

LILIANE CUNHA CAMPOS DA MATA

**AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DOS NIVEIS
SÉRICOS E TECIDUAIS DOS BIOMARCADORES
MUC-1, MUC-16 E HER-2 EM CARCINOMAS MAMÁRIOS CANINOS:
ASSOCIAÇÃO COM A SOBREVIDA DOS PACIENTES E COM A
EXPRESSÃO TECIDUAL DE RE, RP, Ki-67 E E-CADERINA**

**Belo Horizonte
Julho de 2015**

LILIANE CUNHA CAMPOS DA MATA

**AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DOS NIVEIS
SÉRICOS E TECIDUAIS DOS BIOMARCADORES
MUC-1, MUC-16 E HER-2 EM CARCINOMAS MAMÁRIOS CANINOS:
ASSOCIAÇÃO COM A SOBREVIDA DOS PACIENTES E COM A
EXPRESSÃO TECIDUAL DE RE, RP, Ki-67 E E-CADERINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Patologia da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal de Minas Gerais como parte
dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Patologia Investigativa
Orientador: Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali
Co-Orientador: Prof. Dr. Enio Ferreira

**Belo Horizonte
Faculdade de Medicina - UFMG
2015**

Mata, Liliâne Cunha Campos da.
M425a Avaliação prognóstica dos níveis séricos e teciduais dos biomarcadores MUC-1, MUC-16 e HER-2 em carcinomas mamários caninos [manuscrito]: associação com a sobrevida dos pacientes e com a expressão tecidual de RE, RP, KI-67e E-Caderina. / Liliâne Cunha Campos da Mata. - - Belo Horizonte: 2015.
92f.: il.
Orientador (a): Geovanni Dantas Cassali.
Área de concentração: Patologia Investigativa.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Câes. 2. Neoplasias da Mama. 3. Mucina-1. 4. Dissertações Acadêmicas. I. Cassali, Geovanni Dantas. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título

NLM: WP 870



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA

LILIANE CUNHA CAMPOS

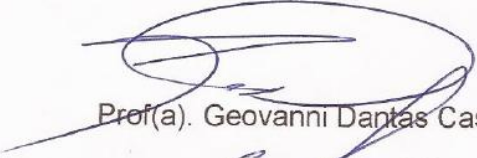
Realizou-se, no dia 08 de julho de 2015, às 13:00 horas, Sala Nelo Moura Rangel (K3-163) no Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *Avaliação prognóstica dos níveis séricos e teciduais dos biomarcadores MUC-1, MUC-16 e HER-2 em carcinomas mamários caninos: associação com a sobrevida das pacientes e com a expressão tecidual de RE, RP, ki67 e E-caderina*, apresentada por LILIANE CUNHA CAMPOS, número de registro 2011660771, graduada no curso de FARMACIA-ANÁLISES CLÍNICAS TOXICOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Geovanni Dantas Cassali - Orientador (UFMG), Prof(a). Enio Ferreira (UFMG), Prof(a). Geórgia Modé Magalhães (UNIFRAN), Prof(a). Marina De Brot Andrade (UFMG), Prof(a). Débora Balabram (UFMG), Prof(a). Andriago Barboza De Nardi (UNESP).

A Comissão considerou a tese:


- Aprovada
 Reprovada

Finalizados os trabalhos, foi lavrada a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 08 de julho de 2015.

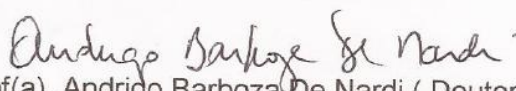

Prof(a). Geovanni Dantas Cassali (Doutor)


Prof(a). Enio Ferreira (Doutor)


Prof(a). Geórgia Modé Magalhães (Doutora)


Prof(a). Marina De Brot Andrade (Doutora)


Prof(a). Débora Balabram (Doutora)


Prof(a). Andriago Barboza De Nardi (Doutor)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

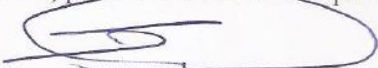
FOLHA DE APROVAÇÃO

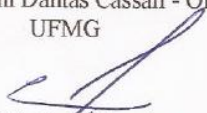
Avaliação prognóstica dos níveis séricos e teciduais dos biomarcadores MUC-1, MUC-16 e HER-2 em carcinomas mamários caninos: associação com a sobrevida das pacientes e com a expressão tecidual de RE, RP, ki67 e E-caderina

LILIANE CUNHA CAMPOS

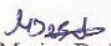
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

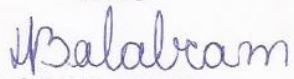
Aprovada em 08 de julho de 2015, pela banca constituída pelos membros:



Prof(a). Geovanni Dantas Cassali - Orientador
UFMG


Prof(a). Emílio Ferreira
UFMG


Prof(a). Geórgia Modé Magalhães
UNIFRAN


Prof(a). Marina De Brot Andrade
UFMG


Prof(a). Débora Balabram
UFMG


Prof(a). Andriago Barboza De Nardi
UNESP

Belo Horizonte, 8 de julho de 2015.



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral-ICB/UFMG, com apoio financeiro do CNPq, FAPEMIG e CAPES.

DEDICATÓRIA

À pessoa que veio para tornar minha vida
ainda mais bela e completa,
minha filha Luiza

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me fortalece a cada dia com Sua presença em minha vida.

Ao meu marido Romeu, companheiro e parceiro incondicional em todos os momentos.

Aos meus pais José Carlos e Solange, meus fiéis escudeiros, que tanto admiro e amo.

Luciano, Marina, Leandro e Yara, pelo carinho e apoio psicológico nesse período de doutoramento, principalmente na reta final...ufa, chegou o grande dia!

Minha sogra Heloisa e cunhadas Rô e Délis pela compreensão e apoio nas horas de sufoco.

Ao professor Geovanni, pela confiança, oportunidade e ensinamentos. Grande mestre, grande pessoa, grande amigo.

Ao Enio, pela disponibilidade incondicional, carinho, compreensão, apoio e conselhos. Enfim doctor você é, antes de um coorientador, um grande amigo!

À minha querida amiga ex IC Juliana. Juju, sua doçura e responsabilidade deixaram esta caminhada mais suave! Obrigada pela amizade e parceria durante todo este período!

Aos amigos dessa jornada de LPC, aos que passaram e aos que permanecem. Os objetivos de vida podem até nos distanciar, mas o respeito e carinho são os laços invisíveis que nos unirão sempre.

A todos os professores, aos amigos da pós e colegas do Instituto de Ciências Biológicas, pessoas admiráveis e que nos engrandecem com seu convívio.

À Gi, Marília e Regina, pessoas muito especiais, sempre disponíveis e com uma palavra de carinho e incentivo. Vocês são 10!

A querida professora Lirlândia e suas alunas Juliana, Kátia, e Aline. Landa muito obrigada pela confiança, disponibilidade e carinho em todos os momentos!

À CAPES, CNPq, FAPEMIG e UFMG, por ter permitido todo o trabalho possível.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho...

Muito Obrigada!

RESUMO

O avanço da biologia molecular propicia um aumento na procura pela identificação de biomarcadores tumorais que auxiliem no diagnóstico precoce, prognóstico e tratamentos mais eficazes para o câncer de mama. Moléculas associadas à presença do câncer têm sido extensivamente investigadas e utilizadas na prática clínica em medicina humana, como por exemplo, a superexpressão sérica de mucinas MUC-1 e MUC-16, e a superexpressão do fator de crescimento epidermal HER-2. Apesar da alta incidência de neoplasias mamárias em cadelas, poucos trabalhos abordam a relação da expressão sérica e tecidual de MUC-1, MUC-16 e HER-2 e seu caráter prognóstico nesse tipo de câncer. Com isso, o presente trabalho tem por objetivo comparar a expressão sérica e tecidual de MUC-1 e HER-2 em carcinomas mamários caninos e investigar sua relação com a presença de metástases em linfonodos regionais. Além disso, avaliar e relacionar a dosagem sérica e a expressão tecidual de MUC-1 e MUC-16 em cadelas com carcinoma mamário metastático, com a sobrevida e com a expressão tumoral de receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), E-caderina, HER-2 e Ki-67. Para o estudo foram selecionadas 38 cadelas diagnosticadas com carcinoma mamário e metástase linfática, submetidas à exérese tumoral seguido de tratamento quimioterápico, 14 cadelas diagnosticadas com carcinoma mamário sem evidências de metástase linfonodal e 20 cadelas hígdas. Os imunoenaios foram realizados para MUC-1, MUC-16 e HER-2 pela técnica de ELISA de acordo com o protocolo estabelecido pelo próprio fabricante. As dosagens séricas foram realizadas no momento cirúrgico e durante o período de tratamento para o grupo metastático. Foi realizada imuno- histoquímica, para MUC-1, MUC-16, RE, RP, E-caderina, HER-2 e Ki-67. Como resultado observou-se uma concentração significativamente maior de MUC-1 sérico nas cadelas com carcinoma mamário com metástases linfáticas, e uma diminuição significativa da expressão sérica de MUC-1 e MUC-16 após o tratamento quimioterápico com aumento no tempo de sobrevida destes animais. A imunoexpressão de RE, RP, E-caderina, HER-2 e Ki-67 não apresentou associação com a expressão sérica e tecidual de MUC-1 e MUC-16. Os achados sugerem que a expressão das mucinas seja independente da expressão dos fatores prognósticos RE, RP, E-caderina, HER-2 e Ki67 e que a dosagem sérica das mucinas possa ser utilizada na avaliação da resposta do tumor frente ao tratamento, sendo a MUC-1 uma ferramenta de auxílio no diagnóstico de carcinoma mamário metastático na espécie canina.

