
MDA	linhagem celular epitelial humana derivada de efusão pleural de adenocarcinoma mamário
MDA-MB-435	linhagem celular epitelial humana derivada de efusão pleural de adenocarcinoma
MDR	gene de resistência a múltiplas drogas
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MOPS	ácido propano sulfônico 3-[N-morfolina]
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
ni	não informado
Nm	nanômetro
°C	graus Celsius

ORESTES	<i>open reading frame expressed sequence tags</i>
PCR	reação de polimerização em cadeia do DNA
pH	potencial hidrogeniônico
RECIST	critérios para avaliação de resposta em tumores sólidos
RNA	ácido ribonucléico
RPL37A	proteína ribossomal humana L37A
RPMI	meio de cultura de Roswell Park Memorial Institute
SRD	sem raça definida
TGF β	fator de crescimento transformante tipo β
Tm	temperatura de desnaturação
TNM	sistema classificador quanto à extensão do tumor primário, metástases em linfonodos regionais e metástases à distância

Lista de Figuras

Figura 1. Distribuição tridimensional de amostras de tumores de acordo com a expressão do trio de genes MTSS1, PRSS11 e CLPTM1.	14
Figura 2. Representação esquemática do fatiador de tecido fresco Krumdieck®. (A) localização da lâmina cortante, (B) poço cilíndrico aonde o tecido a ser fatiado é depositado, (C) sentido do fluxo da solução salina tampão entre os dois compartimentos, (D) vaso coletor, (E) base do cilindro que é ajustada conforme a espessura da fatia, (F) válvula de abertura para recolhimento das fatias.....	24
Figura 3. Identificação das bandas correspondentes aos RNA ribossomais 18 e 28S em gel de agarose de 4 amostras diferentes. C(controle), T (tratamento com doxorubicina, 1µM).	29
Figura 4. Representação da amplificação de moléculas de DNA na reação de PCR em tempo real.....	31
Figura 5. Curva de eficiência representativa do transcrito PRSS11.	37
Figura 6. Amostras tumorais não tratadas (A e C) e tratadas (B e D) com doxorubicina a 1µM (aumento 40x).	44
Figura 7. Amostras tumorais não tratadas (A e C) e tratadas (B e D) com doxorubicina a 1µM.	45
Figura 8. Variação do número de células nos tumores resistentes (n=29) e sensíveis (n=9) ao tratamento com doxorubicina na concentração de 1µM durante o período de 24 horas.	47
Figura 9. Expressão do gene PRSS11, em amostras controle de tumores resistentes (n=28) e sensíveis (n=9) ao tratamento com doxorubicina (1µM) durante 24 horas.	49
Figura 10. Expressão do gene MTSS1 em amostras controle de tumores resistentes (n=28) e sensíveis (n=9) ao tratamento com doxorubicina (1µM) durante 24 horas.	49
Figura 11. Expressão do gene CLPTM1 em amostras controle de tumores resistentes (n=28) e sensíveis (n=9) ao tratamento com doxorubicina (1µM) durante 24 horas.	50
Figura 12. Expressão do gene SMYD2 em amostras controle de tumores resistentes (n=28) e sensíveis (n=9) ao tratamento com doxorubicina (1µM) durante 24 horas.	50

Figura 13. Expressão do gene NOTCH1 em amostras controle de tumores resistentes (n=28) e sensíveis (n=8) ao tratamento com doxorubicina (1 μ M) durante 24 horas.	51
Figura 14. Expressão do gene RPL37A em amostras controle de resistentes (n=28) e sensíveis (n=8) ao tratamento com doxorubicina (1 μ M) durante 24 horas.	51
Figura 15. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes PRSS11, MTSS1, CLPTM1 (+ sensível, x resistente).	53
Figura 16. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes PRSS11, MTSS1, SMYD2 (+ sensível, x resistente).	53
Figura 17. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes CLPTM1, NOTCH1, RPL37A representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).	54
Figura 18. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes CLPTM1, SMYD2, NOTCH1 representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).	54
Figura 19. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes CLPTM1, SMYD2, RPL37A representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).	54
Figura 20. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes MTSS1, CLPTM1, NOTCH1 representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).	55
Figura 21. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes MTSS1, CLPTM1, RPL37A representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).	55
Figura 22. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes MTSS1, CLPTM1, SMYD2 representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).	55
Figura 23. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes MTSS1, NOTCH1, RPL37A representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).	56
Figura 24. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes MTSS1, SMYD2, NOTCH1 representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).	56

Figura 25. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes MTSS1, SMYD2, RPL37A representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).	56
Figura 26. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes PRSS1, CLPTM1, NOTCH1 representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).	57
Figura 27. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes PRSS11, CLPTM1, RPL37A representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).	57
Figura 28. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes PRSS11, CLPTM1, SMYD2 representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).	57
Figura 29. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes PRSS11, MTSS1, NOTCH1 representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).	58
Figura 30. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes PRSS11, MTSS1, RPL37A representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).	58
Figura 31. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes PRSS11, NOTCH1, RPL37A representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).	58
Figura 32. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes PRSS11, SMYD2, NOTCH1 representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).	59
Figura 33. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes PRSS11, SMYD2, RPL37A representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).	59
Figura 34. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes SMYD2, NOTCH1, RPL37A representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).	60
Figura 35. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes PRSS11, MTSS1, CLPTM1 (+ sensível, x resistente).	60
Figura 36. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes PRSS11, MTSS1, SMYD2 (+ sensível, x resistente).	61
Figura 37. Correlação entre o valor de expressão do gene PRSS11e a variação do número de células em entre amostras controle e tratadas.....	62

- Figura 38.** Correlação entre o valor de expressão do gene MTSS1 e a variação do número de células em entre amostras controle e tratadas.....62
- Figura 39.** Correlação entre o valor de expressão do gene CLPTM1 e a variação do número de células em entre amostras controle e tratadas.....62
- Figura 40.** Correlação entre o valor de expressão do gene NOTCH1 e a variação do número de células em entre amostras controle e tratadas.....62
- Figura 41.** Correlação entre o valor de expressão do gene SMYD2 e a variação do número de células em entre amostras controle e tratadas.....62
- Figura 42.** Correlação entre o valor de expressão do gene RPL37A e a variação do número de células em entre amostras controle e tratadas.....62
- Figura 43.** Expressão do gene PRSS11 em amostras de tumores bem diferenciados (Grau I) e pouco diferenciados (Grau II e III).64
- Figura 44.** Expressão do gene MTSS1 em amostras de tumores bem diferenciados (Grau I) e pouco diferenciados (Grau II e III).64
- Figura 45.** Expressão do gene CLPTM1 em amostras de tumores bem diferenciados (Grau I) e pouco diferenciados (Grau II e III).65
- Figura 46.** Expressão do gene SMYD2 em amostras de tumores bem diferenciados (Grau I) e pouco diferenciados (Grau II e III).65
- Figura 47.** Expressão do gene RPL37A em amostras de tumores bem diferenciados (Grau I) e pouco diferenciados (Grau II e III).66
- Figura 48.** Expressão do gene NOTCH1 em amostras de tumores bem diferenciados (Grau I) e pouco diferenciados (Grau II e III).66

Lista de Tabelas

Tabela 1. Contagem de células MCF-7 após tratamento de 24 horas com doxorubicina a 1 μ M e 2 μ M.....	25
Tabela 2. Média de expressão dos genes de interesse em amostras controle ao tratamento com doxorubicina.....	48
Tabela 3. Correlação entre o número de células e a expressão dos genes de interesse (correlação de Spearman).	61
Tabela 4. Expressão dos genes de interesse em amostras de tumores bem diferenciados (grau I) e pouco diferenciados (grau II e III).....	63

Lista de Quadros

Quadro 1. Desenho dos <i>primers</i> dos transcritos dos genes alvo e tamanho do produto.....	34
Quadro 2. Características clínico-patológicas das pacientes.....	41
Quadro 3. Número de células nos cortes histológicos das amostras de tumores de mama de cadelas controle e tratadas com doxorubicina a 1 μ M	46

Resumo

Sobral R.A. *Expressão de PRSS11, MTSS1, CLPTM1, SMYD2, NOTCH1 e RPL37A em fatias de carcinoma de mama de cadelas e correlação com resposta à doxorrubicina in vitro* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo;2006. 99p.

Os tumores da glândula mamária constituem as neoplasias mais freqüentes em cadelas e a doxorrubicina é uma das principais drogas quimioterápicas utilizadas no tratamento deste tipo de câncer. A quimioterapia neoadjuvante com doxorrubicina possibilita a redução do tumor e permite a avaliação da resposta ao tratamento quimioterápico *in vivo*. A procura por marcadores preditivos de resposta tem o objetivo de identificar as pacientes responsivas e não responsivas ao tratamento com o quimioterápico de modo a permitir a indicação de uma abordagem terapêutica específica para cada paciente. A expressão de alguns trios de genes, incluindo PRSS11, MTSS1 e CLPTM1 e, PRSS11, MTSS1 e SMYD2 em mulheres com câncer de mama que receberam tratamento neoadjuvante com doxorrubicina permitiu a classificação das pacientes em sensíveis e resistentes ao tratamento. Outros genes diferencialmente expressos entre amostras consideradas sensíveis e resistentes à doxorrubicina foram NOTCH1 e RPL37A. Avaliamos no presente trabalho se a expressão de trios de genes permitia a classificação de resposta ao tratamento quimioterápico em outro modelo, constituído por carcinoma de mama de cadela, mantido em cultura de tecido na forma de fatias e exposto à doxorrubicina *in vitro*. A cultura de fatias de tecidos permite a manutenção da interação epitélio-mesênquima e é considerado um modelo mais próximo ao observado *in vivo*. Foram obtidas amostras de tumor mamário de 38 pacientes caninas atendidas no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Metodista de São Paulo (UMESP), em São Bernardo do Campo, durante a cirurgia de mastectomia. Os proprietários deram seu consentimento livre e esclarecido para a realização do estudo. A idade mediana das pacientes foi de 10,4 anos e, 55% e 18,4% destas pacientes eram animais sem raça definida (SRD) e da raça *poodle*, respectivamente. Oito pacientes haviam sido submetidas previamente à cirurgia de esterilização. As pacientes apresentaram-se em estadió clínico III (39,47%), II (28,9%), I (18,4%) e IV (metástase pulmonar) (13,1%). Os carcinomas foram classificados como de arranjo cístico-papilífero (34,2%), tubular (34,2%), túbulo-papilífero (18,42%) e sólido (10,52%). Os tumores foram fatiados e cultivados na ausência e presença de doxorrubicina (1 μ M) por 24 horas e, para avaliação da resposta após o tratamento, procedeu-se à contagem do número de células nas amostras tratadas e não tratadas. O tratamento com doxorrubicina promoveu uma redução média do número de células de 13,6% e, nove amostras foram consideradas responsivas, enquanto 29 não responderam ao tratamento. Amostras de tumor mantidas em cultura na ausência de doxorrubicina tiveram seu RNA extraído para determinação da expressão dos genes alvo por meio de reação de transcrição reversa e da polimerase em cadeia do DNA em tempo real. A distribuição tridimensional das amostras, baseada na

expressão dos trios de genes, não permitiu a classificação das amostras em responsivas e não responsivas. Logo, a combinação da expressão de três genes alvos, incluindo PRSS11, MTSS1, CLPTM1, SMYD2, NOTCH1 e RPL37A, não separou adequadamente os tumores responsivos e não responsivos neste modelo de carcinoma mamário canino, tratado *in vitro* com doxorubicina.

Descritores: neoplasias mamárias animais, cães, doxorubicina, expressão gênica, valor preditivo dos testes.

Summary

Sobral, RA. *Expression of PRSS11, MTSS1, CLPTM1, SMYD2, NOTCH1 and RPL37A in slices of bitch mammary cancer and correlation with response to exposure doxorubicin in vitro* [thesis], Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, SP (Brazil); 2006. 99p.

Mammary gland tumors are the most common neoplasias of bitches and doxorubicin is one the mainstay drugs used in their treatment. Neoadjuvant chemotherapy with doxorubicin not only reduces the primary tumor as well as allows an *in vivo* evaluation of tumor response. Predictive markers of response, if identified, might allow a tailored treatment of each patient. In women with breast cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy with doxorubicin, expression of groups of three genes, including PRSS11, MTSS1 and CLPTM1 and PRSS11, MTSS1 and SMYD2, classified the patients in responsive and resistant. Other genes differentially expressed between responsive and non-responsive tumors were NOTCH1 and RPL37A. We have then evaluated whether the expression of trios of these genes could allow the classification of tumors according to their response to chemotherapy, in another animal model constituted by mammary carcinoma of bitches, cultured as tissue slices and exposed to doxorubicin *in vitro*. Culture of tissue slices preserves epithelial-mesenchymal interactions, in a similar way to that observed *in vivo*. Tumor samples were obtained from 38 canine patients treated at Hospital Veterinaria da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Metodista de São Paulo (UMESP), São Bernardo do Campo, during mastectomy. Animal owners gave their informed consent to this study. Median age of patients was 10,4 years and 55% and 18,4% of them were mixed and poodle breed, respectively. Eight patients were previously spayed. Patients were classified in clinical stage III (39,47%), II (28,9%), I (18,4%) and IV (pulmonary metastasis only) (13,1%). Carcinomas were classified as cystic-papillary (34,2%), tubular (34,2%), tubular-papillary (18,42%) and solid (10,52%). Tumors were sliced and cultured in the absence or in the presence of doxorubicin (1 μ M) for 24 hours and response evaluation was performed by cell counting of treated and untreated samples. Doxorubicin exposure promoted a mean reduction of 13,6% in the number and nine samples were considered responsive and 29 non-responsive. RNA was extracted from samples maintained in culture without doxorubicin and expression of target genes was evaluated by reverse transcription and real time polymerase chain reactions. Three-dimensional distribution of samples according to expression of groups of three genes could not separate responsive from non-responsive tumors. NOTCH1 and RPL37A expression was similar between responsive and resistant tumors but NOTCH1 was over expressed in poorly differentiated as compared to well differentiated carcinomas. Hence, expression of combination

of three target genes, including, PRSS11, MTSS1, CLPTM1, SMYD2, NOTCH1 and RPL37A, could not correctly separate responsive from non-responsive tumors in this model of mammary carcinoma of canine species treated *in vitro* with doxorubicin.

Descriptors: animal mammary neoplasms, dogs, doxorubicin, gene expression, predictive value of tests

1. Introdução

Os tumores mamários são, entre todos os tipos de tumores, os mais comumente diagnosticados na fêmea canina (Maria et al., 1998; De Nardi, 2002), especialmente nas cadelas não submetidas à esterilização cirúrgica prévia ao diagnóstico e, os tipos malignos variam, em ocorrência, de 26 a 73% (Pérez-Alenza et al., 2000, Rutteman et al., 2001). Dos tipos malignos, o carcinoma destaca-se como o mais comum (Misdorp et al., 1999).

Relatos acerca da incidência do tumor de mama em outros países mostram que, nos Estados Unidos, observa-se um caso em cada 500 cadelas, correspondendo a 52% das neoplasias de cadelas neste país (Rutteman et al., 2001). Na Suécia a incidência é de 1 em cada 100 animais (Engvall et al., 2005) e no Reino Unido, os tumores de mama representam o terceiro tipo de neoplasia mais freqüente (Dobson et al., 2002).

É interessante conhecermos aspectos histomorfológicos da glândula mamária da cadela para estudarmos a carcinogênese e o tratamento do câncer de mama nesta espécie.

As glândulas mamárias das cadelas estão presentes sob a forma de cordões ou cadeias mamárias subepidermais e iniciam desenvolvimento durante o período fetal. Após o nascimento a massa glandular mamária aumenta nas fêmeas e é inibida nos machos por ação da testosterona (Kolb, 1987).

A cadela possui cinco pares de glândulas mamárias, denominadas torácicas craniais, torácicas caudais, abdominais craniais, abdominais caudais e inguinais. A circulação linfática promove comunicação entre algumas glândulas homolaterais, mas não parece existir comunicação entre as cadeias direita e esquerda (Peleteiro, 1994). Pereira e colaboradores (2003), entretanto, estudaram as rotas de drenagem linfática de cadeias mamárias de cadelas saudáveis e de portadoras de tumores; seus dados indicam que é possível a ocorrência de comunicação linfática ipsilateral e também contralateral entre as cadeias mamárias, especialmente em cadelas com câncer, pois, nesta condição a ocorrência de anastomose é maior pela formação de novas rotas de drenagem.

A linfa que percorre as glândulas torácicas, usualmente, é drenada para o linfonodo axilar acessório e nas glândulas abdominais e inguinais a drenagem linfática é direcionada para o linfonodo inguinal superficial. A glândula abdominal caudal parece ser a única que drena, simultaneamente, para os linfonodos axilar e inguinal (Peleteiro, 1994).

Estruturalmente as glândulas mamárias são formadas por lóbulos separados por septos conjuntivos, cujos ductos drenam para canais excretores mais calibrosos (ductos lactíferos), estes se abrem no mamilo e são em número variável. Os ductos lactíferos, antes que atingir o mamilo, formam uma dilatação ampular denominada seio lactífero (Kolb, 1987). O epitélio de revestimento dos ductos é duplo, formado por células epiteliais cúbicas ou cilíndricas baixas. À medida que os ductos vão se ramificando para formar ductos intralobulares, o epitélio transforma-se em epitélio

simples, cilíndrico ou mesmo cúbico. Os alvéolos das glândulas mamárias são revestidos por epitélio luminal basal, o qual forma uma camada descontínua sobre a membrana basal (Griffey et al., 1993). As células epiteliais luminais sintetizam e excretam proteínas lácteas e lipídios durante a lactação e as células epiteliais basais ou mioepiteliais contraem, sob influência do hormônio ocitocina, expelindo o leite dos ductos. Ambos os tipos celulares (luminal e basal) são derivados de uma única população celular de *stem cells* (Warburton et al., 1989).

Além do tecido epitelial, células adiposas e fibroblastos também estão presentes neste arranjo, sendo responsáveis pela sustentação do tecido mamário. A compreensão desta arquitetura tecidual é de extrema importância no estudo dos tumores mamários. Zuccari e colaboradores (2001) evidenciaram uma relação direta entre os componentes teciduais e o prognóstico das lesões do câncer de mama de cadelas.

As glândulas mamárias diferenciam-se durante os sucessivos estágios da vida do animal, sendo a fêmea impúbere exibe um sistema tubular ramificado rudimentar ligado aos ductos lactíferos. Quando sob efeito do estrógeno na puberdade, o sistema tubular se desenvolve, com aumento do número de células adiposas, acarretando aumento do volume externo da glândula, sobretudo nas mamas abdominais caudais e inguinais. A progesterona atua de forma prolongada após o período de estro, subsequente ocorre a formação dos alvéolos secretórios, os quais são constituídos por um epitélio cilíndrico simples entremeado por células mioepiteliais. Na formação alveolar, as células mioepiteliais não proliferam

na mesma proporção que o epitélio secretor, o que permite contato direto entre este e a membrana basal, ou seja, a ação estimuladora desempenhada pelo estrógeno torna-se efetiva sobre as próprias células secretoras (Moulton, 1990).

Na iminência do parto verifica-se secreção láctea acumulada no lúmen dos alvéolos e, há diminuição substancial do estroma conjuntivo. Durante a lactação, os ductos e alvéolos secretores apresentam-se distendidos. Ao término da lactação a maioria dos alvéolos é reabsorvida, enquanto que os septos interlobulares tornam-se mais espessos e o tecido glandular diminui de volume. Desta forma as modificações de organização do tecido glandular mamário, apesar de fisiológicas, podem desencadear alterações neoplásicas diversas em qualquer local desse tecido, especialmente na porção epitelial (Zuccari e al., 2001).

O rápido desenvolvimento das glândulas mamárias durante a puberdade, período em que a ação estrogênica é acentuada, pode contribuir para a formação de clones de células alteradas, o que predispõem à formação de nódulos hiperplásicos. Estas lesões sofrem ação direta do estrógeno, o que induz à proliferação do epitélio ductal e, desta forma, propicia condições necessárias para que mutações genéticas ocorram. Como já descrito, o estrógeno também pode estar envolvido na transformação maligna pela regulação transcricional de muitos proto-oncogenes (Peleteiro, 1994). A alta incidência destes tumores na espécie canina, em parte, é resultante do estímulo dos hormônios sexuais sobre a glândula mamária. Esta hipótese é apoiada pela observação de diferenças

significativas na incidência dos tumores mamários entre cadelas castradas e não castradas (Moulton, 1990; Peleteiro, 1994).

O risco de desenvolvimento de tumores mamários é de 0,5 % em cadelas castradas antes do primeiro cio; 8% quando a esterilização for realizada após o primeiro cio e de 26% quando esse procedimento é feito após o segundo cio (Schneider et al., 1969). Os animais submetidos à castração após os dois anos e meio de idade não necessariamente podem ser beneficiados pelos efeitos profiláticos da esterilização, isto porque neste momento as glândulas mamárias já estão plenamente desenvolvidas e diferenciadas (Moulton, 1990). Outra ocorrência que apóia a hormônio dependência é a identificação de receptores de estrógeno e progesterona nestas lesões em 40 a 60% dos casos (Rutteman et al., 2001).

O tratamento da doença na espécie canina baseia-se na exérese cirúrgica das mamas e na quimioterapia adjuvante com intenção de aumento de sobrevida, pois, cerca de 50 a 60% destes tumores têm potencial de disseminação metastática (Rutteman et al., 2001).

As classes de agentes antineoplásicos mais utilizadas na terapia adjuvante dos tumores de mama de mulheres e de cadelas são os antibióticos antracíclicos e os agentes alquilantes (Karayannopoulou et al., 2001; Rutteman et al., 2001). Na veterinária, a doxorubicina, um antibiótico antracíclico, é muito utilizado, como agente único ou em combinação com outras drogas, no tratamento de neoplasias do cão, como linfomas, sarcomas de tecidos moles, adenocarcinoma mamário, carcinoma da tireóide e hemangiossarcoma (Hahn e Richardson, 1995). Da mesma forma,

a doxorubicina possui atividade ampla em neoplasias humanas, incluindo uma variedade de tumores sólidos, porém, uma das maiores limitações do uso da droga é a cardiotoxicidade induzida, em geral irreversível, cuja ocorrência está relacionada à dose total da droga (Bonassa, 2000).

Em mulheres com câncer de mama metastático a doxorubicina está associada a 40% de resposta objetiva (resposta parcial e completa) como tratamento paliativo e, quando utilizada de forma neoadjuvante, proporciona redução de volume tumoral entre 49 a 85% dos casos, entretanto algumas pacientes não apresentam qualquer tipo de resposta ao tratamento (van der Hage, 2001). Se pudéssemos identificar esas pacientes pela presença de marcadores preditivos, poderíamos estabelecer um tratamento individualizado.

A doxorubicina é uma droga que interage com a enzima topoisomerase tipo II; a qual controla o número e a topologia das regiões superespiraladas do DNA, ligando-se e causando a abertura da dupla fita para permitir a passagem de uma fita sobre a outra (Lodish et al., 2002). Os efeitos do tratamento com doxorubicina, por sua vez, impedem a religação das duplas fitas seccionadas pela topoisomerase II, causando lesão permanente à estrutura da molécula de DNA.

O gene que codifica a enzima topoisomerase II está localizado no cromossomo 17q21, em região bastante próxima ao oncogene ErbB-2, que é comumente amplificado em cânceres mamários (Ahern et al., 1996). Em virtude desta proximidade, as aberrações ocorridas no *locus* do ErbB-2 também podem afetar o gene que codifica a topoisomerase II.

A co-amplificação ou deleção do gene da topoisomerase II α foi relatada em cerca de 90% dos casos de amplificação de ErbB-2 em linhagens celulares de tumores mamários e em tumores primários de mama. A amplificação do gene da topoisomerase II foi associada ao aumento correspondente de sua expressão protéica e à maior sensibilidade ao tratamento com doxorrubicina, enquanto que a deleção do gene à diminuição da proteína e à resistência à droga tanto em pacientes como em experimentos conduzidos *in vitro* (Lynch et al., 1997; Järvinen et al., 2000). De acordo com estes achados, Pritchard e colaboradores (2006), em estudo fase III em que mulheres foram tratadas com CMF (ciclofosfamida-metotrexato-fluorouracil) FEC (fluorouracil-epirrubicina-ciclofosfamida) observaram que o subgrupo de pacientes com tumores com hiperexpressão de ErbB-2 positivo apresentou melhor evolução (intervalo livre de doença e sobrevida global) quando receberam FEC.

Existem evidências que a ocorrência de resistência aos agentes quimioterápicos está relacionada à expressão, no tecido tumoral, da glicoproteína-P (gpP170), um produto do gene MDR, pertencente a uma família de genes relacionada à resistência a múltiplas drogas. A glicoproteína-P é uma proteína transmembrânica com função de bomba de transporte de drogas que promove o efluxo de agentes citotóxicos como antraciclinas, epipodofilotoxinas, alcalóides da vinca e taxanos, porém o mecanismo que desencadeia esta função, bem como os fatores que controlam a expressão desta proteína, não estão bem estabelecidos (Trock et al., 1997; Page et al., 2000; Lin e Masayo, 2003). Estudos mostram que a

expressão de glicoproteína-P 170 pode ser detectada na mama normal, onde em geral é baixa e acontece principalmente no estroma, mas também pode ocorrer em células luminais. Identificou-se a expressão de MDR1/gpP170 em 27 a 46% das amostras de câncer de mama obtidas de pacientes que não receberam tratamento e, esta incidência foi ainda maior em amostras provenientes de pacientes previamente submetidas a tratamento quimioterápico, sugerindo indução de resistência adquirida após o tratamento (Trock et al., 1997). Linhagens celulares de tumores caninos (tipo selvagem e resistente a múltiplas drogas), quando analisadas quanto à sensibilidade aos agentes doxorrubicina e cisplatina, mostram sensibilidade semelhante à cisplatina, mas não à doxorrubicina. Nestas últimas o tratamento concomitante com substâncias moduladoras ou substratos da glicoproteína-P, como o verapamil, tamoxifeno e análogo da ciclosporina, promoveu maior retenção da doxorrubicina e maior sensibilidade ao tratamento sugerindo envolvimento da glicoproteína-P na resistência à doxorrubicina (Page et al., 2000).

Outros mecanismos podem estar envolvidos na resistência à quimioterapia como os relacionados às vias de proliferação e apoptose. O objetivo de terapias que utilizam drogas antineoplásicas é o de induzir regressão de volume de massas ou suprimir doença sistêmica e isso ocorre por meio de inibição de proliferação e indução de apoptose. Desta forma, o índice de proliferação do tumor e a taxa de apoptose induzida pela quimioterapia, ou ainda a expressão de proteínas que regulam o ciclo celular e apoptose, poderiam ser importantes marcadores de sensibilidade ou

resistência a um tratamento (Parton et al.; 2002). Entretanto, o valor preditivo da proliferação tumoral em relação à resposta aos antracíclicos também é incerto. Em câncer de mama, Aas e colaboradores (2003) relatam que alto índice mitótico tumoral associa-se à resistência à doxorrubicina, enquanto Petit e colaboradores (2004) relatam que alta taxa de proliferação detectada por expressão de $Ki67 \geq 20\%$ foi fator preditivo de resposta clínica a esquema contendo epirrubicina. Este último dado, entretanto, não foi confirmado por Bottini e colaboradores (1996), que não encontraram associação entre expressão de Ki67 e resposta clínica ao tratamento.

Células tumorais podem adquirir resistência à apoptose por mecanismos que interferem com a sinalização da cascata apoptótica, pela hiperexpressão de genes anti-apoptóticos ou inativação de genes pró-apoptóticos, alterações da via de p53, das caspases, da família Bcl2 ou, ainda, pela alteração de receptores com domínio de morte (Ho e Hawkins, 2005).

Quanto à apoptose induzida por drogas, um dos elementos chave é p53. A atividade transcricional de p53 é importante para sua função pró-apoptótica, pois p53 induz a expressão de proteínas envolvidas na via mitocondrial como BAX, NOXA, PUMA e p53AIP1 e também na via de receptores de morte como CD95, TRAIL-R1 e TRAIL-R2. Outras atividades de p53 são independentes da transcrição, mediadas por interações proteína-proteína, efeito direto na mitocôndria e realocização dos receptores de morte na superfície celular (Ho e Hawkins, 2005).

Em relação a Bcl2, modelos *in vitro* e *in vivo*, sugerem que sua expressão confere resistência a vários tipos de drogas quimioterápicas e

também à irradiação, entretanto Sjostrom e colaboradores (2002) não encontraram relação entre a expressão de Bcl2 e a resposta à quimioterapia em um grupo de pacientes com câncer de mama avançado. Daidone et al., 1995 observaram relação entre a proliferação celular, DNA ploidia, imunoexpressão de p53, Bcl2 e Bax, e a expressão protéica de p53 com a resposta clínica objetiva a um protocolo quimioterápico neoadjuvante que incluía doxorrubicina. Outros autores demonstraram que a presença de mutações do gene p53 estão relacionadas à ausência de resposta ao tratamento com FEC (5-fluorouracil, epirrubicina, ciclofosfamida), nestes casos somente observou-se marcação imunohistoquímica para apoptose em tumores p53 tipo selvagem (Kandioler-Eckersberger et al., 2000).

Como exposto, vários investigadores tentaram identificar fatores preditivos de resposta à doxorrubicina, entretanto a determinação de marcadores isolados parece não ser capaz de classificar o tipo de resposta à terapia. Foram então realizados estudos de análise global de expressão gênica, *in vitro* e *in vivo*, na tentativa de estabelecer marcadores de sensibilidade e resistência aos quimioterápicos.

Kudoh e colaboradores (2000) determinaram a expressão gênica da linhagem de câncer de mama de mulheres (MCF7) sensível ou resistente à doxorrubicina (MCF7/D40) usando filtro de cDNA *microarray* contendo 5.180 seqüência. O experimento detectou cerca de 5,8% de transcritos diferencialmente expressos. A análise do perfil gênico das células foi realizada após tratamento com doxorrubicina e, foi possível determinar quais genes apresentavam-se diferencialmente expressos em ambas situações na

linhagem resistente e na selvagem. Dentre os genes diferencialmente expressos encontram-se aqueles relacionados ao ciclo celular, metabolismo celular, sistema ubiquitina-proteassoma e secreção protéica. Estes, aparentemente, relacionam-se tanto à resistência intrínseca como também à adquirida, pois foram diferencialmente expressos nos dois fenótipos celulares, entretanto, o valor preditivo deste perfil gênico em relação à resposta ao tratamento ainda não está estabelecido.

Outros pesquisadores analisaram a expressão gênica de tumores de pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante baseada em doxorrubicina e compararam o perfil de tumores considerados responsivos e não responsivos. O primeiro estudo foi realizado por Sotiriou e colaboradores (2002) que analisaram 10 tumores de mama de pacientes tratadas com doxorrubicina de modo neoadjuvante, das quais 5 apresentaram resposta clínica completa. Utilizando lâmina de cDNA *microarray* contendo 7.600 seqüências, os autores identificaram 37 genes diferencialmente expressos, cuja expressão foi capaz de agrupar as pacientes em responsivas e não responsivas. Dentre os genes mais expressos nos tumores considerados resistentes encontraram COX17, proteína de agregação da enzima citocromo oxidase-c, e HMG1 (*High Mobility Group Box 1*), e dentre os menos expressos, CD44, receptor de ácido hialurônico.

Hannemann e colaboradores (2005) tentaram classificar o perfil gênico de 24 amostras tumorais de pacientes segundo a resposta patológica (completa ou praticamente completa, quando restavam células malignas esparsas na amostra pós-quimioterapia), utilizando plataforma de cDNA

microarray contendo 18.432 seqüências. Estes autores, entretanto, não obtiveram sucesso em caracterizar um perfil gênico que agrupasse as pacientes segundo o tipo de resposta. Por outro lado, Bertucci e colaboradores (2004) analisaram a expressão gênica de 26 amostras de carcinoma inflamatório, dos quais 35% apresentaram resposta patológica completa após o tratamento neoadjuvante com doxorrubicina. Neste caso, os pesquisadores usaram membranas de cDNA *microarray* contendo 6.664 genes e, por meio de análise supervisionada, identificaram 85 genes diferencialmente expressos entre os grupos de resposta e não resposta, o que permitiu, com acurácia de 85%, a classificação dos mesmos. Observou-se a maior expressão de CDKN1B(p27), um inibidor da progressão do ciclo celular, em tumores com resposta patológica completa, bem como de genes que codificam quimiocinas, citocinas e receptores de citocinas, como CSF1R, CCL2, CCL3 e MMP9, sugerindo papel para o sistema imune do hospedeiro participa na erradicação do tumor após a quimioterapia.