Palavras-chave: cães, neoplasia mamária, MUC-1, MUC-16, HER-2.

ABSTRACT

Advances in molecular biology provide an increasing demand for the identification of tumor biomarkers that aid in early diagnosis, prognosis and more effective mammary cancer treatments. Molecules associated to the presence of cancer have been extensively investigated and used in human medical clinical practice, such as serum superexpression of MUC-1 and MUC-16 mucins, as well as the superexpression of the epidermal growth factor receptor HER-2. Although canine mammary neoplasms present a high incidence, few papers approach the relation among serum and tissue expression of MUC-1, MUC-16, and HER-2 and their prognostic value in this type of cancer. Therefore, the present work aims to compare the serum and tissue expression of MUC-1 and HER-2 in canine mammary carcinomas and investigate their relation with the presence of lymph node metastasis. Furthermore, it aims to evaluate and verify the relationship among serum and tissue expression of MUC-1 and MUC-16 in metastatic to the lymph nodes canine mammary gland carcinoma with overall survival and tumoral expression of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), E-cadherin, HER-2 and Ki-67. The study included 38 bitches diagnosed with mammary gland carcinomas and lymph node metastasis, submitted to tumoral excision followed by chemotherapy treatment, 14 bitches diagnosed with mammary gland carcinomas with no evidence of metastasis, and 20 healthy bitches. The immunoassays were performed for MUC-1, MUC-16, and HER-2 according to the ELISA technique established by the manufacturer. Serum levels were measured at surgical excision and during the treatment period for the metastatic group. Immunohistochemistry for MUC-1, MUC-16, ER, PR, E-cadherin, HER-2, and Ki-67 was performed. Our results demonstrated a significantly higher concentration of serum MUC-1 in bitches with mammary gland carcinomas with lymph node metastasis, and a significant decrease in serum expression of MUC-1 and MUC-16 following chemotherapy, with a increase in patient overall survival period. Immunolabeling of ER, PR, E-cadherin, HER-2, and Ki-67 did not present association with serum and tissue expression of MUC-1 and MUC-16. The findings suggest that the mucin expression is independent of the expression of the prognostic factors ER, PR, E-cadherin, HER-2, and Ki-67. Mucin serum levels may be used in the evaluation of tumor response to treatment and MUC-1 is an ancillary diagnostic tool in metastatic mammary gland carcinomas in the canine species.

Key-words: Canine, mammary neoplasia, MUC-1, MUC-16, HER-2.

LISTA DE FIGURAS

PAG

Artigo 1 -Prognostic significance of tissue and serum HER2 and MUC1 in canine mammary cancer

- Figura 1 Immunohistochemical staining of canine mammary carcinoma sections. A, HER2 protein expression, complete membrane staining (2+), 0×. B, HER2 protein expression, complete membrane staining (2+), 40×. C, MUC1 protein expression, cytoplasmic pattern (3+), 40×. D, MUC1 protein expression, membrane pattern (3+), 40×. E, MUC1 protein expression, nuclear pattern (3+), 40×. F, MUC1 protein expression, mixed pattern (3+), 40×. 50

Artigo 2 - Avaliação sérica e tecidual de MUC-1 e MUC-16 em cadelas com carcinoma mamário metastático e sua relação com a sobrevida e os marcadores tumorais RE, RP, Ki-67, E-caderina e HER-2.

- Figura 1 Gráfico Box plot representando a avaliação sérica das mucinas MUC-1 e MUC-16 no momento da mastectomia e 30 dias pós-tratamento. MUC-1 $p=0,003$; MUC-16 $p=0,0016$. 70
- Figura 2 Fragmento de carcinoma mamário canino. Padrão de imunomarcção para MUC-1 e MUC-16. A, expressão citoplasmática positiva (+) para MUC-1, 40x. B, expressão citoplasmática positiva (++) para MUC-1, 40x. C, expressão citoplasmática positiva (+++) para MUC-1, 40x. D, expressão citoplasmática positiva (+) para MUC-16, 40x. E, expressão citoplasmática positiva (++) para MUC-16, 40x. F, expressão citoplasmática positiva (+++) para MUC-16, 40x. 71
- Figura 3 Curva de Kaplan-Méier para análise de sobrevida de cadelas com câncer de mama e metástase em linfonodo com relação à expressão de MUC-1 e MUC-16: expressão sérica de MUC-1 (A) e MUC-16 (B) no momento da exérese tumoral. Expressão sérica de MUC-1 (C) e MUC-16 (D) no primeiro retorno após tratamento quimioterápico. CN: paciente censurados; MD: pacientes mortos pela doença; TOTAL: total de número de casos; MED: mediana de sobrevida (em dias). 72

- Figura 4 Curva de Kaplan-Meier para análise de sobrevida de cadelas com câncer de mama e metástase em linfonodo com relação à expressão de MUC-1 e MUC-16. Sobrevida segundo avaliação combinada da expressão sérica MUC-1/MUC-16 (A). Sobrevida segundo avaliação combinada da expressão sérica de MUC-1 e sua expressão tecidual nos diferentes padrões: membranar (B), citoplasmático (C) e nuclear (E). Todos os casos positivos para expressão das mucinas evidenciaram uma piora na sobrevida, embora sem significância estatística ($p>0.05$). CN: pacientes censurados; MD: pacientes mortos pela doença; TOTAL: total de número de casos; MED: mediana de sobrevida (em dias). 73
- Figura 5 Curva de Kaplan-Meier para análise de sobrevida de cadelas com câncer de mama e metástase em linfonodo com relação à expressão de MUC-1 e MUC-16. Sobrevida segundo a expressão tecidual de MUC-1 nos diferentes padrões de marcação: membranar (A), citoplasmático (B) e nuclear (C). Sobrevida segundo a expressão tecidual de MUC-16 (D). Todos os casos positivos para expressão das mucinas evidenciaram uma piora na sobrevida, embora sem significância estatística ($p>0.05$). CN: pacientes censurados; MD: pacientes mortos pela doença; TOTAL: total de número de casos; MED: mediana de sobrevida (em dias). 74

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Reagentes para imuno-histoquímica e métodos utilizados	31
Artigo 1 - Prognostic significance of tissue and serum HER2 and MUC1 in canine mammary cancer	
Tabela 1 MUC1 and HER2 serum levels in female dogs from groups I, II, and III (mean \pm standard deviation).	47
Tabela 2 Association of immunohistochemical (IHC) expression and MUC1 serum levels in female dogs with mammary cancer ($n = 28$).	47
Tabela 3 Evaluation of immunohistochemical expression of HER2 and MUC1 in female dogs from group II ($n = 14$) and group III ($n = 14$).	48
Tabela 4 Association of immunohistochemical (IHC) expression and HER2 serum levels in female dogs with mammary cancer ($n = 28$).	48
Tabela 5 Evaluation of immunohistochemical expression of HER2 and MUC1 in canine mammary neoplasms ($n = 28$).	49
Artigo 2 - Avaliação sérica e tecidual de MUC-1 e MUC-16 em cadelas com carcinoma mamário metastático e sua relação com a sobrevida e os marcadores tumorais RE, RP, Ki-67, E-caderina e HER-2.	
Tabela 1 Reagentes para imunohistoquímica e métodos utilizados	65
Tabela 2 Avaliação sérica das mucinas MUC-1 e MUC-16 durante 6 momentos: mastectomia, durante os 4 ciclos de quimioterapia (intervalos de 21 dias) e primeiro retorno pós-tratamento.	65
Tabela 3 Imunoexpressão de MUC-1, MUC-16, RE, RP, E-caderina e HER-2 nos tumores mamários caninos.	66
Tabela 4 Expressão de RP, RE, E-caderina, HER-2 e Ki-67 em tumores mamários caninos de acordo com a positividade ou negatividade para expressão sérica de MUC1 e MUC16.	66

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac- Anticorpo

ASCO - American Society of Clinical Oncology

BRCA-1- Breast cancer 1

CA-125- Antígeno do câncer 125

CA-15.3- Antígeno do câncer 15.3

DAB - Diaminobenzidina

ELISA- Enzyme-linked Immunosorbent Assay

HER2- Receptor para fator de crescimento epidermal 2

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

mL- Mililitro

MUC-1- Mucina 1

MUC-16- Mucina 16

ng- Nanograma

PAAF- Punção aspirativa com agulha fina

RE- Receptor para estrógeno

RP- Receptor para progesterona

SRD: Sem raça definida

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

SUMARIO

	PAG
1.- INTRODUÇÃO.....	15
1.1- Neoplasia mamária na cadela.....	15
1.2-Aspectos semelhantes entre neoplasias mamárias na espécie humana e canina.....	17
1.3- Marcadores Tumorais.....	19
1.3.1- Mucinas	20
1.3.1.1- MUC-1.....	21
1.3.1.2- MUC-16.....	23
1.3.2- HER-2	25
1.3.3 Marcadores celulares nos tumores mamários caninos	26
2 - JUSTIFICATIVA	28
3 - HIPÓTESE.....	28
4 - OBJETIVOS.....	29
4.1. Objetivo geral.....	29
4.2 - Objetivos específicos	29
5 - MATERIAL E MÉTODOS.....	30
5.1- Seleção dos animais	30
5.2- Coleta de amostra sanguínea	30
5.3- Histopatologia	31
5.4- Imuno- histoquímica	31
5.5- ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).....	33
5.6- Tempo de Sobrevida Global.....	33
6- RESULTADOS.....	33
Artigo 1- Prognostic significance of tissue and serum HER-2 and MUC-1 in canine mammary cancer	34
Artigo 2- Avaliação sérica e tecidual de MUC-1 e MUC-16 em cadelas com câncer de mama metastático e sua relação com a sobrevida e os marcadores tumorais RE, RP, Ki-67 e E-caderina	51
7 – CONCLUSÕES GERAIS.....	75
8 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
10 - ANEXOS.....	86
Anexo I- Carta de aprovação do CETEA/UFMG.....	86
Anexo II- Comprovante de submissão.....	87
Anexo III- Produção Científica	88

1. INTRODUÇÃO

1.1- Neoplasia mamária na cadela

Nos últimos anos, tem se verificado um aumento considerável da prevalência do câncer em cães, que é considerado por alguns autores como a causa mais frequente de morte nessa espécie (LAS MULAS & REYMUNDO, 2000; SORENMO et al, 2009). Na espécie canina, as neoplasias mamárias em fêmeas representam 52% de todas as neoplasias, sendo que 50% são diagnosticadas como malignas (DALECK, 1998; CASSALI et al, 2003; OLIVEIRA et al, 2009).