Nosso grupo também está envolvido na identificação de um perfil gênico que pudesse ser preditivo de resposta, em mulheres com câncer de mama, à quimioterapia neoadjuvante baseada em doxorrubicina. Para análise do perfil gênico associado à resposta à quimioterapia foram utilizadas duas plataformas de cDNA *microarray*, uma delas contendo 692 genes e outra contendo 4.608 ORESTES (*open reading frame expressed sequence tags*). Foram identificados 187 genes diferencialmente expressos e, dentre estes, trios de genes classificadores dos grupos responsivos e não responsivos ao tratamento, os quais são PBEF1, FAM14B e EMILIN1 e PRSS11, MTSS1 e CLPTM1.

Inicialmente a expressão do trio de genes, PBEF, EMILIN1 e FAM14B identificou com 100% de sensibilidade e 94,7% de especificidade as amostras do grupo de treinamento, entretanto o índice de acerto para classificar a resposta à quimioterapia em um segundo grupo de tumores foi de apenas 70%. Já a expressão do segundo trio de genes, PRSS11, MTSS11 e CLPTM1, agrupou, espacialmente, todas as amostras do grupo treinamento (Figura 1) e 85% das amostras do grupo de validação. Este segundo trio de transcritos causou uma melhor separação das amostras responsivas e das não responsivas em relação ao primeiro trio, e parece ser um marcador de resposta promissor.

Figura 1. Distribuição tridimensional de amostras de tumores de acordo com a expressão do trio de genes MTSS1, PRSS11 e CLPTM1.

O gene PRSS11 codifica uma proteína serina protease 11 ou protease de proteína de ligação do fator de crescimento insulina-símile 5 (*insulin-like growth factor* binding protein 5– IGFBP5). Acredita-se que este fator possa influenciar a atividade da via do IGF, o qual está envolvido na proliferação e

diferenciação de vários tipos celulares. PRSS11 foi o gene menos expresso em tumores resistentes em comparação aos sensíveis (Baldi, 2002).

O gene MTSS1 (*Mammalian Metastasis Supressor 1*), também chamado de MIM (*Missing in Metastasis*) parece capaz de suprimir o potencial metastático em câncer de bexiga, pois sua expressão estava significativamente reduzida em células metastáticas em linhagens de câncer de bexiga, de mama e de próstata (Lee et al.; 2002). Nixdorf e colaboradores (2004) identificaram que o gene MIM codifica uma proteína com 356 aminoácidos e que está localizado no cromossomo 8q24.1. MTSS1 é uma proteína ligante de actina envolvida na organização do citoesqueleto e projeção celular, também parece estar associada a fatores de transcrição e participar na sinalização celular (Callahan et al., 2004). Este gene foi menos expresso entre pacientes não responsivas à quimioterapia.

CLPTM1 foi identificado como um novo gene interrompido por uma translocação t(2;19) em uma família de indivíduos com fenda labial e palatina, entretanto o seu papel na doença não está bem estabelecida (Yoshiura et al., 1998). O gene codifica uma proteína com sete domínios transmembranosos, expressa de forma ubíqua em tecidos embrionários e adultos (Al-Shahrour et al., 2004). Sua expressão foi maior em tumores considerados resistentes.

Outro trio classificador de resposta foi PRSS11, MTSS1 e SMYD2. O gene SMYD2 é expresso de forma abundante em musculatura cardíaca e esquelética, especialmente em embriões. A deleção de SMYD2 em camundongos impede a maturação dos cardiomiócitos e a formação do

ventrículo direito, em função disso, estes animais morrem logo após o nascimento. A ausência da maturação deste tipo de fibra muscular parece estar relacionada à atividade de metilação ou acetilação/desacetilação das histonas (Tan et al., 2006).

Outros genes incluídos como classificadores em outros trios classificadores foram NOTCH1 e RPL37A, os quais foram mais e menos expressos em tumores resistentes, respectivamente. O gene NOTCH1 codifica quatro receptores de membrana plasmática (Notch1, Notch2, Notch3 e Notch4). Alterações na via de sinalização de Notch têm sido investigadas no desenvolvimento de vários tipos de cânceres epiteliais, incluindo o câncer de mama, embora ainda não esteja bem estabelecida sua função na carcinogênese mamária. A expressão de Notch foi evidenciada na maioria dos carcinomas ductais *in situ* (Politi et al., 2004) e em carcinomas ductais (Weijzen et al., 2002), mas não em tecido mamário normal. Além disso, expressões elevadas de Notch em câncer de mama estão correlacionadas, de forma significativa, ao prognóstico desfavorável da doença (Reedijk, et al., 2005). Evidências da atuação de NOTCH1 sobre o epitélio mamário também são relatadas em estudos em animais (Dievart et al., 1999; Callahan e Egan, 2004; Kiaris et al., 2004). Além disso, identificou-se que *Myc* é um alvo transcricional direto da sinalização aberrante de Notch1 durante a tumorigênese mamária em um modelo transgênico murino (Klinakis et al., 2006). O gene RPL37A codifica uma proteína ribossomal classificada como 37A (human ribosomal protein L37a); que se encontra expressa em linfócitos e em várias linhagens celulares (Saha et al. 1993).

Frente ao exposto, é possível que a expressão gênica tumoral possa classificar os tumores sensíveis e resistentes à doxorrubicina. No presente estudo, nossa intenção foi avaliar o padrão de expressão dos genes PRSS11, MTSS1, CLPTM1, SMYD2, NOTCH1 e RPL37A em modelo de amostras de carcinoma de mama de cadelas preservando-se a arquitetura tecidual, de acordo com a resposta ao tratamento *in vitro*, com doxorrubicina.

A cultura de tecidos é uma alternativa aos ensaios *in vivo* e apresenta como vantagem a preservação da arquitetura histológica e a manutenção das interações entre células tumorais, tecido estromal, células endoteliais e matriz extracelular. Este modelo foi utilizado previamente, com sucesso, por Barbosa e colaboradores (2004), que demonstraram a viabilidade de amostras de tecido tumoral mamário de mulheres quando mantidas em cultura por 48 horas.

2. Objetivos

-
- 2.1. Avaliar a resposta de carcinoma mamário de cadela, mantido em cultura de tecido na forma de fatias, ao tratamento *in vitro* com doxorubicina.
 - 2.2. Determinar se a expressão dos trios de genes PRSS11, MTSS1, CLPTM1 e PRSS11, MTSS1, SMYD2 classificam os tumores de acordo com a resposta ao tratamento (resistente vs sensível).
 - 2.3. Avaliar a expressão dos genes NOTCH1 e RPL37A em tumores considerados responsivos e não responsivos.

3. Métodos

3.1. Características das pacientes

Foram incluídas 38 cadelas portadoras de tumores mamários, atendidas no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Metodista (UMESP) de São Paulo, em São Bernardo do Campo, São Paulo.

Todos os proprietários foram esclarecidos quanto aos procedimentos da pesquisa e informaram, por escrito, a permissão para utilização do material biológico colhido a partir de seus animais (Anexo 1). O estudo foi analisado e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa tanto da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo 2).

As pacientes foram inicialmente avaliadas por meio de um questionário (Anexo 3), seguido de avaliação física, mensuração do(s) volume(s) do(s) tumor(es) e pesquisa de metástase à distância por meio de radiografia torácica.

Como critérios de inclusão, principalmente como avaliação pré-cirúrgica, consideramos valores hematológicos como eritrócitos $\geq 3.500.000/\text{mm}^3$, hematócrito 30%, leucócitos $> 6.000/\text{mm}^3$, concentração sérica de creatinina $< 2,0 \text{ mg/dl}$ e como critério de exclusão, o tratamento prévio com antraciclinas.

3.2. Coleta e processamento das amostras

Imediatamente após a realização da mastectomia, foram coletadas amostras do tumor de cerca de 1cm^3 tanto para cultura de tecidos como para conservação em formol 10% tamponado. A análise histopatológica da peça cirúrgica confirmou a natureza neoplásica da lesão, conforme classificação de Misdorp e colaboradores (1999).

As amostras destinadas à análise histopatológica, provenientes do mesmo local de coleta da peça destinada à cultura, foram encaminhadas para o serviço de Patologia Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade Metodista de São Paulo. Também foram enviados para avaliação histopatológica os linfonodos regionais da(s) mama(s) sítio(s) do(s) tumor(es) para averiguação de comprometimento metastático regional.

As amostras destinadas à cultura foram acondicionadas em meio de cultura DMEM acrescido de antibióticos [estreptomicina ($100\mu\text{g/ml}$) e ampicilina ($50\mu\text{g/ml}$)] e fungicida ($2,5\mu\text{g/ml}$) e mantidas neste meio, no gelo, durante o período de transporte até o Laboratório de Investigação Médica (LIM 24) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

No laboratório, o manejo das amostras foi realizado somente em capela de fluxo laminar para evitar contaminação do material. As amostras de tecidos foram então seccionadas em fatias de cerca de $300\mu\text{m}$ a $400\mu\text{m}$ em um fatiador de tecido fresco (Krumdieck® - Alabama Research and Development Corporation, Birmingham, Alemanha).

A espessura das fatias foi confirmada após mensuração micrométrica em um grupo de 5 amostras escolhidas aleatoriamente. Para isso avaliamos as fatias emblocadas em parafina e, após secção transversal, sobrepusemos um retículo com uma escala de 0,05mm (Holtermann, Comercial e Técnica Ltda, São Paulo) e mensuramos a fatia com o auxílio de uma lupa.

O fatiador Krumdieck® é de funcionamento automático, totalmente desmontável e construído em aço inoxidável e vidro, o que permite esterilização por meio de calor seco. Este aparelho consiste em dois compartimentos contíguos comunicantes, uma câmara de corte (aonde o fragmento do tecido é fatiado), e um vaso coletor (aonde as fatias são recolhidas). Durante o funcionamento do equipamento, estes compartimentos permanecem imersos em solução salina tampão (PBS), que os percorre por meio de um fluxo produzido por uma bomba. O fragmento do tecido fresco a ser fatiado é depositado em um poço cilíndrico, na câmara de corte e, abaixo deste cilindro situa-se uma lâmina cortante que, por meio de um movimento oscilatório horizontal, produz as fatias. A espessura da fatia é dada pelo ajuste da altura da base do poço cilíndrico e também pela compressão manual do fragmento por meio de um pistão. As fatias produzidas são então dirigidas ao vaso coletor e recolhidas pela abertura de uma válvula (Figura 02).

Fonte: Parrisch et al., (1995)

Figura 2. Representação esquemática do fatiador de tecido fresco Krumdieck®. (A) localização da lâmina cortante, (B) poço cilíndrico aonde o tecido a ser fatiado é depositado, (C) sentido do fluxo da solução salina tampão entre os dois compartimentos, (D) vaso coletor, (E) base do cilindro que é ajustada conforme a espessura da fatia, (F) válvula de abertura para recolhimento das fatias.

3.3. Cultura de tecidos e tratamento com doxorrubicina

3.3.1. Determinação da concentração ideal de doxorrubicina

Para determinar a concentração ideal de doxorrubicina a ser utilizada nos experimentos, células MCF-7 foram expostas a concentrações de 1 e 2 μM da droga, que em estudos prévios mostraram-se eficazes para reduzir o número de células em cultura. As células foram cultivadas em garrafas juntamente com meio RPMI acrescido de soro fetal bovino 10%, ampicilina 0,1% e estreptomicina 0,1%. As garrafas designadas como grupo tratamento receberam doxorrubicina (Adriblastina®, Pfizer, Milão, Itália) adicionada ao meio nas concentrações 1 μM e 2 μM e, nas garrafas designadas grupo controle, as células permaneceram somente em meio de cultura. O período de tratamento foi de 24 horas em estufa, à temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 , durante o qual as garrafas foram protegidas de luz. O ensaio foi realizado em duplicata.

Ao término dos tratamentos observamos uma redução média de 41,56% (1 μM) e 57,15% (2 μM) no índice de proliferação das células tratadas, em comparação àquelas que não foram exposta à doxorrubicina (Tabela 1).

Tabela 1. Contagem de células MCF-7 após tratamento de 24 horas com doxorrubicina a 1 μM e 2 μM

	n° células (0 hs)	n° células (24 hs)	n° células (24 hs)	n° células (24 hs)
		controle	1 μM Doxo	2 μM Doxo
Ensaio 1	1,6 x 10 ⁵	9,625 x 10 ⁵	5,625 x 10 ⁵	4,125 x 10 ⁵

As fatias dos tumores de mama das cadelas foram dispostas em placas de cultura de 60 x 15 mm e imersas em 10 mL de um meio de cultura constituído por RPMI, soro fetal bovino (10%), estreptomicina (0,1%) e ampicilina (0,1%). Cada placa continha cerca de 10 fatias.

As placas contendo as fatias de tumores foram divididas em grupos controle (as quais receberam somente meio de cultura) e tratado (placas que receberam solução de doxorrubicina em 2 concentrações diferentes: 1 μ M e 2 μ M) e o tratamento estendeu-se por 24 horas. Neste período todas as placas permaneceram protegidas de luz e mantidas em estufa à temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO₂.

Após o término deste período de cultivo as fatias foram retiradas do meio de cultura e parte delas foi imersa em solução de formol 10% tamponado para confecção de cortes histológicos; o restante das fatias foi armazenado em nitrogênio líquido a -120°C para posterior extração de RNA.

3.4. Determinação da resposta ao tratamento por meio de contagem do número de células em cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina.

As fatias de tumores cultivadas na ausência (controle) ou na presença de doxorrubicina (tratadas) foram emblocadas em parafina e a seguir coradas com hematoxilina e eosina (H.E.). Este procedimento foi realizado no Setor de Histologia do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, em

São Paulo. Os cortes histológicos foram visualizados em microscópio Nikon ECLIPSE E600, acoplado a um computador para geração da imagem digitalizada por meio do programa *Eclipse Net* versão 1.16.3 (*Nikon Instruments Europe*).

Realizou-se a contagem do número de células epiteliais em 10 campos de 2 milímetros de diâmetro, aleatoriamente escolhidos, desenhados sobre a lamínula da montagem do corte histológico. Para determinação do fator de erro de contagem, ou seja, a variação do número de células entre contagem realizada por observadores diferentes, foi realizada a contagem do número total de células em 16 amostras de tumores (8 pré e 8 pós-tratamento) por dois observadores diferentes. Observamos que houve correlação entre as contagens realizadas pelos dois observadores ($r = 0,797$, $p < 0,001$, correlação de Spearman) e que as variações percentuais média, mediana e quartil 75% (destas contagens entre os dois observadores) foram de 13,8; 11,8 e 21,7, respectivamente. Observamos ainda uma redução do número de células entre as oito amostras correspondentes, antes (1.777 ± 359) e após (1.487 ± 329), ($p = 0,017$, teste de Wilcoxon).

Selecionamos para determinação de resposta, o quartil 75% da variação de contagem entre observadores, isto é, reduções no número de células entre amostras tratadas e não tratadas, a partir de 21,7% caracterizaram amostras responsivas ao tratamento.

3.5. Extração de RNA total

As fatias de tumor congeladas foram submetidas à extração do RNA total pelo reagente Trizol® (solução monofásica de fenol e isocianato de guanidina (Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA), que é uma modificação do método desenvolvido por Chomezynsky & Sacchi (1987).

Aproximadamente 100 mg de tecido congelado foi pulverizado com Biopulverizer (Bio-Pulverizer™ BioSpec Products Inc., Oklahoma, EUA) e transferido para um microtubo contendo 1,5ml de Trizol®, homogeneizado por inversão e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente, antes de ser submetido a centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos. Neste mesmo tubo foi adicionado 200µL de clorofórmio, prosseguiu-se à homogeneização por inversão e, novamente centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos a 4° C.

A fase aquosa contendo o RNA foi recuperada e transferida para tubo novo, ao qual foi acrescentado 500µL de álcool isopropílico homogeneizado por inversão e mantido à temperatura de -20° C durante 12 horas. Após este período, o sobrenadante foi descartado e o material precipitado foi lavado em 1 mL etanol 75%. Prosseguiu-se a nova centrifugação a 7.500 x g por 5 minutos. A partir daí recuperou-se o material precipitado (RNA) o qual foi dissolvido em 20µl de água miliQ autoclavada e tratada com dietildicarbonato 0,002%(DEPEC) (Merck, Darmstadt, Alemanha).

A concentração de RNA foi determinada por espectrofotometria *Gene Quant pro* (Amersham-GE Healthcare Life Sciences, St. Giles, Reino Unido) em comprimento de onda de 260 nm (uma densidade ótica equivalente a

40µg de RNA por mL). A qualidade do RNA extraído foi verificada pela razão de absorbância a 260 nm pela absorbância 280 nm, que se manteve dentro dos limites preconizados ($A_{260/280} = 1,78$ a 2,0). Para verificar a integridade do RNA as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% contendo MOPS 1X e 5,1% de formaldeído. O RNA foi previamente desnaturado em tampão contendo 7% de glicerol, 10% de MOPS 10X (MOPS 2M, acetato de sódio 0,5M, EDTA 0,1M – pH 7,0), 53% de formamida, 17% de formaldeído, 6% de azul de bromofenol e incubação a 65° C por 15 minutos. A partir da identificação das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 18A e 28S, a amostra era considerada íntegra. (Figura 3).

Figura 3. Identificação das bandas correspondentes aos RNA ribossomais 18 e 28S em gel de agarose de 4 amostras diferentes. C(control), T (tratamento com doxorubicina, 1µM).

3.6. Reação da Transcriptase Reversa (RT) para obtenção do cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 5µg de RNA total diluído em 20 µl de água ultra pura (Water, Molecular Biology Grade) Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) na qual foram adicionados 2µl de hexâmeros iniciadores (0,5 µg/µl) (Amersham-GE Healthcare Life

Science, St. Giles, Reino Unido). Após 10 minutos de aquecimento a 70° C para desnaturação das fitas de RNA e, posteriormente, colocada imediatamente no gelo por 2 minutos. A esta solução foi acrescentado 7 µl de uma mistura contendo 4 µl de tampão da enzima *Super Script III* (Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA); 2 µl de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) a 2,5mM (Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA) 1µL de dietiltreitol (DTT) a 100mM (Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA). Após o período de aquecimento a 55° C por 10 minutos foi acrescentado 1µL da enzima transcriptase reversa *Super Script III* (5UI/µL) (Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA) e novamente procedeu-se incubação da reação a 55°C por 1 hora, para se obter a síntese da primeira fita 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 foi submetido à leitura em espectrofotômetro por meio da leitura da absorbância em 260 e 280nm e utilizado para a amplificação da região de interesse ou estocado a -20°C.

3.7. Reação de polimerização em cadeia do DNA (PCR) em tempo real

A PCR em tempo real avalia o acúmulo do produto DNA dupla fita na fase logarítmica da reação de amplificação, o qual está diretamente relacionado à quantidade de molde (cDNA) existente no início da reação,

sendo atualmente considerado um método bastante preciso e reprodutível para a quantificação da expressão gênica.

Utilizamos o sistema de detecção por *SYBR Green I*, que se baseia no uso de uma molécula fluorescente que, quando intercalada à dupla fita da DNA, emite fluorescência e então é possível quantificar o total de moléculas de DNA produzidas. Durante os ciclos iniciais da reação de PCR, não há acúmulo de fitas duplas suficientes para que a fluorescência emitida possa ser detectada; entretanto, no decorrer dos ciclos da reação há o aumento do produto amplificado e conseqüentemente o aumento do sinal de emissão de fluorescência, passando este a ser detectável. A figura 4 representa o gráfico de amplificação em tempo real, onde observamos uma linha basal (nesta fase não é possível identificar fluorescência pela pequena quantidade de amplificação), uma fase logarítmica (aonde a quantidade de produto amplificado dobra a cada ciclo), uma fase linear (observa-se um pequeno aumento de produto) e uma fase *plateau* (quando não há mais amplificação do produto).

Figura 4. Representação da amplificação de moléculas de DNA na reação de PCR em tempo real.

A metodologia que utiliza o *SYBR Green I* exige cuidadosa padronização, uma vez que este fluorocromo se intercala a qualquer molécula de dupla fita presente na reação. A especificidade da detecção de fluorescência com *SYBR Green I* pode ser comprometida pela formação de dímeros de oligonucleotídeos, pela concentração inadequada de oligonucleotídeos e pela formação de produtos inespecíficos de amplificação. Todos estes fatores levam à formação de moléculas de dupla fita não esperadas, as quais incorporam o *SYBR Green I* e têm sua fluorescência registrada.

Neste método de detecção, a confirmação de especificidade da amplificação é realizada por meio da análise da curva de desnaturação. Nesta curva, analisa-se a fluorescência das amostras em relação ao aumento contínuo da temperatura, o que possibilita determinar a temperatura de desnaturação (T_m) de cada fragmento, resultante da reação de amplificação. Cada fragmento amplificado possui uma T_m específica, o que permite a diferenciação entre os produtos resultantes.

Durante a reação, a fluorescência aumenta a cada novo ciclo de polimerização e atinge um limiar (*threshold*), no qual todas as amostras podem ser comparadas. Este limiar corresponde ao momento utilizado para análise da fluorescência. Este é um ponto definido pelo pesquisador e obrigatoriamente deve estar na fase exponencial da reação de PCR, quando a quantidade de produto formado traduz de forma satisfatória a concentração inicial de fitas molde (cDNA) amplificadas pela reação. O ciclo exato no qual o limiar de fluorescência é definido denomina-se ciclo limiar

(*Ct: threshold cycle*). Amostras mais concentradas (com maior número de fitas molde iniciais) atingem o limiar mais precocemente e exibem valores de *Ct* mais baixos. Quando a eficiência da reação de PCR está próxima de 100%, o número de cópias geradas aumenta de forma exponencial, dobrando a cada ciclo da reação.

3.8. Desenho dos *primers*

Os *primers* dos transcritos dos genes PRSS11, MTSS1, CLPTM1, SMYD2, NOTCH1, RPL37A e GAPDH (Quadro 1) foram desenhados para a espécie canina a partir da sequência de mRNA descrita no endereço www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide. A sequência do mRNA foi analisada no endereço <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgblat> e com as informações obtidas escolhemos a região de interesse para a construção do *primer*, ou seja, uma região com presença de grandes íntrons entre éxons de interesse contidos no DNA do gene (assim diminuímos a chance de reação cruzada com o DNA genômico, pois a DNA polimerase não sintetiza fragmentos de grande tamanho). O desenho dos *primers* foi realizado no programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) e a homologia dos *primers* construídos em relação a diversas sequências depositadas foi verificada no endereço www.ncbi.nlm.nih.gov/blast. Este passo determinou se a utilização do mesmo iria amplificar só a região de interesse ou outras inespecíficas que poderiam intervir no resultado. Também verificamos se os

primers selecionados não formavam estruturas estáveis indesejadas (secundárias) e para isso utilizamos o programa OligoTech versão 1.00, Copyright (1995).

Quadro 1. Desenho dos *primers* dos transcritos dos genes alvo e tamanho do produto

Gene		<i>Primer</i>	Tamanho do produto
PRSS1	<i>Sense</i>	TGCTTTTCGGAGCGTATATC	159 pares de base
	<i>Anti-sense</i>	CCATGTTTCAGGGTGTCTCC	
MTSS1	<i>Sense</i>	GACTCCCTTCAGTGCTCCAG	189 pares de bases
	<i>Anti-sense</i>	CCGGTAAGACTGGCTGATGT	
CLPTM1	<i>Sense</i>	TGAGGGCCTTGTAAGTGAGC	151 pares de bases
	<i>Anti-sense</i>	CACAAGGGCTGGTACTCCTG	
SMYD2	<i>Sense</i>	GCTTGTACATGCAGGACTGG	202 pares de bases
	<i>Anti-sense</i>	CCGTGAGCCACTTCCATTAT	
NOTCH1	<i>Sense</i>	TCACCACCTCCAGACTACCC	162 pares de bases
	<i>Anti-sense</i>	CACTTCCATGCCCAAATTC	
RPL37A	<i>Sense</i>	TCAGGGTCCTACGGACAATC	171 pares de bases
	<i>Anti-sense</i>	TACTTCCAGGGTTTGCCTTG	
GAPDH	<i>Sense</i>	GGGTCATCATCTCTGCTCCT	150 pares de bases
	<i>Anti-sense</i>	AGTGGTCATGGATGACTTTGG	

3.9. Padronização da reação de polimerização em cadeia do DNA (PCR) em tempo real

Como a intenção do presente trabalho é a de identificar um perfil preditivo dos tumores ao tratamento com doxorrubicina somente o material extraído das fatias de tumores controle ao tratamento foi submetido à reação de PCR em tempo real.

A reação de PCR foi padronizada a partir de um volume inicial de 15 μL contendo uma mistura de 2 μL de tampão para PCR 10X (Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA) 0,8 μL de cloreto de magnésio 50mM (Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA), 1,6 μL de deoxinucleotídeos trifosfatatos 2,5 μM (Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA), 0,4 μL de cada um dos *primers* (Integrated DNA Technologies, Iowa, EUA) 10 μM , 1 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) 5%, 0,2 μL do fluorocromo *SYBR Green I* na diluição 1:100 (Roche Diagnostic, Basel, Suíça) e 0,3 μL da enzima *Taq Platinum* DNA polimerase (Invitrogen Corporation). A esta mistura foi adicionado 1 μL de cDNA (molde) da amostra de interesse, o que correspondia a 1 μg de cDNA.

As reações foram preparadas em duplicata e submetidas às condições adequadas de temperatura em termociclador (Corbett Research, Mortlake, Sydney, Austrália). Inicialmente os tubos contendo a mistura dos reagentes foram submetidos a 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, seguido do pareamento do *primer* à fita molde a 60°C por 60 segundos e então extensão de polimerização da molécula de DNA a 72°C por 60 segundos.

Todas as amostras foram analisadas pelo programa *Rotor-Gene 6 System* (Corbett Research, Mortlake, Sydney, Austrália) e a média dos valores de ciclos limiares de cada amostra (Ct) foi utilizada para quantificação da expressão dos genes de interesse. A variação entre os Ct das reações em duplicata não excedeu 1,5 ciclo.

3.9.1. Análise dos resultados de expressão gênica por PCR em tempo real

A expressão dos genes de interesse (transcritos alvo) foi determinada pelo método de quantificação relativa em relação ao gene normalizador GAPDH (controle endógeno). Utilizamos com amostras referência um *pool* de tecido de mama normal proveniente de 3 animais diferentes, as quais também foram submetidas à mastectomia para remoção de tumores. As amostras de tecido mamário normal foram coletadas de mamas distantes às comprometidas pelo tumor.

Para realização do cálculo da expressão relativa do gene (R) foi utilizado o modelo matemático proposto por PFAFFL (2001).

$$R = \frac{E_{\text{alvo}}^{\Delta Ct_{\text{alvo}}}}{E_{\text{normalizador}}^{\Delta Ct_{\text{normalizador}}}}$$

Onde:

E alvo: eficiência da reação de PCR em tempo real do transcrito alvo,

E normalizador: eficiência da reação de PCR em tempo real do transcrito normalizador (GAPDH),

ΔCt alvo: diferença entre o Ct do gene alvo obtido para a amostra em análise e o Ct do gene alvo obtido para a amostra referência (*pool* mama normal),

ΔCt normalizador: diferença entre o Ct do gene endógeno obtido para a amostra em análise e o Ct do gene endógeno obtido para a amostra referência.

As eficiências da reação de PCR em tempo real para os genes alvo e normalizador foram calculadas de acordo com a equação:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})}$$

em que **slope** corresponde à inclinação da reta obtida quando se analisa a variação do Ct dos genes alvo e normalizador em função do log, na base 10, de diferentes quantidades de cDNA. No caso do programa Rotor Gene 6 a inclinação da reta é dada como o valor de M (Figura 4).

Para o cálculo da eficiência foram utilizadas quatro diferentes quantidades de cDNA obtidas por meio da diluição seriada da amostras de cDNA original, que foi sintetizada a partir de 5 µg de RNA total. As quantidades utilizadas foram: 1200, 600, 300 e 150 ng de cDNA.

Figura 5. Curva de eficiência representativa do transcrito PRSS11.

3.9.2. Avaliação da expressão gênica para classificação das amostras de acordo com a resposta à doxorrubicina.

As amostras tumorais foram dispostas espacialmente de acordo com a expressão de grupos de três genes alvo. O objetivo foi determinar se a expressão, de trios de genes, permitia a correta classificação das amostras consideradas responsivas e não responsivas. Para isso utilizou-se o método de discriminação linear de Fischer (Duda et al., 2000) para gerar um plano separador.

4. RESULTADOS

4.1. Pacientes

Foram avaliadas 38 pacientes caninas com idade mediana de 10,4 anos. Cinquenta e cinco por cento (21/38) desta amostra estava composta por animais sem raça definida (SRD); sendo a raça pura mais comum representada pela raça *poodle* em 18,42% dos casos (7/38). Oito pacientes (21,05%) haviam sido submetidas à cirurgia de esterilização antes do diagnóstico de câncer de mama num período médio de 21 meses. O Quadro 2 apresenta as características clínico-patológicas das pacientes e os tipos histológicos diagnosticados pela análise histopatológica.

Das pacientes avaliadas quanto ao estadio clínico, 39,47% (15/38) foram classificadas como estadio clínico III, 18,42% e 28,94% (11/38) foram classificadas como estadios clínicos I e II, respectivamente. Em 2 pacientes houve confirmação de comprometimento de linfonodos regionais por células metastáticas (5,26%). Cinco pacientes apresentavam-se em estadio clínico IV e exibiam imagens radiográficas compatíveis com metástase pulmonar.

Quanto à classificação histopatológica, 34,2% (13/38) dos carcinomas apresentavam arranjo cístico-papilífero, 18,42% (7/38) túbulo-papilífero e 34,2% (13/38) arranjo tubular (13/38). Os tipos sólidos representaram 10,52% das amostras analisadas.

Quadro 2. Características clínico-patológicas das pacientes

Número amostra	Raça	Idade (anos)	Esterilização Cirúrgica Prévia	T	N	M	Estadio clínico	Tipo histológico	Grau histológico
3	S.R.D.	12	Sim	3	(-)	0	III	Carcinoma papilífero	I
4	Doberman	8	Não	3	(-)	1	IV	Carcinoma tubular	I
5	Pastor Alemão	12	Não	3	(-)	0	III	Carcinoma tubular	III
6	Pastor Belga	13	Não	3	(-)	0	III	Carcinoma complexo	II
7	S.R.D.	13	Não	1	(-)	0	I	Carcinoma tubular	I
8	Mastin Napolitano	8	Não	1	(-)	0	I	Carcinoma tubular	I
9	Poodle	12	Não	2	(-)	0	II	Carcinoma cístico papilífero	I
10	S.R.D.	10	Não	3	(-)	0	III	Carcinoma cístico papilífero	II
11	S.R.D.	11	Não	2	(-)	0	II	Carcinoma cístico papilífero	I
12	Akita	7	Não	3	(-)	x	III	Carcinoma cístico papilífero	I
13	Akita	11	Não	3	(-)	0	III	Carcinoma tubular	II
14	S.R.D.	9	Não	2	(-)	0	II	Carcinoma tubular	II
17	S.R.D.	15	Não	2	(-)	0	II	Carcinoma sólido	II
19	S.R.D.	13	Não	1	(-)	0	I	Carcinoma túbulo papilífero	II
20	S.R.D.	6	Não	3	(-)	0	III	Carcinoma sólido	n.i.
21	Teckel	12	Não	3	(-)	0	III	Carcinoma sólido	n.i.
24	Poodle	10	sim	1	(-)	0	I	Carcinoma tubular	n.i.
27	S.R.D.	12	Não	3	(+)	1	IV	Carcinoma tubular	I
29	S.R.D.	15	Não	1	(-)	0	I	Carcinoma papilífero	I
31	Poodle	8	Não	2	(-)	0	II	Carcinoma cístico papilífero	n.i.
32	S.R.D.	11	Não	1	(-)	0	I	Carcinoma tubular	I
33	S.R.D.	13	Não	3	(-)	x	III	Carcinoma cístico papilífero	I
34	S.R.D.	13	Não	2	(-)	0	II	Carcinoma tubular	n.i.
35	Poodle	11	Não	3	n.i.	0	III	Carcinoma cístico papilífero	II
36	S.R.D.	15	Sim	3	(-)	0	III	Carcinoma cístico papilífero	I
38	S.R.D.	7	Não	3	(-)	0	III	Carcinoma túbulo-papilífero	n.i.
39	S.R.D.	11	Sim	3	(-)	1	IV	Carcinoma túbulo papilífero	I
40	S.R.D.	2	Sim	2	(-)	0	II	Carcinoma sólido	n.i.
41	Setter Irlandês	13	Não	3	(-)	0	III	Carcinoma tubular	I

continua

conclusão do Quadro 2

Número amostra	Raça	Idade (anos)	Esterilização Cirúrgica Prévia	T	N	M	Estadio clínico	Tipo histológico	Grau histológico
42	S.R.D.	14	Sim	3	(-)	0	III	Carcinoma túbulo-papilífero	III
43	Cocker spaniel	8	Não	3	(-)	0	III	Carcinoma cístico papilífero	n.i.
44	Poodle	8	Não	2	(-)	0	II	Carcinoma túbulo-papilífero	I
45	Poodle	8	Não	2	(-)	0	II	Carcinoma cístico papilífero	I
46	Poodle	10	Sim	2	(-)	1	IV	Carcinoma túbulo papilífero	I
47	Rotweiler	9	Sim	2	(-)	0	II	Carcinoma tubular	I
48	S.R.D.	7	Não	2	(-)	0	II	Carcinoma cístico papilífero	n.i.
49	Akita	7	Não	2	(+)	1	IV	Carcinoma tubulo papilífero	III
50	S.R.D.	13	Não	1	(-)	0	I	Carcinoma tubular	II