A etiologia do câncer de mama é multifatorial, com participação de fatores genéticos, ambientais e principalmente hormonais (SILVA et al, 2004). O estilo de vida aumenta a exposição da população a fatores ambientais, nutricionais e químicos potencialmente carcinogênicos, e a interação dos animais no mesmo microambiente humano os expõe aos mesmos riscos (SILVA et al, 2004; SORENMO et al, 2009).

Essas lesões têm despertado grande interesse a pesquisadores, devido ao elevado índice de tumores malignos, em grande parte, reflexo do diagnóstico tardio, que compromete o tratamento e reduz a taxa de sobrevivência dos animais (SILVA *et al*, 2004; CAVALCANTI & CASSALI, 2006). Dentre as neoplasias mamárias malignas, os carcinomas são os mais frequentes, correspondendo a aproximadamente 45 a 50% do total (CAVALCANTI, 2006).

O risco de desenvolvimento da neoplasia mamária aumenta progressivamente com a idade (SORENMO et al., 2013). Observa-se maior susceptibilidade entre os seis e os doze anos de idade (PELETEIRO, 1994; CASSALI, 2000). Com relação ao sexo, a neoplasia é rara nos machos, com uma taxa de ocorrência de 0 a 2,7%, sendo geralmente inferior a 1% (BEARS *et al*, 2012),

Não há um consenso na literatura quanto à predisposição racial. Alguns autores afirmam que esta não existe (CASSALI, 2003; SORENMO *et al*, 2009). Outros autores afirmam que raças puras e endogâmicas são mais acometidas (MISDORP, 2002). A determinação do risco em relação à raça varia dependendo da metodologia do estudo e da localização geográfica (EGENVALL *et al*, 2005).

Os principais órgãos acometidos pela disseminação tumoral são: linfonodos regionais (inguinais superficiais e axilares), pulmão, e com menor frequência, rim, fígado, baço, pele, glândulas adrenais, encéfalo, olhos e ossos (PELETEIRO, 1994; PEREZ ALENZA *et al.*, 2000). A principal via de disseminação dos carcinomas primários na cadela é pela via linfática (CASSALI, 2014; HORTA *et al.*, 2014)

Frequentemente são observados múltiplos tumores em uma mesma mama ou envolvendo simultaneamente várias mamas (tumores multicêntricos), os quais podem apresentar diferentes tipos histológico (MISDORP *et al.*, 1999; CASSALI *et al.*, 2014), contudo, sempre o tumor de pior prognóstico determinará a evolução clínica do paciente (CAVALCANTI & CASSALI, 2006).

Os tumores benignos apresentam-se geralmente como nódulos únicos ou múltiplos, bem circunscritos e firmes à apalpação. Das cadelas com tumores mamários diagnosticados como benignos, cerca de 26% desenvolvem mais tarde, tumores em outras glândulas mamárias (FAUSTINO *et al.*, 2002; MISDORP, 2002). Os tumores malignos apresentam na maioria dos casos tamanhos superiores a 5 centímetros, com aderências a planos profundos, podendo apresentar por vezes, ulceração cutânea e metástases (QUEIROGA & LOPES, 2002; FERREIRA *et al.*, 2009).

O diagnóstico definitivo do tumor baseia-se no resultado histopatológico da biópsia, pois fornece informações importantes sobre a natureza, o tipo histológico e a infiltração microscópica das células tumorais, inclusive para cadeia linfática (PELETEIRO, 1994; QUEIROGA & LOPES, 2002; CASSALI, 2003). A radiografia de tórax é um procedimento rotineiro na veterinária como auxílio no estadiamento e a ultrassonografia abdominal é realizada quando há suspeita de possíveis metástases à distância (CAVALCANTI & CASSALI, 2006).

A determinação do estadiamento clínico permite definir a extensão do processo tumoral e com isso estabelecer um prognóstico além de planejar um tratamento (CASSALI *et al.*, 2014). O estadiamento, que é um parâmetro crucial para a definição da abordagem clínica dos tumores malignos, envolve os seguintes parâmetros: tamanho do tumor, acometimento dos linfonodos regionais e presença de metástase à distância (OWEN, 1980; PHILIBERT *et al.*, 2003). Assim pode-se dividir os casos em grupos por grau aparente da extensão da doença através do

sistema TNM (tumor/linfonodo/metástase), proposto pela Organização Mundial de Saúde e aplicado apenas para carcinomas (OWEN, 1980).

A cirurgia é o tratamento indicado para tumores mamários caninos e é o mais eficaz para o controle da doença local (HORTA *et al*, 2014), com exceção do carcinoma inflamatório, para o qual a modalidade mais efetiva é o controle da doença localizada (CASSALI *et al.*, 2014).

A quimioterapia tem sido utilizada em cães com tumores malignos da glândula mamária, como adjuvante ou em casos que apresentam metástases. No entanto, existe limitada informação quanto à eficácia do uso da quimioterapia adjuvante (SORENMO, 2003; CASSALI *et al.*, 2014). Métodos alternativos como radioterapia e hormonioterapia ainda são pouco utilizados na medicina veterinária (NOVOSAD, 2003).

Há um interesse na comunidade científica com relação à biopatologia dos tumores mamários caninos pelo fato destes tumores terem sido propostos como modelo comparativo para o estudo do câncer de mama na mulher (CASSALI, 2000; QUEIROGA & LOPES, 2002; KHANNA, 2006). Do ponto de vista acadêmico o cão serve também como modelo humano para descoberta de novos fármacos e desenvolvimento de pesquisas (KHANNA, 2006), pois, quando comparado a modelos experimentais de pequenos animais de laboratório, esses tumores na espécie canina possuem maior semelhança à espécie humana (CASSALI, 2000).

1.2- Aspectos semelhantes entre neoplasias mamárias na espécie humana e canina

O câncer de mama é a neoplasia mais freqüente nas fêmeas, principalmente em mulheres e cadelas (SILVA *et al*, 2004). Em mulheres é o primeiro tipo mais freqüente no mundo, respondendo por 22% dos casos novos a cada ano. Em cadelas, representam 52% de todas as neoplasias, sendo que 50% são diagnosticadas malignas (DALECK *et al*, 1998; CASSALI *et al*, 2003; OLIVEIRA *et al*, 2009).

Os tumores mamários espontâneos na cadela são de duas a três vezes mais freqüentes do que o observado na mulher (SCHNEIDER, 1970). A glândula mamária canina é susceptível a desenvolver uma gama de doenças epiteliais proliferativas que são morfológicamente semelhantes na mama humana (FERREIRA *et al*, 2012). Assim, devido à grande similaridade dos tumores entre as espécies em relação aos dados epidemiológicos e padrões histológicos de

lesões neoplásicas, os tumores mamários caninos têm sido indicados como modelo comparativo para o estudo do câncer de mama na mulher (QUEIROGA *et al*, 2011).

Um fator que possui grande influência no prognóstico do câncer de mama é a idade da paciente no momento do diagnóstico. Apesar da discrepância entre os tempos de vida, a idade média de início de tumores mamários é aproximadamente a mesma para os seres humanos (depois de 40 anos) e cães (depois de 6 anos) (QUEIROGA *et al*, 2011). Segundo Lebeau (1953) os dois primeiros anos de vida da cadela correspondem à 24 anos na mulher, daí por diante, cada ano na cadela, representam quatro anos da mulher. Na espécie canina a faixa etária oscila entre 9 e 11 anos e na mulher entre 45 e 65 anos de idade. Ao utilizar-se a tabela de Lebeau (1953), verifica-se que o aparecimento dos tumores mamários nessas duas espécies ocorre em idades correspondentes (SCHNEIDER, 1970).

No câncer de mama, em ambas as espécies, o estudo da expressão de proteínas específicas como marcadores de fator prognóstico e preditivo têm se revelado importante ferramenta de trabalho na rotina diagnóstica e de pesquisa (KANDIOLER- ECKERSBERGER, 2000; QUEIROGA *et al*, 2011). Entre essas proteínas podemos citar: receptores hormonais (estrógeno e progesterona); proteína dos genes BRCA-1 e p53 (supressores tumorais); marcadores de proliferação celular (MIB-1/Ki67) e o proto-oncogene c-erbB-2 (CASSALI, 2000).

São considerados aspectos biologicamente semelhantes nos estudos comparativos do câncer de mama humano e canino: aspectos morfológicos tanto nas lesões benignas quanto nas malignas (OWEN, 1980; GILBERTSON *et al*, 1983; MOULTON, 1990; CASSALI, 2000), a origem na unidade ducto-lobular terminal, sendo que a lesão maligna mais frequente na mulher é o carcinoma ductal invasivo, e na cadela existe lesão semelhante histologicamente infiltrativa e com origem no ducto da glândula (STRANDBERG & GOODMAN, 1974; CASSALI, 2000). Vale ressaltar que em ambas as espécies, o tamanho tumoral, a presença de metástases linfonodais e o estágio clínico avançado da doença estão entre os principais fatores prognósticos do câncer de mama, associando-se a evolução clínica desfavorável e pior sobrevida (QUEIROGA *et al*, 2011).