Classificação quanto ao estadio clínico (OWEN, L.N., 1980; World Health Organization)

Tamanho do tumor ao exame físico

T₁ < 3cm, T₂ = 3-5 cm, T₃ > 5 cm, T_a = tumor móvel, T_b = tumor fixo à pele, T_c = tumor fixo ao músculo

Comprometimento do linfonodo ao exame físico e ao exame histopatológico

N₀ = não evidência de aumento de linfonodo, N₁ = comprometimento de linfonodo regional ipsilateral, N₂ = comprometimento de linfonodo bilateral; N_a = fixo; N_b = não fixo

N (-) = ausência de células metastáticas, N (+) = presença de células metastáticas

Comprometimento metastático à distância

M - imagem sugestiva de metástase pulmonar ao exame radiográfico

M₀ = ausência de imagens sugestivas de metástase, M₁ = imagem(ns) sugestiva(s) de metástase, Mx = impossível avaliar a existência de imagens sugestivas de metástases)

I	T _{1a, b ou c}	N ₀ (-) ou N _{1a} (-) ou N _{2a} (-)	M ₀
II	T ₀ T _{1a,b,ou c} T _{2a, b ou c}	N ₁ (+) N ₁ (+) N ₀ (+) ou N _{1a} (+)	M ₀
III	Qualquer T ₃ Qualquer T	Qualquer N Qualquer N _b	M ₀
IV	IV	Qualquer T	M ₁

Classificação quanto ao grau histológico

Identificado por meio de coloração de eosina e hematoxilina (Elston e Ellis (1991) e definido conforme:

- formação tubular, pelomorfismo nuclear e index mitótico
- cada achado recebeu um número de pontos, variando de 1 a 3:
- **Score:**
- 2 a 5 pontos = carcinoma bem diferenciado (Grau I)
- 6 a 7 pontos = carcinoma moderadamente diferenciado (Grau II)
- 8 a 9 pontos = carcinoma pouco diferenciado (Grau III)

S.R.D. – sem raça definida

n.i. – dado não informado

4.2. Resposta ao Tratamento

As amostras de tumores obtidas de 38 pacientes durante o ato cirúrgico foram fatiadas, dispostas em placas de Petri e separadas em grupos de tratamento com doxorubicina 1 μ M e controle (ausência de doxorubicina). Após 24 horas de tratamento as fatias de tumor foram coletadas e, após emblocamento em parafina, foram realizados cortes para coloração de hematoxilina-eosina. Procedeu-se então à contagem das células nas fatias controle e tratada com doxorubicina (Figuras 6 e 7).

Por meio deste método identificamos uma redução média de 13,64% (mediana de 11,75%) no número total de células das amostras tratadas com doxorubicina em relação às não tratadas (controle) e esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$, Teste de Mann-Whitney). O total do número de células em todos os campos analisados está exposto no Quadro 3.

A determinação do tipo de resposta ao tratamento foi realizada de acordo com o descrito em Casuística e Métodos e baseou-se na variação de contagem entre dois observadores. Os tumores tratados com doxorubicina que apresentaram diminuição de contagem celular, em relação ao controle, além de 21,7% foram classificados como sensíveis ao tratamento, enquanto que aqueles que apresentaram redução inferior a 21,7% ou aumento do número de células foram classificados como resistentes ao tratamento. Desta forma, classificamos 9 tumores (23,68%) como sensíveis e 29 (76,31%) como resistentes ao tratamento in vitro com doxorubicina, numa concentração de 1 μ M, durante o período de 24 horas (Figura 8)

Figura 6. Amostras tumorais não tratadas (A e C) e tratadas (B e D) com doxorrubicina a $1\mu\text{M}$ (aumento 40X). Em alguns casos pode-se observar o descolamento de células da membrana basal (*anoikis*) (seta), e a presença de núcleos picnóticos, indicativo de apoptose.

Figura 7. Amostras tumorais não tratadas (A e C) e tratadas (B e D) com doxorrubicina a $1\mu\text{M}$ (pequeno aumento, 20X).

Quadro 3. Número de células nos cortes histológicos das amostras de tumores de mama de cadelas controle e tratadas com doxorrubicina a 1 μ M

Amostra	Tipo de resposta	Controle (somatória em todos os campos)	Tratado 1 μ M (somatória em todos os campos)	Variação do número de células (%)
3	Sensível	2307	1543	33,12 (-)
4	Resistente	335	297	11,34 (-)
5	Resistente	2611	2472	5,32 (-)
6	Resistente	2800	2575	8,04 (-)
7	Sensível	472	216	54,24 (-)
8	Sensível	445	278	37,53 (-)
9	Resistente	354	304	14,12 (-)
10	Resistente	1339	1412	5,45 (+)
11	Resistente	1581	1337	15,43 (-)
12	Sensível	1405	625	55,52 (-)
13	Resistente	644	656	1,86 (+)
14	Resistente	699	700	0,14 (+)
17	Resistente	5414	5086	6,06 (-)
19	Resistente	2816	2602	7,60 (-)
20	Resistente	1268	1095	13,64(-)
21	Resistente	1851	1644	11,18 (-)
24	Resistente	11189	9691	13,39 (-)
27	Sensível	4964	3713	25,20 (-)
29	Resistente	1047	1031	1,53 (-)
31	Resistente	1869	1656	11,40 (-)
32	Sensível	1629	1199	26,40 (-)
33	Sensível	1675	1234	26,33 (-)
34	Resistente	1879	1722	8,36 (-)
35	Resistente	2155	2103	2,41 (-)
36	Resistente	668	576	13,77 (-)
38	Resistente	4849	4262	12,11 (-)
39	Resistente	3329	3266	1,89 (-)
40	Sensível	4376	3396	22,39 (-)
41	Resistente	3559	2863	19,56 (-)
42	Resistente	2716	2932	7,95 (+)
43	Sensível	4605	3569	22,50 (-)
44	Resistente	5025	4242	15,58 (-)
45	Resistente	4239	4147	2,17 (-)
46	Resistente	4334	4146	4,34 (-)
47	Resistente	3691	4131	11,92 (+)
48	Resistente	5841	4659	20,24 (-)
49	Resistente	2201	2256	2,50 (+)
50	Resistente	5578	4533	18,73 (-)

Figura 8. Variação do número de células nos tumores resistentes (n=29) e sensíveis (n=9) ao tratamento com doxorrubicina na concentração de 1 μ M durante o período de 24 horas.

A representação gráfica em **boxplot** mostra a distribuição de todos os valores entre as barras (quartis 25, 50 e 75 dentro da caixa), exceto valores extremos (°: valores que ultrapassam 1,5 a 3 vezes a dimensão da caixa além do quartil 75; * valores que ultrapassam 3 vezes a dimensão da caixa além do quartil 75).

4.3. Expressão dos genes de interesse em relação à sensibilidade ou resistência à doxorrubicina.

A expressão dos genes alvo foi determinada nas amostras mantidas em cultura na ausência de doxorrubicina pelo método de PCR em tempo real e, analisadas de acordo com o tipo de resposta, isto é, sensível vs resistente à doxorrubicina (Tabela 2).

A expressão dos genes de interesse PRSS11, MTSS1, CLPTM1, SMYD2, NOTCH1 e RPL37A não variou entre os tumores considerados sensíveis e resistentes (Figuras 9 a14).

Tabela 2. Média de expressão dos genes de interesse em amostras controle ao tratamento com doxorrubicina

Gene	Sensíveis	Resistentes	Sensíveis	Resistentes	Sensível	Resistente
	(média $\pm$ DP)	média $\pm$ DP	mediana	mediana	variação	variação
PRSS11	9,276 $\pm$ 22,761	20,550 $\pm$ 44,605	1,249	4,715	0,000003 a 69,656	0,003 a 197,226
MTSS1	0,462 $\pm$ 0,648	1,770 $\pm$ 3,198	0,221	0,536	0,0001 a 2,024	0,001 a 15,172
CLPTM1	14,800 $\pm$ 42,40	29,671 $\pm$ 109,590	0,755	1,510	0,0001 a 127,861	0,0002 a 568,050
SMYD2	0,723 $\pm$ 0,897	9,850 $\pm$ 47,108	0,332	0,399	0,0001 a 2,625	0,002 a 250,079
NOTCH1	0,748 $\pm$ 1,570	1,411 $\pm$ 2,862	0,221	0,264	0,038 a 4,623	0,005 a 12,507
RPL37A	0,221 $\pm$ 0,222	4,109 $\pm$ 19,810	0,128	0,289	0,0003 a 0,619	0,043 a 105,168

Figura 9. Expressão do gene PRSS11, em amostras controle de tumores resistentes (n=28) e sensíveis (n=9) ao tratamento com doxorrubicina (1 μ M) durante 24 horas.
p = 0,1 (Teste de Mann Whitney)

Figura 10. Expressão do gene MTSS1 em amostras controle de tumores resistentes (n=28) e sensíveis (n=9) ao tratamento com doxorrubicina (1 μ M) durante 24 horas.
p = 0,255 (Teste de Mann Whitney).

Figura 11. Expressão do gene CLPTM1 em amostras controle de tumores resistentes (n=28) e sensíveis (n=9) ao tratamento com doxorrubicina (1 μ M) durante 24 horas.
p = 0,453 (Teste de Mann Whitney)

Figura 12. Expressão do gene SMYD2 em amostras controle de tumores resistentes (n=28) e sensíveis (n=9) ao tratamento com doxorrubicina (1 μ M) durante 24 horas.
p = 0,689 (Teste de Mann Whitney)

Figura 13. Expressão do gene NOTCH1 em amostras controle de tumores resistentes (n=28) e sensíveis (n=8) ao tratamento com doxorrubicina (1 μ M) durante 24 horas.
p = 0,837 (Teste de Mann Whitney)

Figura 14. Expressão do gene RPL37A em amostras controle de resistentes (n=28) e sensíveis (n=8) ao tratamento com doxorrubicina (1 μ M) durante 24 horas.
p = 0,358 (Teste de Mann Whitney).

4.4. Distribuição espacial das amostras de acordo com a expressão dos trios de genes de interesse

Avaliamos, inicialmente, a distribuição tridimensional das amostras de acordo com expressão de combinação de dois trios de genes compreendendo PRSS11, MTSS1, CLPTM1, SMYD2, NOTCH1 e RPL37A. Esta análise não permitiu a correta separação das amostras em responsivas e não responsivas (Figuras 15, 16). A seguir efetuamos análise semelhante utilizando as outras 18 combinações de trios de genes e, novamente, não detectamos uma separação clara entre amostras resistentes e sensíveis (Figuras 17 a 34).

Figura 15. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes PRSS11, MTSS1, CLPTM1 (+ sensível, x resistente).

Figura 16. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes PRSS11, MTSS1, SMYD2 (+ sensível, x resistente).

Figura 17. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes CLPTM1, NOTCH1, RPL37A representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).

Figura 18. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes CLPTM1, SMYD2, NOTCH1 representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).

Figura 19. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes CLPTM1, SMYD2, RPL37A representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).

Figura 20. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes MTSS1, CLPTM1, NOTCH1 representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).

Figura 21. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes MTSS1, CLPTM1, RPL37A representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).

Figura 22. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes MTSS1, CLPTM1, SMYD2 representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).

Figura 23. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes MTSS1, NOTCH1, RPL37A representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).

Figura 24. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes MTSS1, SMYD2, NOTCH1 representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).

Figura 25. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes MTSS1, SMYD2, RPL37A representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).

Figura 26. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes PRSS1, CLPTM1, NOTCH1 representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).

Figura 27. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes PRSS11, CLPTM1, RPL37A representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).

Figura 28. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes PRSS11, CLPTM1, SMYD2 representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).

Figura 29. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes PRSS11, MTSS1, NOTCH1 representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).

Figura 30. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes PRSS11, MTSS1, RPL37A representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).

Figura 31. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes PRSS11, NOTCH1, RPL37A representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).

Figura 32. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes PRSS11, SMYD2, NOTCH1 representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).

Figura 33. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes PRSS11, SMYD2, RPL37A representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).

Figura 34. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes SMYD2, NOTCH1, RPL37A representada nos eixos x, z e y, respectivamente (+ sensível, x resistente).

Utilizamos então outro critério para determinar resposta ao tratamento, isto é, a redução percentual mediana entre tumores expostos à doxorrubicina, em relação ao não expostos, que foi de 11,75%. Desta maneira, 18 amostras foram consideradas responsivas e 20 amostras não responsivas. Determinamos a distribuição espacial das amostras de acordo com a expressão de dois trios de genes PRSS11, MTSS1 e CLPTM1 e PRSS11, MTSS1 e SMYD2 e também não observamos uma correta classificação de resposta (Figuras 35 e 36).

Figura 35. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes PRSS11, MTSS1, CLPTM1 (+ sensível, x resistente).

Figura 36. Distribuição tridimensional das amostras de acordo com a expressão dos genes PRSS11, MTSS1, SMYD2 (+ sensível, x resistente).

4.5. Correlação entre expressão relativa dos genes de interesse e a variação do número de células entre amostras controle e tratadas com doxorrubicina

Não observamos correlação entre os valores de expressão dos genes alvo e a variação do número de células entre amostras tratadas e não tratadas ($p > 0,05$, correlação de Spearman) (Tabela 3 e Figuras 37 a 42).

Tabela 3. Correlação entre o número de células e a expressão dos genes de interesse (correlação de Spearman).

	PRSS11	MTSS1	CLPTM1	SMYD2	NOTCH1	RPL37A
Variação	$r = -0,214$	$r = -0,226$	$r = -0,179$	$r = -0,131$	$r = -0,308$	$r = -0,145$
n° de células	$p = 0,203$	$p = 0,178$	$p = 0,288$	$p = 0,440$	$p = 0,067$	$p = 0,398$

Figura 37. Correlação entre o valor de expressão do gene PRSS11 e a variação do número de células em entre amostras controle e tratadas.

Figura 38. Correlação entre o valor de expressão do gene MTSS1 e a variação do número de células em entre amostras controle e tratadas.

Figura 39. Correlação entre o valor de expressão do gene CLPTM1 e a variação do número de células em entre amostras controle e tratadas.

Figura 40. Correlação entre o valor de expressão do gene NOTCH1 e a variação do número de células em entre amostras controle e tratadas.

Figura 41. Correlação entre o valor de expressão do gene SMYD2 e a variação do número de células em entre amostras controle e tratadas.

Figura 42. Correlação entre o valor de expressão do gene RPL37A e a variação do número de células em entre amostras controle e tratadas.

4.6. Expressão dos genes de interesse em relação ao grau de diferenciação do tumor

Analizamos a expressão dos genes de interesse em relação a grau histológico dos tumores, os quais foram divididos em dois grupos, bem diferenciados (grau I) e pouco diferenciados (grau II e III). Oito tumores não foram incluídos nesta análise, pois o laudo histopatológico não fornecia o grau de diferenciação do tumor.

A expressão dos genes PRSS11, MTSS1, CLPTM1, SMYD2 e RPL37A entre amostras de tumores bem diferenciados e pouco diferenciados não variou (Tabela 4 e Figuras 43 a 47), mas a expressão de NOTCH1 foi maior em tumores pouco diferenciados (Figura 48).