O câncer de mama canino pode ser tão agressivo e letal quanto na mulher. Com o avanço da biologia molecular surgem novas perspectivas visando prevenção, diagnóstico precoce e

tratamentos mais eficazes para o câncer de mama tanto em medicina humana quanto em medicina veterinária (CASSALI *et al* , 2007).

1.3- Marcadores Tumorais

Moléculas associadas à presença do câncer têm sido extensivamente investigadas e utilizadas na prática clínica na medicina humana por mais de 30 anos, e são definidas como marcadores tumorais (GION & DAIDONE, 2004).

Os marcadores tumorais ou biomarcadores são substâncias presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, produzidos primariamente por ele ou, secundariamente pelo paciente, em resposta à presença do tumor. As concentrações dessas substâncias nos fluidos corpóreos devem refletir a extensão do tumor, respostas ao tratamento e a progressão da doença (ALMEIDA *et al*, 2007).

Um marcador tumoral pode ser utilizado, em conjunto com anamnese, exames físicos e diagnósticos de imagem, para auxiliar na identificação de uma doença específica, na detecção de metástases ocultas e recidivas, na estimativa do volume tumoral, na escolha da terapia, no acompanhamento de respostas ao tratamento ou como alvo para intervenções terapêuticas em ensaios clínicos (KOSHIDA *et al*, 1996; LINDBLOM & LILJEGREN, 2000).

A detecção do câncer parte do princípio que certas características expressas no tumor são diferentes das características do tecido normal e essas “diferenças” podem ser detectadas no tumor ou no sangue (LEVENSON, 2007). Neste caso os marcadores são denominados antígeno tumor- específico, pois estão presentes apenas em células neoplásicas (ANDRIOLO, 2008). Exemplo disso ocorre quando um oncogene é translocado, funde-se a um promotor ativo de outro gene, e neste processo maligno o gene mutado leva a produção ativa de uma proteína, com o conseqüente desenvolvimento de um clone maligno (LINDBLOM & LILJEGREN, 2000).

Em outros casos algumas proteínas são fisiologicamente sintetizadas por células diferenciadas, mas células neoplásicas as produzem em quantidades muito maiores, sendo também possível avaliar o tumor pelo aumento da expressão tecidual e/ou concentração sérica da proteína (LINDBLOM & LILJEGREN, 2000). Estes marcadores recebem o nome de

antígeno tumor- associado, pois estão presentes tanto em células neoplásicas quanto em normais, diferenciando-se pela quantidade ou forma molecular com que se apresentam (ANDRIOLO, 2008).

Esta definição leva à grande diversidade dos marcadores existentes, e, para direcionar a utilidade de cada uma dessas substâncias é necessário pensar no marcador ideal (MAGRO & BENTO, 1997). Este deveria ser altamente específico para um determinado tipo de neoplasia e suficientemente sensível para detectar a presença de pequeno número de células neoplásicas, permitindo o diagnóstico precoce, em estudos populacionais (ANDRIOLO, 2008).

No entanto até o momento, não existe um marcador tumoral perfeito, mas proteínas com a maioria destas características estão disponíveis para auxiliar os oncologistas (ALMEIDA *et al*, 2007) no acompanhamento do paciente previamente diagnosticado (ANDRIOLO, 2008).

Os biomarcadores podem ser classificados em dois grandes grupos: marcadores tumorais na superfície da célula e marcadores tumorais no soro (MAGRO & BENTO, 1997). Numerosos marcadores tumorais séricos têm sido descritos para uso no câncer de mama, incluindo as mucinas (ex: MUC-1, MUC-16, BR27.29), proteínas oncofetais (CEA), oncoproteínas (ex: *c-erbB2*, *c-myc* e p53) e citoqueratinas (ex: TPA e TPS). Desses, o CEA, MUC-16 MUC-1 são os mais indicados na prática clínica (CHEUNG *et al*, 2000; MOLINA *et al*, 2005).

Em medicina humana, alterações séricas de marcadores tumorais indicados pela ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) (HARRIS *et al*, 2007) podem auxiliar na avaliação prognóstica e acompanhamento do tratamento em mulheres com câncer de mama. Apesar da alta frequência do carcinoma mamário na espécie canina e das semelhanças identificadas com a espécie humana, o número de pesquisas relacionadas a esses marcadores em medicina veterinária é escasso.

1.3.1- Mucinas

Mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular que revestem a superfície das células epiteliais e são responsáveis por sua proteção e lubrificação (SENAPATI, 2009; PEREZ-VILAR & HILL, 1999). A parte madura da molécula está ancorada dentro da superfície celular, caracterizando-se pelo domínio transmembrana. A maior parte da mucina localiza-se

extracelularmente em um alongamento para além de outras superfícies celulares, caracterizando macromoléculas (SOUZA, 2002).

Os membros da família das mucinas podem diferir consideravelmente de tamanho. Alguns são pequenos, contendo algumas centenas de resíduos de aminoácidos, enquanto que outros contêm vários milhares de resíduos e estão entre as maiores proteínas conhecidas. Independentemente do tamanho, todas as cadeias polipeptídicas mucinas têm domínios ricos em treonina e/ou serina cujos grupos hidroxil estão em ligação glicosídica com oligossacarídeos (PEREZ- VILLAR & HILL, 1999; KUFFE, 2009). Além disso, estes domínios são compostos por sequências repetidas em *tandem*, que variam em número, comprimento e sequência de aminoácidos de uma mucina para a outra (HOLLINGSWORTH & SWANSON, 2004). O teor de carboidratos de uma mucina pode ser responsável por até 90% do seu peso (PEREZ- VILLAR & HILL, 1999).

A família das mucinas (MUC) é composta por membros designados MUC-1 a MUC-21, e foram subclassificados em formas secretadas e transmembranares (SENAPATI *et al*, 2009). As mucinas secretadas (por exemplo: MUC-2, MUC-5e MUC-6) formam uma barreira física, que, como um gel mucoso fornece proteção para as células epiteliais que revestem as vias respiratórias, gastrointestinais e as superfícies ductais de órgãos tais como o fígado, coração, pâncreas e rim. As mucinas transmembranares (por exemplo: MUC-1, MUC-4, MUC-13 e MUC-16) tem uma região que atravessa a membrana e contribui para a proteção da célula, formando estruturas em forma de haste que se estendem ao longo de 100 nm para a superfície da célula e cerca de 10 nm para seu interior (KUFFE, 2009).

Devido sua localização transmembranar, as mucinas se tornam essenciais em muitos processos patológicos, em que há interação célula epitelial- estroma, como em doenças inflamatórias, infecciosas, nos cânceres e suas metástases (DECKER *et al*, 2002). Além disso, as células de neoplasias epiteliais como os de mama, de próstata, de pulmão e pâncreas, normalmente superexpressam mucinas justamente para explorar o seu papel na promoção do crescimento e da sobrevivência celular (KUFFE, 2009).

Sabe-se que a MUC-1 apresenta-se superexpressa em vários tipos de tumores de origem epitelial, sendo a mucina mais estudada em relação ao seu envolvimento com câncer de mama e o aparecimento de metástases (TAYLOR- PAPADIMITRIOU *et al*, 1999; KUFFE, 2009;

HORM, 2013). A MUC-16 é uma mucina que está presente em 80% dos tumores epiteliais de ovário sendo também detectável no soro de pacientes acometidos pela doença (KUFFE, 2009). Também existem estudos que apontam sua superexpressão em outros tipos de adenocarcinomas como câncer de mama e pâncreas (AGHA-HOSSEINI *et al*, 2009; DAS, 2012). A circunstância de as células neoplásicas apresentarem, em geral, um aumento da produção de mucinas leva a pensar que elas tenham um papel fundamental na patogênese de câncer, particularmente nos adenocarcinomas.

1.3.1.1- MUC-1

A MUC-1, produto do gene *MUC-1*, é uma glicoproteína transmembranar de alto peso molecular (300-400 Kd) rica em serina, treonina e prolina carregando uma alta porcentagem de carboidrato *o-ligado* (DUFFY *et al*, 2004). Esta mucina também é conhecida como CA15.3 quando expressa no soro, e está envolvida na regulação de diversas atividades celulares conferindo proteção e lubrificação a células epiteliais (TAYLOR-PAPADIMITRIOU, 1999; SENAPETI *et al*, 2009).

A MUC-1 apresenta-se superexpressa em uma variedade de adenocarcinomas, especialmente aos relacionados ao câncer de mama (SOUZA, 2002). Enquanto a expressão da MUC-1 é limitada à superfície apical da maioria das células do epitélio ductal, na doença metastática a mucina é superexpressa e passa a se localizar por toda a superfície celular. Por isso, tem sido extensivamente estudada e correlacionada com a progressão do câncer, metástases, pior resposta ao tratamento e piora na sobrevida do paciente (HORM & SCHROEDER, 2013).

O papel da MUC-1 na progressão tumoral também é suportado devido frequente observação de sua superexpressão nos tecidos neoplásicos, detectado através da imunohistoquímica, bem como na circulação sanguínea de pacientes com câncer de mama (HORM & SCHROEDER, 2013). A eficácia do uso de anticorpos anti-MUC-1 como diagnóstico para doença metastática é outro parâmetro que fortalece a sua relação com o câncer (CHEUNG *et al*, 2000).

A dosagem sérica de MUC-1 possui importância fundamental no acompanhamento da evolução do câncer de mama na mulher, podendo preceder os sinais clínicos em até 13 meses (SOUZA, 2002; ALMEIDA *et al*, 2007) e na avaliação de falha ou sucesso terapêutico (WU *et al*, 2010). Sua sensibilidade pode variar de acordo com a extensão tumoral e o estadiamento

da doença (ALMEIDA *et al*, 2007), apresentando níveis séricos elevados em 60 a 80% das pacientes com metástases em câncer de mama (CHEUNG *et al*, 2000).

Como todo biomarcador tumoral, por não ser 100% específico, pode apresentar suas concentrações elevadas em doenças benignas como hepatite crônica, tuberculose e sarcoidose e em outras neoplasias como o câncer de ovário, colo uterino, pulmão e hepático (CHEUNG *et al*, 2000; ALMEIDA *et al*, 2007). Segundo trabalho realizado por Park e colaboradores (2008) em mulheres portadoras de carcinomas mamários, níveis séricos elevados do marcador no pré-operatório está associado a um pior prognóstico da doença. Em medicina humana a ASCO (HARRIS *et al*, 2007) recomenda a utilização do CA15.3 para monitorar pacientes com câncer de mama durante tratamento terapêutico. O marcador não descarta a avaliação clínica, anamnese e diagnósticos de imagem.

Em medicina veterinária, nosso grupo realizou um estudo em que foi observado um aumento significativo na concentração sérica de MUC-1 em cadelas portadoras de câncer de mama com metástase quando comparado a cadelas saudáveis ou que não apresentavam a doença metastática (CAMPOS *et al*, 2012). Oliveira e colaboradores (2009) demonstraram a relação entre a superexpressão de MUC-1 no tecido tumoral e o aparecimento de metástases à distancia em cadelas portadoras de tumores mamários malignos.

1.3.1.2- MUC-16

MUC-16, também conhecida como CA125, foi identificada pela primeira vez em 1981, após a hibridização somática de células do baço de camundongos imunizados com uma linhagem celular de carcinoma epitelial de ovário (YIN & LLOYD, 2001; BAST *et al*, 2005). Foi recentemente incluída no grupo da família das mucinas. (O'BRIEN *et al*, 2001).

Estruturalmente, o MUC16 é uma glicoproteína transmembranar que consiste num enorme domínio N-terminal de mais de 12.000 resíduos de aminoácidos, com extensas regiões altamente glicosiladas, com O- e N-glicanos, e num domínio C-terminal constituído por uma longa região extracelular também glicosilada, contendo um local de potencial clivagem proteolítica. O domínio central contém até 60 sequências repetidas glicosiladas que constituem as repetições em *tandem*, característica das mucinas (O'BRIEN *et al*, 2001; THÉRIAULT *et al*, 2011).

O MUC-16 é o biomarcador sanguíneo rotineiramente utilizado para monitorar a progressão do câncer epitelial de ovário (LAKSHMANAN *et al*, 2012), e o aumento dos níveis séricos de uma concentração individualizada é um indicador prognóstico de recorrência do câncer (THÉRIAULT *et al*, 2011). Na monitorização desses pacientes, valores crescentes da concentração sérica da mucina está correlacionada com a progressão da doença em aproximadamente 90% dos casos. O tempo de meia-vida no sangue do biomarcador é cerca de 14 dias (BAST *et al*, 2005).

A expressão de MUC-16 também é observada em outros tipos de adenocarcinomas, como o câncer de mama, no entanto, seu papel na progressão desse tumor ainda não é bem esclarecida (LAKSHMANAN *et al*, 2012). Partes da MUC-16 possuem muitas semelhanças estruturais com MUC-1 e MUC-4, mucinas que já foram previamente relacionadas com participação na tumorigênese por vários mecanismos. Por conseguinte, é plausível supor que a MUC-16 pode exercer uma série de funções em adenocarcinomas que são idênticas às de outras mucinas (THÉRIAULT *et al*, 2011).

Lakshmanan e colaboradores (2012) observaram que o silenciamento de MUC-16 em uma linhagem de células de câncer de mama resultou em uma diminuição significativa da taxa de proliferação celular, tumorigenicidade, e aumento da apoptose. Além disso, constataram que o silenciamento da mucina induziu uma parada da proliferação das células tumorais mamárias na fase G2/M do ciclo celular.

Na espécie canina, vários estudos vêm sendo direcionados à procura de ferramentas, como marcadores biológicos, que possam auxiliar no diagnóstico, tratamento e acompanhamento da evolução das neoplasias (DUTRA *et al*, 2004; GAMA *et al*, 2008; FERREIRA *et al*, 2009). Entretanto poucos trabalhos abordam a relação das mucinas e o câncer de mama canino (NOUWEN *et al*, 2006; OLIVEIRA *et al*, 2009, MARCHESI *et al*, 2010; CAMPOS *et al*, 2012), e nenhum trabalho relata a utilização do MUC-16 na espécie.

1.3.2- HER-2

Proto-oncogenes são os genes responsáveis pela regulação da proliferação celular, e possíveis mutações nesses genes podem promover neoplasias. O HER-2/neu, também denominado HER-2 ou c-ErbB-2, é um proto-oncogene localizado no cromossomo 17q21.1 que codifica uma

glicoproteína transmembranar de 185 KDa que pertence à família dos receptores de fator de crescimento epidermal (DUTRA *et al*, 2004).

O gene HER-2 é amplificado em cerca de 15 a 20% dos pacientes com câncer de mama (WOLF *et al*, 2010), ocorrendo uma superexpressão de receptores para proteína na superfície celular, o que evidencia um importante papel na transformação maligna e na característica agressiva do tumor (FARZADNIA *et al*, 2010). Dessa forma, alterações no HER-2 tem sido alvo de grande atenção por parte da comunidade científica, devido à possibilidade de utilização como um indicador de prognóstico e alvo de tratamento molecular específico (PRESS *et al*, 2002; SAINI *et al*, 2011). Estudos também têm sido voltados para análise sérica de HER-2, e demonstram uma superexpressão da proteína tanto no soro quanto no tumor primário de mulheres com câncer de mama, correlacionando esse achado com pior prognóstico para o paciente (DISIS *et al*, 1997; FARZADNIA *et al*, 2010)

Os tumores mamários que superexpressam HER-2 estão associados às seguintes características: maior taxa de proliferação celular; elevado grau de malignidade; diminuição da quantidade de receptores de estrogênio e de progesterona; maior porcentagem de aneuploidia; maior capacidade de gerar metástases no sistema nervoso central e vísceras; resistência a terapia endócrina e resposta positiva à terapia com anticorpos específicos anti-HER-2 (GUTIERREZ & SCHIFF, 2011).

Estudos mostram que tanto a amplificação do gene *HER-2* (AHERN *et al.*, 1996), quanto superexpressão da sua proteína podem estar presentes em tumores mamários caninos (MARTIN DE LAS MULAS *et al*, 2003). Escobar e colaboradores (2001) encontraram uma superexpressão da proteína HER-2 em 17,6% de tumores mamários em cadelas e sugeriram que estes tumores poderiam servir de modelo comparativo para estudos de neoplasias similares em humanos.

Singer e colaboradores (2012), com intuito de compreender melhor a utilização dos anticorpos anti-HER-2 na imuno-histoquímica, analisaram a homologia entre a molécula de HER-2 humana e a canina, tendo encontrado uma homologia de 92% entre as duas moléculas. O gene HER-2 canino é mapeado no cromossoma 1q13.1 e frequentemente apresenta aberrações clonais em tumores caninos (ESCOBAR *et al*, 2001).

A relação entre a superexpressão de HER-2 e o prognóstico do câncer de mama na espécie canina ainda não está totalmente elucidada. Estudos relacionando estes fatores podem ainda encontrar divergências. Dutra e colaboradores (2004) observaram superexpressão da proteína HER-2 em 35,4% (17/48 casos) de tumores mamários caninos malignos, e não observaram positividade em nenhum dos 22 casos de tumores mamários benignos de cadelas. Observou-se também uma relação significativa entre a positividade para a superexpressão da proteína HER-2 e uma piora no prognóstico da doença (maior grau histológico e maior número de mitoses nas células tumorais). Entretanto, Hsu e colaboradores (2009), avaliando 91 amostras de tecido mamário canino, encontraram superexpressão da proteína HER-2 em 29,7% das cadelas que apresentavam tumores mamários malignos, não observando esta característica em tumores mamários benignos ou em tecido mamário normal. Constataram neste estudo um aumento na sobrevida das cadelas com tumores mamários malignos. Da mesma forma, Ressel e colaboradores (2013), avaliando 35 carcinomas mamários caninos e 11 fragmentos de tecido retirado de áreas normais adjacentes ao tumor, evidenciaram uma superexpressão da proteína somente em 10 casos malignos. Em contraste com os tumores mamários humanos, o estudo não apresentou nenhuma correlação entre o aumento da expressão de HER-2 e piora na sobrevida da cadela.

1.3.3 Marcadores celulares nos tumores mamários caninos

A expressão de determinadas moléculas em neoplasias mamárias está diretamente relacionada à progressão da doença e permite categorizar os pacientes em diferentes grupos prognósticos (HORTA *et al*, 2012) bem como alvos terapêuticos. Com o avanço da biologia molecular, novos métodos prognósticos potenciais, alguns já estabelecidos na medicina humana têm sido estudados em medicina veterinária (CASSALI *et al*, 2003).

A imuno-histoquímica pode ser aplicada na oncologia veterinária, concomitante ao exame histopatológico, como ferramenta auxiliar para o diagnóstico exato de neoplasias e sua patogênese e determinação da origem de metástases (PENA *et al*, 2013; HORTA *et al*, 2012). Mesmo com a indisponibilidade da maioria dos anticorpos monoclonais caninos para imuno-histoquímica, é demonstrada a reatividade de anticorpos monoclonais humanos para diversos antígenos de mama da espécie canina (CASSALI, 2000).