Tabela 4. Expressão dos genes de interesse em amostras de tumores bem diferenciados (grau I) e pouco diferenciados (grau II e III).

Genes	Bem (grau I)	Pouco (grau II e III)	Bem (grau I)	Pouco (grau II e III)	Bem (grau I)	Pouco (grau II e III)
	(média $\pm$ DP)	média $\pm$ DP	mediana	mediana	variação	variação
PRSS11	11,218 $\pm$ 21,366	20,550 $\pm$ 44,605	46,674	31,397	0,054 a 257.343,248	2,469 a 8037,641
MTSS1	1,059 $\pm$ 1,881	2,430 $\pm$ 4,428	0,102	6,473	0,102 a 79.550,099	0,051 a 2.388,362
CLPTM1	39,572 $\pm$ 135,229	17,603 $\pm$ 45,141	6,265	13,705	0,380 a 109.110,940	0,133 a 53.664,433
SMYD2	39,572 $\pm$ 135,229	17,603 $\pm$ 45,141	4,965	2,573	0,209 a 60.574,106	0,449 a 33.755,959
NOTCH1	0,655 $\pm$ 1,259	3,032 $\pm$ 4,036	3,110	4,212	0,204 a 10.189,940	0,289 a 20.269,646
RPL37A	0,257 $\pm$ 0,254	0,517 $\pm$ 0,567	2,338	2,148	0,246 a 30998,088	0,087 a 8.395,022

Figura 43. Expressão do gene PRSS11 em amostras de tumores bem diferenciados (Grau I) e pouco diferenciados (Grau II e III).
 $p = 0,317$ (Teste de Mann Whitney)

Figura 44. Expressão do gene MTSS1 em amostras de tumores bem diferenciados (Grau I) e pouco diferenciados (Grau II e III).
 $p = 0,276$ (Teste de Mann Whitney)

Figura 45. Expressão do gene CLPTM1 em amostras de tumores bem diferenciados (Grau I) e pouco diferenciados (Grau II e III).
 $p = 0,220$ (Teste de Mann Whitney)

Figura 46. Expressão do gene SMYD2 em amostras de tumores bem diferenciados (Grau I) e pouco diferenciados (Grau II e III).
 $p = 0,317$ (Teste de Mann Whitney)

Figura 47. Expressão do gene RPL37A em amostras de tumores bem diferenciados (Grau I) e pouco diferenciados (Grau II e III).

$p = 0,161$ (Teste de Mann Whitney)

Figura 48. Expressão do gene NOTCH1 em amostras de tumores bem diferenciados (Grau I) e pouco diferenciados (Grau II e III).

$p = 0,028$ (Teste de Mann Whitney)

5. Discussão

A doxorubicina é um dos principais agentes quimioterápicos no tratamento do câncer de mama em mulheres e em cadelas. Avaliamos inicialmente no presente trabalho, a sensibilidade de fatias de câncer de mama de cadelas ao tratamento *in vitro* com doxorubicina num modelo que propicia a manutenção da relação epitélio-mesênquima do tecido tumoral.

Estudo original ilustra bem a importância da inter-relação epitélio-mesênquima na carcinogênese mamária. Kuperwasser e colaboradores (2004) provocaram em camundongos imunocomprometidos o desenvolvimento de tecido estromal humanizado contendo fibroblastos que hiper-expressavam fatores de crescimento como fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento transformante tipo β (TGF β) ou ambos. A seguir injetaram células epiteliais mamárias originárias de mamoplastia de mulheres sem câncer e observaram o aparecimento de tumores. Neste caso, as células estromais parecem fornecer condições para que células epiteliais iniciadas originem um câncer. Logo, é possível que a relação epitélio-mesênquima também exerça influência nos processos de proliferação, apoptose e sensibilidade a um tipo de tratamento. Acreditamos, portanto, que este modelo que utiliza fatias para o estudo do comportamento do tumor permita uma avaliação da resposta à quimioterapia em condição mais próxima àquela presente *in vivo*.

Um fator a ser discutido é a espessura das fatias, uma vez que a difusão passiva do oxigênio e de nutrientes ocorre até uma espessura de cerca de 200 μ m (Griffith et al., 2005). Acreditamos que o fármaco tenha se difundido para todo o tumor, pois as fatias apresentavam espessura entre 300 a 400 μ m e, por serem bastante delgadas, permaneciam flutuando no meio de cultura que as continha, entretanto, Lankelma et al. (2000) sugerem que são necessárias, em média, 224 horas para a perfusão da doxorubicina até a porção mais central de fragmentos de câncer de mama de mulheres com cerca de 300 μ m de espessura e, esta difusão pode ser mais lenta dependendo da celularidade do tecido tumoral, sugerindo que a ausência de resposta ao tratamento possa ocorrer não pela resistência ao tratamento, mas pela dificuldade de difusão em todas as células que compõem o fragmento cultivado. Observamos em nossos dados que os tumores considerados resistentes apresentavam, em média, 2703 células nos campos observados enquanto nos tumores sensíveis esta contagem era de cerca de 1752 células.

Outro fator a ser discutido é a concentração ideal do fármaco. Yeu-Tsu e colaboradores (1982) estudaram a farmacocinética da doxorubicina em camundongos e relatam concentração plasmática de cerca de 1,7 μ M, mensurada após 1 hora da infusão de doses entre 15 e 50 mg/kg da droga, enquanto dados de Simon e colaboradores (2001) indicam que em cães, o pico plasmático de concentração da doxorubicina após administração intravenosa de 30mg/m², é de 3,5 μ M. Esta concentração decai rapidamente para valores pouco inferiores a 1 μ M. Portanto, o tratamento das fatias de

tumor foi realizado com concentração de doxorubicina semelhante à observada *in vivo* em diferentes animais.

Observamos que o tratamento das fatias tumorais com doxorubicina 1 μ M por 24 horas determinou uma redução média do número de células tumorais de 13,6%, que pode ser comparado aos dados apresentados por Ciftci et al, (2003) em linhagens celulares mamárias normais (MCF10) ou cancerosas (MCF7, MDA) em que a redução variou de 12 a 16%. Nossos dados em linhagem em cultura indicam que o número de células MCF7 expostas à doxorubicina corresponde a 41,5% daquelas mantidas na ausência do tratamento e, estes resultados são comparáveis aos encontrados por Simon e colaboradores (2001) que identificaram que a concentração inibitória de 50% de células isoladas de câncer de mama de cadelas, obtidas pela desagregação de fragmentos de tumores removidos cirurgicamente, é de 0,84 μ M. Apesar de tentarmos manter as condições *in vitro* mais próximas àsquelas encontradas *in vivo*, como a manutenção da arquitetura tecidual e a concentração fisiológica do fármaco, não há como mimetizar a farmacocinética, entre outros fatores.

Em nosso estudo, nove amostras ou 23,68%, foram classificadas como sensíveis ao tratamento, pois, as fatias tratadas apresentaram redução do número de células superior ao determinado pelo fator de erro de contagem entre dois observadores. Por outro lado, estudos clínicos indicam que mulheres com doença ressecável T1-T3 e N0-2 tratadas com quimioterapia neoadjuvante, incluindo 4 ciclos de antraciclinas, apresentam alta taxa de resposta clínica objetiva (resposta completa e parcial), que varia entre 49 a

85%, enquanto 4 a 13% apresentam resposta patológica completa (Fisher et al., 1998; van der Hage et al., 2001; Mauri et al., 2005) e 1 a 3% progressão da doença. Vale lembrar, que a resposta clínica parcial, avaliada pela medição do tumor correspondente a uma redução $\geq 30\%$ na maior dimensão da lesão, avaliada ao final do tratamento, segundo critérios RECIST (Therasse et al., 2000). Portanto, acreditamos que os dados do presente trabalho sejam reais e reflitam uma resposta inicial que provavelmente seria mais intensa se outros ciclos de tratamento fossem efetuados.

Podemos aventar outras hipóteses para tentar explicar esta diferença de taxa de resposta em relação a casuística analisada nos dois trabalhos quanto ao estadiamento clínico e ao grau de diferenciação do tumor.

Em estudo prévio, a maioria (80%) das mulheres apresentava-se em estadiamento clínico III (Folgueira et al., 2005) enquanto que dentre as pacientes caninas participantes deste estudo, 39,4% foram classificadas como estadiamento clínico III. Em relação às duas espécies, as formas de estadiamento clínico diferem, pois em cadelas os tumores mamários caninos o estadiamento clínico III considera a informação do volume tumoral superior à informação de comprometimento linfonodal por células tumorais, diferente do critério adotado no estadiamento clínico de mulheres. Além disso, entre as pacientes caninas, 13,1% apresentavam-se em estadiamento clínico IV, pois exibiam imagens radiográficas compatíveis com metástase pulmonar.

Quanto ao grau de diferenciação dos tumores analisados no presente estudo, observamos que 47,3% das cadelas possuíam tumores bem diferenciados, enquanto dados prévios mostram que somente 10,3% das

mulheres analisadas apresentavam tumores de grau histológico I (Folgueira et al., 2005). O grau histológico do tumor é determinado por fatores morfológicos que incluem a presença de túbulos, formados, o pleomorfismo nuclear e o índice mitótico. A frequência de células em divisão, em princípio, favoreceria a ação da droga e o tratamento seria menos eficaz em tumores que apresentam índice mitótico menor. Corroborando esta hipótese, Amadori e colaboradores (1997) relatam maior taxa de resposta clínica objetiva em pacientes com câncer metastático da mama, associado à maior atividade proliferativa. Além disso, Wang e colaboradores (2002) relatam maior sensibilidade ao tratamento neoadjuvante com doxorrubicina em pacientes que exibiam tumores com alto grau nuclear, característica de tumores com pouca diferenciação, em relação aos tumores melhor diferenciados. Da mesma forma, Petit e colaboradores (2004) associaram a resposta ao tratamento neoadjuvante baseado em antraciclinas ao grau histológico, sendo que, resposta completa ao tratamento, foi observada em 42% das pacientes com câncer de mama grau III e em 0% de pacientes com tumor grau I.

A quimioterapia primária ou neoadjuvante pode beneficiar as pacientes com câncer de mama de diversas formas, como tratamento precoce de doença subclínica, redução da massa tumoral, aumento da possibilidade de tratamento cirúrgico em pacientes com lesões grandes, previamente consideradas inoperáveis, além da possibilidade de avaliação da resposta ao tratamento quimioterápico *in vivo*. Como exposto, a maioria das pacientes se beneficia da quimioterapia neoadjuvante, entretanto, algumas delas não respondem e a identificação destas pacientes permitiria a

indicação de outra forma de tratamento. Vários estudos tentaram identificar um painel de genes, cuja expressão auxiliasse na indicação do tratamento (Sotiriou et al., 2002; Bertucci et al., 2004; Hannemann et al., 2005).

Da mesma forma, nosso grupo realizou um estudo prévio onde se determinou o perfil gênico de amostras de carcinoma de mama consideradas sensíveis ou resistentes após 4 ciclos de quimioterapia primária com doxorrubicina e ciclofosfamida. A distribuição tridimensional das amostras tumorais, de acordo com a expressão de dois grupos de três genes, PRSS11, MTSS1 e CLPTM1; e PRSS11, SMYD2 e MTSS1 permitiram a classificação dos tumores entre responsivos e não responsivos. Outros genes diferencialmente expressos entre as amostras de tumores resistentes e sensíveis foram RPL37A e NOTCH1 (Folgueira et al., 2005).

Avaliamos então se a expressão de PRSS11, MTSS1, CLPTM1, SMYD2, NOTCH1 e RPL37A poderia classificar as amostras de carcinoma de cadela, tratadas com doxorrubicina *in vitro*, em resistentes e sensíveis, entretanto este fato não foi possível. O gene PRSS11 é uma serina protease que interfere na via de IGF e, conseqüentemente em processos de proliferação e diferenciação. A menor expressão de PRSS11 foi observada em linhagem de melanoma metastático em relação à linhagem originária de tumor primário, indicando que esta expressão diferencial esteja associada à progressão do melanoma (Baldi et al., 2003). Por outro lado, a transfecção e conseqüente hiper expressão de PRSS11 na linhagem metastática inibe os processos proliferativos e de invasão *in vitro* e o crescimento tumoral *in vivo* em camundongos imunodeprimidos (Baldi et al., 2002). Este dado poderia

indicar que a maior expressão de PRSS11 em tumores de melhor resposta à quimioterapia neoadjuvante pudesse estar relacionado à inibição de proliferação consequente ao tratamento, entretanto, tal fato não se comprovou no modelo atual. Em nosso trabalho, não encontramos expressão diferenciada de PRSS11 em relação ao grau de diferenciação do tumor e sensibilidade à doxorrubicina.

MTSS1 foi outro gene inicialmente identificado como classificador do tipo de resposta à doxorrubicina e menos expresso em tumores humanos resistentes à quimioterapia com doxorrubicina, no entanto, este dado não foi confirmado no presente estudo. MTSS1 foi identificado em algumas linhagens de células cancerosas, mas sua expressão não foi detectada em células metastáticas da bexiga, mama e próstata e então foi denominado supressor de metástases (Lorberg, et al., 2005). Em desacordo com as indicações da literatura, Bompard e colaboradores (2005) identificaram que a expressão de MTSS1 em linhagens celulares de câncer, metastáticas e não metastáticas não estava alterada em função do comportamento metastático das linhagens estudadas, levantando controvérsias quanto a provável ação supressora de metástases de MTSS1.

Lorberg e colaboradores (2005) relatam que a hiperexpressão de MTSS por meio de transfecção estável em células de próstata resultou em diminuição do número de filamentos de actina, porém isto não demonstrou qualquer efeito sobre a capacidade de adesão da célula à matriz extracelular ou à sua motilidade. Em contrapartida, o aumento na expressão de MTSS1 reduziu a taxa de proliferação destas células. Este resultado sugere que a

observação de menor expressão de MTSS1 em tumores, de mulheres, resistentes à quimioterapia pudesse contribuir para o crescimento tumoral, entretanto, o mesmo parece não ocorrer em amostras de câncer de cadelas tratadas com doxorubicina *in vitro*.

O gene CLPTM1 foi outro identificado em trio de genes classificadores de tumores sensíveis e resistentes ao tratamento com doxorubicina em estudo de sensibilidade à neoadjuvância com doxorubicina. A relação entre CLPTM1 e câncer é pouco clara. Rossi e colaboradores (2005) descreveram que mutação homozigótica de CLPTM1 leva à inativação do gene em linhagem de câncer de próstata. CLPTM1 é homólogo ao gene relacionado à resistência à cisplatina, CRR9, hiper-expresso em linhagem de tumor de ovário resistente à cisplatina (Yamamoto et al. 2001), sugerindo que este gene possa estar relacionada à resistência de vários agentes quimioterápicos.

Em nosso estudo *in vitro*, não encontramos nenhuma relação entre a expressão de SMYD2 e o tipo de resposta ao tratamento com doxorubicina e, as informações na literatura são escassas sobre a expressão deste gene. O gene SMYD2 é expresso de forma abundante em musculatura cardíaca e esquelética, especialmente em embriões. Deleção ou expressão muito baixa deste gene impede o processo de diferenciação destas células e parece estar relacionada ao controle da atividade de metilação ou acetilação e desacetilação das histonas (Tan et al., 2006).

Em linhagem embrionária de fibroblastos de camundongos (NIH 3T3) a transfecção de SMYD3-Myc ou SMYD2-Myc levam a uma marcante proliferação ou diminuição de proliferação, respectivamente (Hanamoto et

al., 2004). Logo, SMYD2 parece estar envolvido no controle de diferenciação e proliferação celular, processos usualmente desregulados no câncer.

O gene RPL37A codifica uma proteína ribossomal classificada como 37A; expressa especialmente em linfócitos. Apesar de diferencialmente expresso em tumores de pacientes consideradas sensíveis ou resistentes ao tratamento, outros estudos sugerem que a expressão de RPL37A varie pouco em carcinoma de mama de mulheres (Saha et al. 1993).

Embora expressão de NOTCH1 não tenha sido relacionada à ocorrência de resistência ou sensibilidade ao tratamento no presente modelo, foi gene mais expresso em tumores de cadela de pouca diferenciação. Este fato pode ser explicado por evidências da ativação na via de NOTCH sobre o epitélio mamário (Callahan e Egan, 2004; Kiaris et al., 2004; Klinakis et al., 2006).