Um exemplo de marcador molecular amplamente estudado na oncologia veterinária é o fator de proliferação celular Ki67. Estudos revelam que a imunomarcação mais elevada para Ki67 é

observada em tumores mamários malignos (QUEIROGA et al, 2011). Sua expressão é diretamente proporcional ao grau de malignidade das neoplasias e inversamente proporcional à expressão de receptores de estrógeno e à sobrevivência de cadelas portadoras de carcinoma mamário (ANTUOFERMO et al., 2007).

Dentre os marcadores moleculares estudados no processo de carcinogênese a identificação de receptores hormonais como estrógeno (RE) e progesterona (RP) tornaram-se foco em vários estudos epidemiológicos de fatores de risco associados ao câncer de mama humano e canino (SUTHERLAND *et al.*, 1998, SILVA *et al.*, 2004). Assim como ocorre na espécie humana a expressão de RE e RP é relacionada ao melhor prognóstico dos pacientes caninos com carcinomas mamários, além da possibilidade de aderir a uma hormonioterapia (SORENMO, 2003; GAMA *et al.*, 2008; HORTA *et al.*, 2014). De forma geral, os tumores de maior grau de malignidade, apresentam menor expressão destes receptores, e o mesmo pode ser observado em fases mais avançadas da doença, indicando uma certa evolução na independência tumoral (SORENMO, 2003; CHANG *et al.*, 2009). Apesar de estudos apontarem esta similaridade entre espécies, a análise de RE e RP na clínica veterinária não é rotineiramente realizada em animais com carcinoma mamário, diferente do que se observa em mulheres, em quem os receptores hormonais são rotineiramente analisados como marcadores prognósticos e preditivos de resposta ao tratamento endócrino (PENA *et al.*, 2013).

A ativação de receptores hormonais, além de promover a regulação da expressão de ciclinas, está relacionada ao aumento da proliferação e estímulo a migração celular, em lesões epiteliais mamárias, por regulação da expressão de moléculas de adesão como a E-caderina (HELGUERO *et al.*, 2008). Caderinas são moléculas de adesão dependentes de cálcio e a E-caderina é a principal proteína envolvida com a adesão de células epiteliais (MATOS *et al.*, 2007). Imuno-marcações reduzidas de E-caderina estão associadas ao fenótipo maligno e a perda de sua expressão pode estar relacionada ao crescimento infiltrativo, desprendimento celular e a disseminação tumoral (MATOS *et al.*, 2007). A expressão da E-caderina pode representar um fator prognóstico para os adenocarcinomas mamários da mulher e da cadela (HORTA *et al.*, 2014).

2- JUSTIFICATIVA

A partir desta revisão, pode-se observar uma intensa busca por marcadores moleculares que estejam intimamente envolvidos no processo de carcinogênese, a fim de melhor entender a transformação celular. Dentre estes estudos, grande parte tem sido voltada para a expressão de mucinas teciduais e séricas como ferramentas para auxílio no diagnóstico e acompanhamento da evolução da doença, bem como alvos terapêuticos.

Apesar da alta incidência de tumores mamários caninos e vários estudos apontando similaridades entre tumores mamários na espécie canina e humana, poucos são os relatos consistentes a respeito do comportamento de marcadores tumorais séricos em cadelas frente à doença. Além disso, os testes de dosagens séricas são realizados em menor tempo e menor custo para o paciente, tornando este exame economicamente mais viável quando comparado à outras técnicas como a imuno- histoquímica.

Dessa forma, nosso trabalho torna-se justificável por avaliar a expressão sérica e tecidual de marcadores moleculares no câncer como ferramenta de auxílio do estadiamento da doença e acompanhamento do tratamento. Por conseguinte, o estudo também visa a auxiliar na consolidação da utilização da cadela como uma espécie animal comparativa para o estudo do câncer de mama humano.

3- HIPÓTESE

Os níveis de concentração sérica e expressão tecidual dos marcadores tumorais MUC-1, MUC-16 e HER-2 apresentam-se elevados no câncer de mama metastático na cadela, com relação direta a expressão imuno- histoquímica de RE, RP e Ki67 e relação inversa a imunoeexpressão de E-caderina e a sobrevivência desses animais.

4- OBJETIVOS

4.1- Geral

Avaliar a expressão sérica e tecidual dos marcadores tumorais MUC-1, MUC-16 e HER-2 em cadelas portadoras de carcinoma mamário metastático pelas técnicas de imunensaio (ELISA) e imuno- histoquímica, definindo a sua relação com marcadores prognósticos tumorais e sobrevida dos animais.

4.2- Específicos

I. Avaliar e comparar a expressão sérica de MUC-1, MUC-16 e HER-2 em cadelas diagnosticadas com carcinomas mamários metastáticos e cadelas híginas por meio da técnica de imunensaio (ELISA);

II. Determinar a dosagem sérica de MUC-1, MUC-16 e HER-2 em cadelas diagnosticadas com câncer de mama metastático no momento de exérese tumoral, em 4 ciclos de quimioterapia (com intervalos de 21 dias) e 30 dias após o último ciclo de tratamento. Comparar as médias dos níveis séricos observados e relacionar a expressão sérica desses marcadores com o tempo de sobrevida dos animais;

III. Identificar, pela técnica de imuno- histoquímica, o padrão de expressão das proteínas MUC-1, MUC-16, HER-2, RE, RP, Ki67 e E-caderina em tumores de cadelas com câncer de mama metastático;

IV. Comparar os métodos analíticos de imunensaio (ELISA) e imuno-histoquímica na detecção da expressão sérica e tecidual, respectivamente, para MUC-1, MUC-16 e HER-2 em cadelas portadoras de carcinoma mamário metastático;

V. Caracterizar a relação entre a expressão sérica e tecidual dos marcadores MUC-1, MUC-16 e HER-2 e a expressão imuno-histoquímica dos marcadores prognósticos RE, RP, Ki67 e E-caderina, em tumores de cadelas com câncer de mama metastático.

5- MATERIAL E MÉTODOS

5.1- Seleção dos animais

Os animais incluídos no projeto foram provenientes do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG. Todos passaram por avaliação física, radiografia do tórax e punção aspirativa com agulha fina (PAAF) de linfonodos em caso de suspeita de metástase. As cadelas foram selecionadas casualmente e sem predileção de raça, e forma divididas em dois grupos:

A- Grupo de cadelas híginas, sem diagnóstico de câncer de mama (controle);

B- Grupo de cadelas com câncer de mama sem metástase para linfonodo;

C- Grupo de cadelas com câncer de mama apresentando metástase para linfonodo

Todos os procedimentos experimentais foram executados segundo as recomendações e a aprovação do Comitê de Ética em experimentação animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG), sob o número de protocolo 279/10 (ANEXO I).

5.2- Coleta de amostra sanguínea

As amostras sanguíneas, para realização dos testes séricos, foram colhidas durante a exérese tumoral nas cadelas com suspeita de câncer de mama na avaliação clínica. Após confirmação do diagnóstico pelo laudo histopatológico, as pacientes que aderiram ao tratamento terapêutico foram acompanhadas com coletas periódicas durante os 4 ciclos de quimioterapia, com intervalos de 21 dias, e uma última coleta de sangue foi realizada em consulta de rotina no primeiro retorno pós-tratamento.

As amostras sanguíneas dos animais do grupo controle foram gentilmente cedidas por proprietários de cadelas clinicamente saudáveis, submetidas à coleta de sangue para controle de exames de rotina.

5.3 Histopatologia

Os tumores mamários caninos removidos cirurgicamente foram coletados e fixados em formol neutro tamponado 10% (24 a 48 horas), processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina, seccionados a 4µm e corados pela hematoxilina e eosina. Todos os casos foram avaliados e diagnosticados por veterinários patologistas do Laboratório de Patologia Comparada do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. O critério usado para diagnóstico foi

baseado nas características histopatológicas descritas por Cassali et al (2011) e Misdorp et al (1999).

5.4 Imuno-histoquímica

Para a análise imuno-histoquímica, secções de 4µm foram cortadas e colocadas sobre lâminas gelatinizadas. As lâminas foram desparafinadas, re-hidratadas em uma série de álcoois progressivamente diluídos, submetidas a recuperação antigênica e posteriormente incubadas em peróxido de hidrogênio 3% em metanol para o bloqueio da atividade da peroxidase endógena. Reagentes foram aplicados manualmente e a imunorreatividade foi visualizada através da exposição das lâminas por 10 minutos ao cromógeno diaminobenzidina (DAB Substrate System, Laboratory Vision) e contra-coradas com hematoxilina. Como controles positivos foram usadas amostras de glândula mamária de cadela previamente testadas e os controles negativos foram obtidos por substituição do anticorpo primário pelo soro normal. Detalhes dos anticorpos, diluições, recuperação, tempo de incubação e imunomarcção estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1: Reagentes para imuno-histoquímica e métodos utilizados

Anticorpo	Clone	Fabricante	Diluição*	Recuperação (T°)	Tempo de incubação (hs)
RE	ID5	Dako	1:20	PR (125°C)	1
RP	HPRA2	Neomarkers	1:20	PR (125°C)	1
Ki-67	Mib-1	Dako	1:25	PR (125°C)	1
E- caderina	NCH-38	Dako	1:60	BM (98°C)	1
MUC-1	E29	Dako	1:50	BM (98°C)	16
MUC-16	M11	Dako	1:10	BM (98°C)	16
C erb B2	Polyclonal	Dako	1:100	BM (98°C)	16

RE: Receptor de estrógeno; RP: Receptor de Progesterona; PR: Pressurização (Pascal); BM: Banho Maria

*Diluição padronizada no Laboratório de Patologia Comparada

A imunomarcção para receptor de estrógeno (RE) e receptor de progesterone (RP) foi considerada positiva em casos com mais de 1% de marcação nuclear presente nas células tumorais (HAMMOND *et al.*, 2010). O índice de proliferação foi calculado a partir da contagem de células com marcação nuclear positiva para Ki-67 (anti-MIB-1) em um total de 1000 células neoplásicas para cada lesão (DUTRA *et al.*, 2004). A imunomarcção para E-caderina foi avaliada semi-quantitativamente e considerado positivos os casos com mais de 10% das células tumorais marcadas (PRASAD *et al.*, 2009).