O gene NOTCH codifica as proteínas da família Notch, as quais correspondem a quatro receptores da membrana plasmática. Em células de mamíferos cada um dos receptores é sintetizado como um precursor, e estão presentes na membrana da célula na forma de heterodímeros (Klinakis et al., 2006). A modulação da via de sinalização de NOTCH é afeta processos de proliferação, diferenciação e apoptose em muitos tipos celulares diferentes (Kiaris et al., 2004) e, esta via pode ser modulada ou antagonizada por um outro receptor de membrana plasmática, Numb.

Em células HC11, uma linhagem epitelial mamária de ratos, a expressão de NOTCH1 impediu o processo de diferenciação celular e conferiu propriedades de crescimento invasivo (Robbins et al., 1992). Em

camundongos, a via de sinalização de NOTCH promove o desenvolvimento de adenocarcinomas de pouca diferenciação (Jhappan et al., 1992; Gallahan et al., 1996) e a interrupção de Notch4, bem como de Notch1, pelo MMTV, um tipo de vírus, produz uma mutação com ganho de função que exerce influência sobre o crescimento e diferenciação da glândula mamária normal levando à transformação neoplásica do órgão (Politi et al., 2004). Além disso, análise imunohistoquímica indica que Notch1 apresenta-se diferencialmente expresso em tumores de pouca diferenciação em relação ao tecido mamário normal e altos níveis estão relacionados com evolução desfavorável (Parr et al., 2004).

A via de sinalização de Notch também atua no controle da diferenciação de adipócitos (Garces et al., 1997) e no desenvolvimento e remodelação do sistema vascular (Gridley, 2001), dois componentes importantes durante o desenvolvimento da glândula mamária. Talvez, Notch seja igualmente importante no contexto de regulação tanto de elementos epiteliais como estromais da mama. Sendo assim parece interessante estudar a expressão deste gene em tecido tumoral onde a manutenção dos componentes epiteliais e estromais estão mantidas, como no experimento descrito neste estudo.

A discordância entre os resultados de expressão gênica de PRSS1, MTSS1, CLPTM1, SYM2, NOTCH1 e RPL37A e a resposta à quimioterapia, poderia ser decorrente das metodologias adotadas. A técnica de cDNA *microarray* utilizada para estudar o perfil gênico de amostras de câncer de mama de mulheres tratadas com doxorubicina, permite a análise da

expressão de um painel extenso de genes e os valores de expressão podem ser influenciados pela subtração de marcação de fundo e métodos de normalização dos dados, entre outros (Petersen et al., 2005). No presente trabalho, utilizamos metodologia de RT-PCR em tempo real que nos fornece a expressão relativa do gene alvo. Neste caso utilizamos um gene normalizador, que o foi GAPDH, e amostra referência, que foi tecido mamário normal obtido de três cadelas.

Correlação entre as técnicas de cDNA *microarray* e qRT-PCR em tempo real utilizando-se os mesmos espécimes em ambos os ensaios, foi detectada em 40-60% de amostras de câncer de mama (Chang et al., 2003; Folgueira et al., 2005) e em 67% de amostras de leucemias e tumor cerebral (Dallas 2005). Entretanto, Rajeevan e colaboradores relatam discrepâncias entre os métodos em relação, como por exemplo, a expressão da vimentina, que apresentou variação diferencial de 23 vezes e de duas vezes nos ensaios de PCR real time e cDNA *microarray*, respectivamente. Por outro lado, validação biológica da expressão diferencial identificada por ensaios de cDNA *microarray* utilizando outro grupo de amostras e qRT-PCR em tempo real foi relatada em 40% das amostras de câncer colorretais (Chiu et al., 2005), em 67% das amostras de câncer de mama (Folgueira et al., 2006) e em 53% das amostras de células BHK-21 infectadas por vírus de dengue, sendo esta última, entretanto, uma variação contrária (cDNA *microarray* vs qRT-PCR) (Liew et al., 2006).

Logo, mesmo pequenas variações de expressão gênica ao se utilizar duas técnicas diferentes como PCR em tempo real e ensaio de cDNA

microarray podem não ter permitido a correta separação de amostras responsivas e não responsivas à doxorrubicina, segundo a expressão de trios de genes alvo.

Outro fator que poderia ter contribuído para a ausência de relação da expressão dos genes alvo com resposta à doxorrubicina seriam diferenças inerentes às espécies humana e canina.

Quanto às características do tumor, de modo similar ao relatado em carcinoma de mulheres, cerca de 40 a 60% de todos os cânceres de mama da cadela expressa receptores de estrógeno ou, em menor proporção, de progesterona (Rutteman et al., 2001). Além disso, a expressão imunohistoquímica de ErbB2 é observada em 17,6 a 35% dos tumores malignos mamários de cadelas (Rungspipat et al., 1999; Dutra et al., 2004). Por outro lado, Las-Mulas e colaboradores (2003) identificaram a expressão aumentada desta oncoproteína em 17,6% de um grupo de tumores malignos de cadelas (17 amostras), porém, em três amostras, consideradas com alta expressão protéica de ErbB2, não foi observado amplificação do gene. Ao contrário, em câncer de mama de mulheres a amplificação do gene detectada por ensaio de FISH (hibridização *in situ*), foi relatada em 49% de 45 amostras consideradas com alta expressão imunohistoquímica de Her2 com intensidade de marcação 3+ (Hammock et al., 2003). Apesar do pequeno número de amostras de tumores mamários de cadela analisados, é possível que outros mecanismos, que não a amplificação do gene, estejam envolvidos na hiper expressão de Her2, sugerindo que similaridades e diferenças entre estes tumores possam existir entre as diferentes espécies.

Pode-se também aventar que existam diferenças entre as amostras avaliadas quanto à presença de comprometimento linfonodal e presença de metástases à distância, que poderiam ser responsáveis pela não observância de relação entre a expressão dos genes analisados e resposta à doxorrubicina em carcinoma de mama de cadelas. A maioria das mulheres (75%), cujos tumores foram avaliados inicialmente no estudo de resposta ao tratamento neoadjuvante, apresentava comprometimento linfonodal ao exame histopatológico, mesmo após a quimioterapia e, nenhuma delas apresentava metástase pulmonar (Folgueira et al., 2005). Ao contrário, entre as pacientes caninas, somente duas (5%) apresentavam comprometimento linfonodal, enquanto outras cinco (13%) apresentavam metástase pulmonar. Existem algumas hipóteses para explicar o desenvolvimento de metástase. A hipótese da de semente e solo, propõe que células metastáticas se originem em um estágio tardio, ao longo da progressão tumoral, resultantes de mutações sucessivas, as quais permitem que estas células adquiram características mais agressivas (Fidler, 2003). Por outro lado, estudos recentes de análise da expressão gênica sugerem que o tumor inicial já guarda características que lhe conferem potencial metastático desde seu estágio inicial (Sorlie et al., 2001; van't Veer et al., 2000; van de Vijver et al., 2002). Deste modo, Woelfle e colaboradores (2003) encontraram um perfil molecular de tumor primário associado com a presença de micrometástases medulares. Enquanto, Lee e colaboradores (2003) relatam um perfil gênico relacionado à ocorrência de metástase linfonodal. Estes últimos autores observaram que, em células MDA-MB-435, uma sub linhagem de câncer de

mama humano, com tendência a gerar metástase linfonodal quando injetada em camundongo apresenta expressão gênica diferente da linhagem parental. Ainda, em um modelo de xenoenxerto, Minn e colaboradores (2005) identificaram um perfil gênico que medeia a metástase pulmonar em câncer de mama. Portanto, características gênicas iniciais parecem conferir propriedades metastáticas específicas ao tumor primário. Logo, é possível que as diferentes características do tumor primário, além de guardar relação com a propriedade de gerar metástases, correlacione-se com a capacidade de resposta a um tipo de tratamento, isto é, o perfil de expressão gênica de tumores com comprometimento linfonodal e sem comprometimento linfonodal não sejam superponíveis em relação à sensibilidade à doxorrubicina.

Em função do exposto, a expressão das várias combinações de trios de genes, incluindo PRSS11, MTSS1, CLPTM1, SMYD2, NOTCH1 e RPL37A, não permitiu a separação espacial das amostras de câncer de mama de cadela, de acordo com a resposta ao tratamento com doxorrubicina.

6. Conclusões

O tratamento com doxorrubicina, *in vitro*, em fatias de carcinoma mamário de cadelas ocasionou redução média de 13,6% do número total de células nas amostras tratadas em relação às amostras controle e nove amostras foram consideradas responsivas e 29 não responsivas.

As expressões dos trios de genes PRSS11, MTSS1, CLPTM1 e PRSS11, MTSS1, SMYD2 nas amostras controle de carcinoma mamário de cadelas não classificou os tumores em responsivos e não responsivos.

A expressão tumoral dos genes NOTCH1 e RPL37A não variou conforme a resposta ao tratamento com doxorrubicina.

7. Anexos

- Anexo 1 -

HOSPITAL VETERINÁRIO DA METODISTA

Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____
proprietário(a) do animal _____,
inscrito no registro interno do Hospital Veterinário da
Universidade Metodista de São Paulo (RI nº _____),
declaro ter sido esclarecido sobre a utilização de
fragmentos de tumor, provenientes de meu animal, em
experimento a ser realizado nas dependências do
Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo, para estudo
comparativo da variedade de expressão gênica em
tumores de mama espontâneos em cadelas.

São Bernardo do Campo, ____ de _____ de 2005

Assinatura do proprietário

- Anexo 2 -

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

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 14.07.04, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **534/04**, intitulado: "Marcadores moleculares de sensibilidade à doxorrubicina em carcinoma de mama canino, identificados em tratamento in vitro" apresentado pelo Departamento de **RADIOLOGIA**.

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

Pesquisador(a) Executante: **Dra. Renata Afonso Sobral**

CAPPesq, 14 de Julho de 2004.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: 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")

- Anexo 3 -

Universidade Metodista de São Paulo

Ficha de Consulta de Cadelas Portadoras de Tumor de Mama

Data da consulta _____

Nome		Idade	Raça	RI	
Proprietário(a)		Cidade	Telefone		
Tempo de aparecimento dos nódulos:					
Já teve outros tumores de mama?		Recidiva ? () sim () não			
() sim () não		Há quanto tempo foi feita a mastectomia ? _____			
Histórico reprodutivo					
Atividade reprodutiva	() não castrada	() castrada	Motivo da castração:		
		Qual idade a paciente tinha na época da castração?: _____	() conveniência () piometra () outros _____		
Uso de anticoncepcional:	() nunca		() sim, número de aplicações _____		
Coberturas e gestações:	() nunca "cruzou"	() "cruzou" mas não gestou	() sim número de gestações _____		
Pseudociese:	() nunca apresentou	() sim nº episódios _____	fez uso de medicamento? () 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		
Informações gerais					
Tipo de alimentação	() ração qual:	() comida caseira principais ingredientes:	() ração + comida caseira principais ingredientes:		
Apresenta alguma doença crônica?	() não () sim, qual?				
Faz uso crônico de medicamento(s)?	() não () sim, qual(ais)?				
Estado geral atual	() excelente/bom () razoável () ruim				
Apresenta emagrecimento recente?	() não () sim, quanto de peso perdeu no último mês?				
Exame Físico					
Mucosas aparentes	() normocoradas	() pálidas	() congestas	() ictericas	
Hidratação	() normal () desidratado _____%	Temperatura retal	° C	Peso	
Auscultação	FC _____bpm FR _____mrp	Estertores: () não () sim tipo →			
Alterações à ausculta cardíaca:	() arritmia () sopro () hipofonese () hiperfonese				
Palpação abdominal:	() ndn () alteração, qual →				
Avaliação das mamas → informar a localização e o tamanho do(s) nódulo(s)					
* = ulcerado VN = vários nódulos (+ de 3 nódulos em uma mesma mama)					
Cadeia direita	M1	M2	M3	M4	
Linfonodos direitos	axilar () ndn () aumentado	Inguinal () ndn () aumentado			
Cadeia esquerda	M1	M2	M3	M4	
Linfonodos esquerdos	Axilar () ndn () aumentado	Inguinal () ndn () aumentado			
Pesquisa de metástases pulmonares () não evidência radiográfica () sim () dúvida					
Exames complementares solicitados					
() Hemograma	() Uréia	() Creatinina	() ALT	() FA () Cálcio sérico	
() ECG	() Ecocardiograma	() Glicose	() outros _____		

Atendente:

Cirurgia marcada para dia _____ às _____ horas

Tipo de procedimento cirúrgico a ser realizado

- () mastectomia parcial
- () mastectomia unilateral total
- () mastectomia bilateral
- () OSH

8. Referências

Aas T, Geisler S, Eide GE, Haugen DF, Varhaug JE, Basso AM, Thorsen T, Berntsen H, Borresen-Dale AL, Akslen AL, Lonning PE. Predictive value of tumor cell proliferation in locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *European J Can.* 2003;39:438-46.

Ahern TE, Bird CR, Curch Bird AE, Wolfe LG. Expression of the oncogene c-erbB-2 in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. *Am J Vet Res.* 1996;57(5):693-96.

Al-Shahrour F, Díaz-Uriarte R, Dopazo J. FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms to groups of genes. *Bioinformatics.* 2004;20:578-80.

Amadori D, Volpi A, Maltoni R, Nanni O, Amaducci L, Amadori A, Giunchi DC, Vio A, Saragoni A, Silvestrini R. Cell proliferation as a predictor of response to chemotherapy in metastatic breast cancer: a retrospective study. *Breast Cancer Research and Treatment.* 1997;43:7-14.

Baldi A, De Luca A, Morini M, et al. The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells. *Oncogene.* 2002;(21):6684-88.

Baldi A, Batista T, De Luca A, Santini D, Rossiello L, Baldi F, Natali PG, Lombardi D, Picardo M, Felsani A, Paggi MG. Identification of genes down-regulated during melanoma progression: a CDNA array study. *Experimental Dermatology.* 2003;12:213-18.

Barbosa EM, Nonogaki, S.; Katayama, MLH; Folgueira, MAAK; Alves, VFA; Brentani, MM. Vitamin D3 modulation of plasminogen activator inhibitor type-1 in human breast carcinomas under organ culture. 2004, 444:175–182.

Bertucci F, Finetti P, Rougemont J, Charafe-Jauffret E, Nasser V, Lloriod B, Camerlo J, Targett R, Tarpin C, Houvenaeghel G, Nguyen C, Maraninchi D, Jacquemier J, Houlgatte R, Birnbaum D, Vies P. Gene expression profiling for molecular characterization of inflammatory breast cancer and prediction of response to chemotherapy. *Cancer Res.* 2004;64:8558-65.

Bompard G, Sharp SJ, Freiss G, Machesky L. Involvement of Rac in actin cytoskeleton rearrangements induced by MIM-B. *Journal Of the Cell Science.* 2005;118(22):5393-5403.

Bonassa EMA. In: Bonassa EMA. *Enfermagem em Terapêutica Oncológica*. 2ª ed, São Paulo, Atheneu. 2000, p.538.

Bottini A, Berruti A, Bersiga A, Brunelli A, Brizzi MP, Dimarco B, Cirillo F, Bolsi G, Bertoli P, Alquati P, Dogliotti L. Effect of neoadjuvant chemotherapy on ki-67 labelling index, *c-erbB-2* expression and steroid hormone receptor status in human breast tumors. *Anticancer Res*. 1996;16:3105-10.

Callahan R, Egan S. Notch signaling in mammary development and oncogenesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2004; v.9, n.2, 145-163.

Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Gutierrez MC, Elledge R, Mohsin S, Osborne CK, Chamness GC, Allred DC, O'Connell P. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet* 2003; 362:362–69

Ciftci K, Su J, Trovitch P. Growth factors and chemotherapeutic modulation of breast cancer cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2003;55:1135-41.

Chiu ST, Hsieh FJ, Chen SW, Chen CL, Shu HF, Li H. Clinicopathologic correlation of up-regulated genes identified using cDNA microarray and real-time reverse transcription-PCR in human colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(2): 437–43.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162(1):156-9.

Dievart A, Beaulieu N, Jolicoeur P. Involvement of Notch1 in the development of mouse mammary tumors. *Oncogene*. 1999;18(44):5973-81.

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

Daidone MG, Silvestrini R, Luisi A, Mastore M, Benini E, Veneroni S, Brambilla C, Ferrari L, Greco M, Andreola S. Changes in biological markers after primary chemotherapy for breast cancers. *Int J Cancer*. 1995;61(3):301-51.