A avaliação da expressão de MUC-1 foi realizada semi-quantitativamente e considerados os padrões de marcação citoplasmática, membranar e nuclear. A reatividade para MUC-1 foi considerada positiva quando pelo menos um destes componentes foi marcado. A avaliação da proteína foi realizada por estimativa de porcentagem de células positivas: (-) ausência de marcação; ($\leq 20\%$) marcação fraca; ($\geq 20 \leq 50\%$) marcação moderada; ($\geq 50\%$) marcação forte (CROCE *et al.*, 2003; MANUALI *et al.*, 2012). Para análise de associação e sobrevida, os casos com imunomarcção $\leq 20\%$ foram considerados negativos, e com resultados $\geq 20\%$ foram considerados positivos para MUC-1.

A avaliação de reatividade para MUC-16 foi graduada em uma escala de 0 a 3 (0 para ausência de marcação; (+) marcação fraca; (++) marcação moderada; (+++) marcação forte). A porcentagem de células tumorais que apresentaram imunoreatividade para MUC-16 seguiram o seguinte critério: 1 (0–25%); 2 (26–50%); 3 (51–75%) e 4 (76–100%) Os valores da intensidade de marcação e células imunoreativas foram multiplicadas para obtenção do valor final que variou de 0 a 12 (CHAUHAN *et al.*, 2006). Para análise de associação e sobrevida, os casos com imunomarcção ≤ 2 foram considerados negativos, e com resultados >2 foram considerados positivos para MUC-16.

A superexpressão de HER-2 foi avaliada segundo os critérios estabelecidos pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO/CAP) (WOLFF *et al.*, 2013), o qual considera positivos os casos em que há marcação membranar contínua completa e intensa em mais de 10% das células epiteliais tumorais,

5.5 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

A técnica de imunoenensiao ELISA baseia-se na mobilização de um dos componentes, em fase sólida, e na utilização de um conjugado ligado a uma enzima. Como o substrato forma um produto colorido, a alteração de cor é monitorada visualmente ou por meio de espectrofotômetro que relaciona a quantidade de substância dosada à intensidade de cor.

As amostras de sangue colhidas para obtenção de soro foram centrifugadas por cinco minutos em 3000rpm para separação do soro e do concentrado de hemácia. Uma vez centrifugado, o soro foi aliqotado em ependorfs identificados com o nome da cadela e seu número de ficha clínica e armazenados em temperatura a -20°C até o momento da análise. Para evitar possíveis perdas de expressão protéica, as amostras séricas descongeladas eram descartadas, evitando seu recongelamento. Todas as amostras foram processadas em duplicata, em cada corrida foi adicionado um soro controle negativo e um positivo (componentes do próprio Kit). Os reagentes testados foram os mesmos utilizados em humanos, uma vez que não existam Kit's específicos para a espécie canina. Os reagentes utilizados e seus respectivos fabricantes foram: MUC-1 (CanAg15.3 - Fujirebio Diagnostics, PA), MUC-16 (CanAg125 - Fujirebio Diagnostics, PA) e HER-2 (Total HER2/ErbB2 - Cell Signaling Techonology, US).

5.6 Tempo de Sobrevida Global

O tempo de sobrevida foi definido (em dias) como sendo o período entre a data da exérese cirúrgica do tumor até a data de óbito do animal que morreu pela doença (*end points*). Os animais foram considerados censurados quando a causa da morte era desconhecida ou não relacionada com a doença e ao término do acompanhamento.

6. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados sob a forma de dois artigos científicos elaborados (um aceito e um submetido para publicação) durante o período de doutoramento.

ARTIGO 1

**Prognostic significance of tissue and serum HER2 and MUC1 in
canine mammary cancer**

Aceito para publicação em
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation

ACTION REQUIRED: Journal of Veterinary Diagnostic Investigation - Decision on Manuscript ID 14-0469.R5



editor3@jvdi.org por manuscriptcentral.com 20 de mai (Há 8 dias) ☆
 para geovanni.cassa., editorial, mim, ju_soprano, fabianasantos..., ninarríos, gleidicel, enioferreira, geovanni.cassa. ▾

inglês > português Traduzir mensagem Desativar para: inglês ×

20-May-2015

Dear Mr. Cassali:

I am pleased to inform you that your revised manuscript number 14-0469.R5 entitled "Prognostic significance of tissue and serum HER-2 and MUC-1 in canine mammary cancer" has been accepted for publication in the Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. The article will likely appear in the July 2015 issue of the Journal. Accordingly, you may now cite the article as "in press" in J Vet Diagn Invest, Vol. 27, Number 4, July 2015.

I have attached an edited copy of your manuscript. Please read it carefully to ensure that meaning was not altered during our editing, perform the additional corrections needed, and return the final copy to us (via e-mail to editorial@jvdi.org) WITHIN 5 DAYS so galley proof production can proceed on schedule. Failure to return your final copy in a timely manner could result in a 2-month delay in the publication of your paper.

If your article contains color figures and you wish for your color figures to appear in the print version of JVDI (\$800/page and \$200/very additional page), please fill out, sign, and return the attached Color Figure Agreement. You may return the color figure agreement to the Editorial Assistant via email (editorial@jvdi.org).

Be advised that galley proofs will be sent to you electronically within the next 6 weeks. We require that proofed galleys be returned via e-mail within 48 hours.

The invoice for page charges (\$75/page) and color figure charges (if applicable; \$800/page and \$200/very additional page for color figures in print) will also be sent to you by e-mail at the same time, and payment is expected within 30 days.

Thank you for choosing JVDI for your fine contribution. We look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
 Francisco A. Uzal, DVM, MSc, PhD, Dipl. ACVP
 Editor, Journal of Veterinary Diagnostic Investigation
editor3@jvdi.org

**Prognostic significance of tissue and serum HER2 and MUC1 in canine mammary
cancer**

Liliane C. Campos, Juliana O. Silva, Fabiana S. Santos, Marina R. Araújo, Gleidice E.

Lavalle, Enio Ferreira, Giovanni D. Cassali¹

From the Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences (Campos, Silva, Santos, Araújo, Ferreira, Cassali) and Veterinary School, Veterinary Hospital (Lavalle), Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

¹Corresponding Author: Giovanni Dantas Cassali, Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.
cassalig@icb.ufmg.br

Running title: Tissue and serum HER2 and MUC1 in canine mammary cancer

Abstract. The aim of our study was to compare serum levels and protein tissue of human epidermal growth factor receptor-2 proto-oncogene (HER2) and mucin 1 (MUC1) using an antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay and immunohistochemistry (IHC) in canine mammary carcinomas and investigate how the 2 markers correlate with dogs with metastasis and without metastasis to a regional lymph node. Forty-eight female dogs were selected, including 14 with non-metastatic cancer, 14 with lymph node metastasis, and 20 healthy animals. Serum samples were collected from all the animals and tissues from 28 dogs with malignant mammary tumor with or without metastasis for evaluated HER2 and MUC1 expression. Tissue sample were evaluated for MUC1 and HER2 immunoexpression by IHC. The results showed measurable serum levels of MUC1 and HER2 in all groups. While serum MUC1 levels were significantly higher in animals with metastasis than the other 2 groups, no increase was observed in HER2 serum levels. The MUC1 IHC results showed that only membrane immunostaining was significantly different between the groups. Statistically, there was an association between immunostaining and the serum HER2 levels. Our results indicate that serum concentrations of HER2 and the IHC staining pattern for HER2 in primary tumor do not correlate with the presence of regional metastasis. However, increased concentrations of MUC1 in the serum of dogs with mammary cancer are associated with the presence of metastasis to regional lymph nodes. A membrane pattern of IHC staining for MUC1 in the primary tumor suggests that metastases to regional lymph node are present.

Key words: Female dogs; mammary gland; neoplasia; tumor marker.

Spontaneous mammary gland tumors are the most frequent type of neoplasm in female dogs, and the prevalence of malignant lesions varies from 26% to 73%.^{2,4} To date, surgery is the primary and most cost-effective treatment; however, due to local recurrence and early metastases, the post-surgery overall survival rate is low. Thus, there is a great interest in veterinary medicine to better monitor tumor development and response to therapy.²

The human epidermal growth factor receptor-2 proto-oncogene, also known as HER2 and *c-erbB-2*, is a 185-kDa integral membrane protein and encodes a growth factor receptor that has been found to play an important role in breast cancer.⁸ Previous studies demonstrated that HER2 protein overexpression in canine mammary gland tumors is currently considered an indicator of poor prognosis.⁶ However, a previous study showed an increased survival in dogs with malignant mammary tumors overexpressing HER2 protein.¹⁰

Another protein found in breast cancer is mucin 1 (known as MUC1 in tissue and CA15.3 in serum), which is a type 1 transmembrane glycoprotein that is aberrantly overexpressed in various cancer cells.¹¹ Studies have demonstrated that increased expression of this glycoprotein in human cancer cells is associated with tumor invasion, the potentiation of cellular signaling, and resistance to genotoxic anti-cancer reagents, thus suggesting that MUC1 expression is closely associated with tumor malignancy and a poor prognosis.¹³ We have previously shown that MUC1 serum levels are detectable in female dogs with mammary cancer and that the levels tend to increase with metastasis.² Therefore, the objectives of our current study were to compare serum and protein tissue HER2 and MUC1 by antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunohistochemistry (IHC), respectively, in dogs with mammary gland cancer and to investigate how the 2 markers correlate with the evolution of disease.