Dallas PB, Gottardo NG, Firth MJ, Beesley AH, Hoffmann K, Terry PA, Freitas JR, Boag JM, Cummings AJ, Kees UR. Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR – how well do they correlate? *BMC Genomics* 2005, 6:59

- Dobson JM, Samuel S, Milstein H, Roger K, Wood JL. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Anim Pract.* 2002;43(6):240-46.
- Duda RO, Hart PE, DG Stork. *Pattern Classification and Scene Analysis.* John Wiley & Sons, New York, 2 ed. 2001.
- 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, Öhagen 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;69:109-27.
- Elson CW; Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991;19:403-10.
- Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the "seed and soil" hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer,* 2003;3:453-8.
- Fisher B, Bryant J, Wolmark N, Mamounas E, Brown A, Fisher ER, Wickerham DL, Begovic M, DeCillis A, Robidoux A, Margolese RG, Cruz AB Jr, Hoehn JL, Lees AW, Dimitrov NV, Bear HD. Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol.* 1998;16:2672-85.
- Folgueira MAAK, Carraro DM, Brentani H, Patrão DFC, Barbosa EM; Netto MM, Caldeira JRF, Katayama MLH, Soares FA, Oliveira CT, Reis LFL, Kaiano JHL, Camargo LP, Vêncio RZN, Snitcovsky IML, Makdissi FBA, Silva E Silva PJ, Góes JCGS, Brentani MM. Gene expression profile associated with response to doxorubicin-based therapy in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11(20):7434-43.
- Folgueira MAAK, Brentani H, Katayama MLH, Patrão DFC, Carraro DM, Mourão Netto M, Barbosa EM, Caldeira JRF, Abreu APS, Lyra EC, Kaiano JHL, Mota LD, Campos AHJFM, Maciel MS, Dellamano M, Caballero OLSD, Brentani MM. Gene expression profiling of clinical stages II and III breast cancer. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39:1101-13.
- Gallahan D, Jhappan C, Robinson G, Hennighausen L, Sharp R, Kordon E, et al. Expression of a truncated Int-3 gene in developing secretory mammary epithelium specifically retards lobular differentiation resulting in tumorigenesis. *Cancer Res.* 1996;56(8):1775-854.

Garces C, Ruiz-Hidalgo MJ, de Mora JF, Park C, Miele L, Goldstein J, et al. Notch-1 controls the expression of fatty acid-activated transcription factors and is required for adipogenesis. *J Biol Chem*. 1997;272(47):29729-34.

Gridley T. Notch signaling during vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(10):5377-8.

Griffey SM, Madewel BR, Dairkee SH, Hunt JE, Naydan, DK, Higgins RJ. Immunohistochemical reactivity of basal and luminal epithelium-specific cytokeratin antibodies within normal and neoplastic canine mammary glands. *Veterinary Pathology*. 1993;v.30, p.155-61.

Griffith CK, Miller C, Saison RCA, Calvert JW, Jeon NL, Hughes CW, George SC. Diffusion limits of an in vitro thick prevascularized tissue. *Tissue Engineering*. 2005; v.11, n.1/2.

Hahn KA, Richardson RC. In: *Cancer Chemotherapy – A Veterinary Handbook*. Williams & Wilkins. 1995; p.254.

Hammock L, Lewis M, Phillips C, Cohen C. Strong HER-2/neu protein overexpression by immunohistochemistry often does not predict oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Hum Pathol*. 2003;34:1043-47.

Hanamoto R, Furukawa Y, Morita M, Imura Y, Silva FP, Li M, Yagyu R, Nakamura Y. SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat Cell Biol*. 2004;6:731-40.

Hannemann J, Oosterkamp HM, Bosch CAJ, Velds A, Wessels LFA, Loo C, Rutgers EJ, Rodenhuis S, Van De Vijver MJ. Changes in gene expression associated with response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Journal of Clin Oncology*. 2005;23(15):3331-42.

Ho PO, Hawkins CJ. Mammalian initiator apoptotic caspases. *FESBE Journal*. 2005;272:5436-53.

Järvinen TAH, Tanner M, Rantanen V, Bärlund M, Borg A, Grénman S, Isola J. Amplification and deletion of topoisomerase II associate with ErbB-2 amplification and effect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer. *Am J Pathol*. 2000;156(3):839-47.

Jhappan C, Gallahan D, Stahle C, Chu E, Smith GH, Merlino GT, et al. Expression of an activated Notch-related int-3 transgene interferes with cell differentiation and induces neoplastic transformation in mammary and salivary glands. *Genes Dev*. 1992;6(3):345-55.

- Kandioler-Eckersberger D, Ludwig C, Rudas M, Kappel S, Janschek E, Wenzel C, Schlagbauer-Wadl H, Mittlböck M, Gnant M, Steger G, Jakesz R. TP53 Mutation and p53 Overexpression for Prediction of Response to Neoadjuvant Treatment in Breast Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* 2000;5:50-56.
- Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC, Dessiris A. Adjuvant pos-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *J Vet Med.* 2001;48A:85-96.
- Kiaris H, Politi K, Grimm LM, Szabolcs M, Fisher P, Efstratiadis A, Artavanis-Tsakonas S. Modulation of Notch signaling elicits signature tumors and inhibits Hras1-induced oncogenesis in the mouse mammary epithelium. *Am J Pathol.* 2004;165: 695-705.
- Klinakis A, Szabolcs M, Politi K, Kiaris H, Artavabis-Tsakonas, Efstratiadis A. Myc is a Notchi1 transcriptional target and requisite for Notch1-induced mammary tumorigenesis in mice. *PNAS.* 2006; v.103, n. 24, 9262-67.
- Kolb E. *Fisiologia veterinária*. 4.ed. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan, 1987, p.413-4. Fisiologia da glândula mamária.
- Kudoh K, Ramanna M, Ravatn R, Elkahlon AG, Bittner ML, Meltzer PS, Trent JT, Dalton WS, Chin KV. Monitoring the expression profiles of doxorubicin-induced resistant cancer cells by cDNA microarray. *Cancer Res.* 2000;60:4161-66.
- Kuperwasser C, Chavarria T, Wu M, Magrane G, Carey L, Richardson A, Weiberg RA. Reconsctruction of functionally normal and malignant breast tissue in mice. *PNAS.* 2004; v.101(14):4966-71.
- Lankelma J, Luque RF, Dekker H, Schinkel W, Pinedo HM. *A Mathematical Model of Drug Transport in Human Breast Cancer Microvascular Research.* 2000;59:149-61.
- Las Mulas JM, Ordás J, Millán Y, Fernández-Soria V, Ramón y Cajal S. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas. An immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2003;80:363–7.
- Lee YG, Macoska JA, Korenchuk S, Pienta KJ. MIM, a potential metastasis suppressor gene in bladder cancer. *Neoplasia.* 2002;4:291-4.
- Lee H, Linn ECK, Liu L, Smith JW. Gene expression profiling of tumor xenografts: *in vivo* analysis of organ-specific metastasis. *Int J Cancer.* 2003;107:528-34.

- Liew KJL, Chow VTK. Microarray and real-time RT-PCR analyses of a novel set of differentially expressed human genes in ECV304 endothelial-like cells infected with dengue virus type 2. *Journal of Virological Methods*. 2006;131: 47–57.
- Lin JH, Masayo Y. Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(1):59-98.
- Lynch BJ, Guinee DG, Holden JA. Human DNA topoisomerasell-alpha: a new marker of cell proliferation in invasive breast cancer. *Human Pathology*. 1997;28(10):1180-88.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *In: Biologia Celular e Molecular*. Revinter. 2002, p.1084.
- Lorberg RD, Neeley CK, Adam-Day LL, et al. Differential expression analysis of MIM (MTSS1) splice variants and functional role MIM in prostate cancer cell biology. *Int J Oncol*. 2005;26:1699-1705.
- Maria PP, Sobral RA, Daleck CR. Casuística de cães portadores de neoplasias, atendidos no Hospital Veterinário da Unesp/Jaboticabal durante o período de 01/01/95 a 01/05/97. In: *Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária*, 3. 1998, Belo Horizonte. Anais. Santa Maria: Colégio Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária. 1998, p.61.
- Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis PA. Neoadjuvant versus adjuvnat systemic tratament in breast cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97:188-94.
- Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, Viale A, Olsen AB, Gerald WL, Massague J. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. 2005; 436:518-24.
- Misdorp W, Else RW, Hélimen E, Lipscomb TP. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat – World Health Organization International Histological Classification of tumors od domestic animals. 2.ed. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1999, p. 18-21.
- Moulton JE. Tumor of the mammary gland. In: Moulton, JE. *Tumors in domestic animals*. 3th ed, University of Californi Press. 1990, p.518-49.
- Nixdorf S, Grimm MO, Loberg R, Marreiros A, Russel PJ, Pienta KJ, Jackson P. Expression and regulation of MIM (Missing in Metastasis), a novel putative metastasis supressor gene, and MIM-B, in bladder cancer cell lines. *Cancer Lett*. 2004;215(2):209-20.

- Page RL, Hughes CS, Hyuan S, Sagris J, Trogdon M. Modulation of P-glycoprotein-mediated doxorubicin resistance in canine cell lines. *Anticancer Research*. 2000;20:3533-38.
- Parr C, Watkins G, Jiang WG. The possible correlation of Notch-1 and Notch-2 with clinical outcome and tumor clinicopathological parameters in human breast cancer. *Int J Mol Med*. 2004;14(5):779-86.
- Parrish AR, Gandolfi AJ, Brendel K. Minireview precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology. *Life Sciences* 1995; 57(21):1887-1901
- Parton M, Krajewski S, Smith I, Krajewska M, Archer C, Naito M, Ahern R, Reed J, Dowsett M. Coordinate expression of apoptosis-associated protein in human breast cancer before and during chemotherapy. *Clin Can Res*. 2002;8:2100-08.
- Peleteiro MC. Tumores mamários na cadela e na gata. *Rev Port C Vet*. 1994;LXXXIX(509):10-29.
- Pereira KS, Zuccari DAPC, Cury PM, Cordeiro JA. *Apoptosis as a prognostic marker in canine mammary tumors by TUNEL Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2003;40:359-65.
- Pérez-Alenza MD, Pena L, del Castillo N, Nieto AI. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J Small Anim Pract*. 2000;41:287-91.
- Petersen D, Chandramouli GVR, Geoghegan J, Hilburn J, Paarlberg J, Kim DM, Gangi L, Han J, Puri R, Staudt L, Weinstein J, Barrett JC, Green J, Kawasaki ES. Three microarray platforms: an analysis of their concordance in profiling gene expression. *BMC Genomics*. 2005; 63:1471:2170-84.
- Petit T, Wilt M, Velten M, Millon R, Rodier JF, Borel C, Mors R, Haegelé P, Eber M, Ghnassia JP. Comparative value of tumor grade, hormonal receptors, Ki-67, HER-2 and topoisomerase II alpha status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy. *European J Can*. 2004;40:205-11.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Research*. 2001; 29:2003-7.
- Politi K, Feirt N, Kitajewski J. Notch in mammary gland development and breast cancer. *Semin Cancer Biol*. 2004;14:341-47.
- Pritchard KI, Shepherd LE, O'malley FP; Andrulis II; Tu, D.; Bramwell VH; Levine MN. HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *New England J Med*. 2006;18:354(20):2102-11.

- Rajeevan MS, Ranamukhaarachchi DG, Vernon SD, Unger ER. use of real time quantitative pcr to validate the results of cdna array and differential display pcr technologies. *Methods* 2001;25:443–51
- Reedijk M, Odorcic S, Chang L, Zhang H, Miller N, McCready DR, Lockwood G, Egan SE. High-level Coexpression of JAG1 and NOTCH1 Is Observed in Human Breast Cancer and Is Associated with Poor Overall Survival. *Cancer Res.* 2005;65:8530-37.
- Robbins J, Blondel BJ, Gallahan D, Callahan R. Mouse mammary tumor gene Int-3; a member of the Notch gene family transforms mammary epithelial cells. *J Virol.* 1992;66:2594-99.
- Rossi MR, Hawthorn L, Platt J, Burkhardt T, Cowell JK, Ionov Y. Identification of inactivating mutations in the JAK1, SYNJ2, and CLPTM1 genes in prostate cancer cells using inhibition of nonsense-mediated decay and microarray analysis. *Cancer Genetics and Cytogenetics.* 2005;161:97-103.
- Rutteman GR, Withrow SJ, Macewen EG. Tumors of the mammary gland. In: MacEwen GE, Withrow SJ *Small Animal Clinical Oncology.* 3th ed, W.B. Saunders Company. 2001; p.455-77.
- 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.
- Saha DP, Tirumalai PS, Scala LA, Howells RD. Human ribosomal protein L37a: cloning of the cDNA and analysis of differential gene expression in tissues and cell lines. *Gene*, 1993; 15:285-9.
- Schneider R, Dorn CR, Taylor DO. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J Natl Cancer Inst.* 1969;43:1249-61.
- Simon D, Knebel JW, Baumgartner W, Aufderheide M, Meyer-Linderberg A, Nolte I. In vitro efficacy of chemotherapeutics as determined by 50% inhibitory concentrations in cell cultures of mammary gland tumors obtained from dogs. *AJVR.* 2001; v.62(11):1825-30.
- Sjöström MJ, Blomggvist C, Von Boguslawski K, Bengtsson NO, Mjaaland I, Malmström P, Ostenstadt B, Wist E, Valvere V, Takayama S, Reed JC, Saksela E. The predictive value of bcl-2, bax, bcl-xL, bag-1, fas, and fasL for chemotherapy response in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2002;8:811-16.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001;98:10869-74.

Sotiriou C, Powles TJ, Dowsett M, Jazaeri AA, Feldman AL, Assersohn L, Gadisetti C, Libutti SK, Liu ET. Gene expression profiles derived from fine needle aspiration correlate with response to systemic chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2002;4(3):1-8.

Tan X, Rotllant J, Li H, De Deyne P, Du SJ. SmyD1, a histone methyltransferase, is required for myofibril organization and muscle contraction in zebrafish embryos. *PNAS*, 2006; v103(8): 2713–18.

Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG. New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92(3):205–16.

Trock BJ, Leonessa F, Clarke R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89(13):917-31.

Van der Hage JA, Van de Velde CJH, Julien JP, Tubiana-Hulin M, Vandervelden C. Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European organization for research and treatment of cancer trial 10902. *Journal of Clinical Oncology*. 2001;19(22): 4224-37.

Van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrisch M, Atsma D. Gene expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002; 347:1999-2009.

Van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM. Gene expression predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2000; 415:530-36.

Wang J, Buchholz TA, Middleton LP, Allred DC, Tucker SL, Kuerer HM, Esteva FJ, Hortobagyi GN, Sahin AA. Assessment of Histologic Features and Expression of Biomarkers in Predicting Pathologic Response to Anthracycline-Based Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Breast Carcinoma *CANCER*., 2002;94(12): 3107-114.

Warburton MI, Hughes CM, Ferns SA, Rudland PS. Localization of vimentin in myoepithelial cells of the rat mammary gland. *Histochemical Journal*. 1989;21:679-85.

Weijzen S, Rizzo P, Braid M, Vaishnav R, Jonkheer SM, Zlobin A, Osborne BA, Gottipati S, Aster JC, Hahn WC, Rudolf M, Siziopikou KW, Kast M, Miele L. Activation Of Notch-1 Signaling Maintains The Neoplastic Phenotype In Human Ras-Transformed Cells. *Nat Med*. 2002;8:979-86.

Woelfle U, Sauter G, Riethdorf L, Janicke F van Diest P, Brakenhoff R, Pantel K. Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer. *Cancer Res*. 2003; 63:5679-84.

Yamamoto K, Okamoto A, Isonishi S, Ochiai K, Ohtake Y. A Novel Gene, CRR9, Which Was Up-Regulated in CDDP Resistant Ovarian Tumor Cell Line, Was Associated with Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280, 1148–1154 (2001) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001; 280, 1148–54

Yeu-Tsu NL, Chan KK, Harris PA. Tissue disposition of doxorubicin in experimental animals. *Medical and Pediatric Oncology*. 1982;10:259-67.

Yoshiura K, Machida J, Daack-Hirsch S, Patil SR, Ashworth LK, Hecht JT, Murray JC: Characterization of a novel gene disrupted by a balanced chromosomal translocation t(2;19)(q11.2;q13.3) in a family with cleft lip and palate. *Genomics*. 1998;54:231-40.

Zuccari DAPC, Santana AE, Rocha NS. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. Fine needle aspiration cytologic and histologic correlation in canine mammary tumors *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2001;38(1):38-41.