Our study was conducted in accordance with the Animal Experimentation Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (UFMG; Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; protocol no. 279/10). Forty-eight female dogs, randomly selected, were admitted to the

Veterinary Hospital of the UFMG, and histological testing, proposed in a previous study,³ were performed by a veterinary pathologist from the Laboratory of Comparative Pathology of UFMG. Twenty-eight female dogs were diagnosed with malignant mammary tumors (14 without metastatic disease and 14 with metastasis to regional lymph nodes), and 20 female dogs were healthy (with no evidence of mammary neoplasm during a routine check-up). To evaluate metastatic disease, all patients were subjected to pulmonary radiographic analysis and histological examination of the regional lymph nodes. One regional lymph node was processed routinely for formalin-fixed, paraffin-embedded sections from every dog, and a minimum of 2 slides were examined per lymph node. Based on the presence or absence of visible microscopic metastases, the cases were grouped into dogs with regional metastasis ($n = 14$) and dogs without metastasis ($n = 14$). Thoracic radiographs were reviewed from every dog, and none had visible evidence of pulmonary metastasis.

Peripheral venous blood samples were obtained from subjects during the preoperative stage and routine check-ups (control group). After collection and clot retraction, the samples were centrifuged at 2415 RCF for 5 min, aliquoted to avoid freeze–thaw cycles of sample and loss of bioactive, and stored at -20°C until use. The serum tests were performed according to the protocol of each manufacturer. All assays were in duplicate, and a positive and a negative control (supplied with the kit) with a known concentration range was also measured. To assess MUC1^a (based on 2 mouse monoclonal antibodies: Ma695 as catcher antibody recognizing a sialylated carbohydrate epitope expressed on the MUC1 antigen and Ma552 as tracer antibody targeting a hydrophilic peptide of the protein core) and HER2^b (using anti-human sHER2 that detects the soluble circulating fragment of HER2, p185^{HER2}) serum, ELISA kits were used. In all assays, positive control serum (supplied with the kit) was also measured. The reagents used were the same as the reagents used for human diagnostics.^{2,9,12} A microplate reader^c was used for the measurements. The cutoff point to evaluate the serum

test results was conducted through the ROC curve, and the established positive results were >0.50 U/mL and >0.62 U/mL for MUC1 and HER2, respectively.

For IHC, samples from the primary tumors samples were fixed in 10% formalin for 24–48 hr and routinely prepared. Sections immunoreacted with a polyclonal rabbit anti-human c-erbB-2 oncoprotein^d (1:100, polyclonal) and a mouse monoclonal anti-MUC1^d (1:50, clone E29) and incubated overnight (16–18 hr) at 4°C. After incubation, target antigens were visualized using horseradish peroxidase^e with diaminobenzidine as the chromogen. A human breast carcinoma tissue known to overexpress the receptor (+3) was used as a positive control for HER2. For MUC1, the internal positive controls were the apical surface of normal glandular epithelial cells. Negative controls were obtained by omitting the primary antibodies. MUC1 and HER-2 IHC was performed on primary tumors.

The expression of HER2 was scored by 2 observers in accordance with the Bertagnolli¹ guidelines for reporting HER2 immunostaining. In our study, specimens with scores of 0 and +1 were regarded as negative, and scores of +2 and +3 were defined as HER2 overexpression.⁷ To evaluate MUC1 expression, a semi-quantitative analysis was performed in accordance with a previous study.⁵ Immunostaining of the diffuse cytoplasmic expression, plasma membranes, and nuclei was evaluated. For association analysis, specimens with $\leq 20\%$ of the cells labeled were regarded as negative, and cells with $\geq 20\%$ of the cell labeled were considered MUC1 positive.

Statistical analysis were performed with GraphPad Prisms v. 5.0,^f. When possible, analysis of variance was used, followed by the Student–Newman–Keuls (SNK) and Tukey tests or Mann–Whitney test (for nonparametric analysis); correlations were investigated with the Pearson or Spearman tests. Results were considered significant when the test probability was $p < 0.05$.

The age of the animals with mammary cancer ranged from 8 to 16 years (mean: 10.2 ± 2.2). The mean ages of the subjects with and without metastasis were not significantly

different (10.3 and 11.4, respectively; $p = 0.221$). Among the diagnosed mammary gland tumors, the most frequent variant observed was carcinoma in a mixed tumor (16/28, 57.1%) and micropapillary carcinoma in the group with metastasis (5/14, 35.7%). While breed was not used as a selection criterion, the greatest percentage of patients were mixed breed (11/28, 39.2%) followed by Poodles (7/28, 25.0%).

The serum concentration of MUC1 was significantly elevated in female dogs with metastatic mammary gland cancer to a regional lymph node as compared with the control dogs and dogs with no metastasis to a regional lymph node group (both $p < 0.001$; Table 1). In our cases, an increased concentration of serum MUC1 was observed in animals with metastasis to a lymph node, and the levels of MUC-1 correlated with the advance of disease ($r = 0.613$, $p < 0.001$).

All tumors expressed MUC1, but the expression pattern differed among them. Figure 1C and Table 2 show that 26 out of 28 (92.8%) were positive for cytoplasmic MUC1 expression, 18 out of 28 (64.2%) were positive for membrane MUC1 expression (Fig. 1D; Table 2), and only 3 out of 28 (10.7%) were positive for nuclear MUC1 expression (Fig. 1E; Table 2). A total of 18 out of 28 (64.2%) exhibited both cytoplasmic and membrane MUC1 immunostaining (Fig. 1F; Table 2). A significant difference for membrane expression for MUC1 was observed ($p = 0.048$) in metastatic tumors when compared with non-metastatic, while no difference was observed for cytoplasmic or nuclear immunostaining ($p = 0.558$ and $p = 0.386$, respectively; Table 3).

HER2 protein levels did not differ between groups ($p > 0.05$; Table 1). No correlation between an increase in serum HER2 and the presence (with or without metastasis) or absence of mammary cancer was observed ($r = -0.137$, $p = 0.352$). Increases in serum HER2 and MUC1 levels weakly correlated ($r = 0.146$) but were not statistically significant ($p = 0.320$).

Nineteen out of 28 dogs (67.8%) showed negative HER2 immunostaining while 9 (32.1%) were positive (Fig. 1A, 1B; Table 4). When HER2 protein expression was compared

between groups, a significant difference was not observed ($p = 0.367$). In addition, HER2 overexpression and metastatic disease were weakly correlated ($r = 0.0576$) but the correlation was not significant ($p = 0.698$).

In our study, no significant correlations were observed between HER2 protein expression and MUC1 protein expression in the cytoplasm ($r = 0.065$, $p = 0.738$), membrane ($r = 0.124$, $p = 0.521$), or nuclei ($r = -0.066$, $p = 0.735$). HER2 protein expression (either serum or tissue expression) did not correlate with metastatic disease. However, there was a significant association ($p = 0.016$) of negative immunostaining with HER2 serum levels (Table 2). For MUC1 protein expression, no significant associations between the serum levels and cytoplasmic ($p = 0.229$), nuclear ($p = 0.530$), and membrane ($p = 1.000$) immunostaining were observed (Table 2). The frequency distributions of positive and negative IHC and serum MUC1 levels are presented in Table 5.

In our study, the possibility of using human antigens kits to determine HER2 serum concentrations in dogs was demonstrated. However, the present data shows that this protein cannot be used as a tumor marker in the serum of dogs, as the HER2 serum concentrations were not significantly different between healthy animals and those with cancer. Moreover, after measuring the HER2 serum levels in 20 normal subjects, the mean for the normal group was determined to be 0.55 ng/ml, which has not been previously determined, to the authors' knowledge.

In the present study, HER2 protein overexpression was observed in 32.1% (9/28) of canine malignant mammary tumors. This percentage was similar to what has been reported in another study.⁶ HER2 overexpression is associated with malignancy, high histological tumor grade, large tumor size, and p53 expression, suggesting a role in canine mammary gland carcinogenesis¹ and a poor prognosis.⁶ On the other hand, current research shows a controversial relationship of HER2 in canine tumors.¹⁰ Our results do not show a significant difference in HER2 protein expression between groups of dogs with or without metastasis to a

regional lymph node, suggesting that there is no prognostic significance in the analysis of HER2, in isolation in the serum or in the primary epithelial mammary tumors. The association of HER2 serum and tissue expression levels was positive and significant similar to human patient-based studies.¹⁴ This finding is interesting because an ELISA is a quantitative method, whereas IHC is a morphological, in situ, and semi-quantitative test. Moreover, the ELISA for serum HER2 is a dynamic test that can be performed at any time and can be used when primary tumor samples are unavailable, thus eliminating the need for a biopsy. The present data demonstrate a significant increase in the serum concentration of MUC1 concentrations between dogs with metastasis to a regional lymph node as compared to dogs without detectable node metastasis and control dogs. MUC1 expression was detected in the primary mammary tumors from all cases. Cytoplasmic immunostaining was predominant, which agreed with findings reported in a human study.⁵ However, our study showed a significant increase in membrane immunostaining by MUC1 on primary tumors of dogs with metastasis to a regional lymph node compared with tumors of dogs without detectable node metastasis.

There was no evidence that serum concentrations of HER2 or IHC staining of HER2 in primary canine mammary cancer correlated with the presence of metastasis to regional lymph nodes. However, these results indicate that determining the serum concentration of MUC1 and examining the primary tumor with IHC for membrane distribution of MUC1 helps predict the likelihood of metastasis to a regional lymph node in dogs with a mammary tumor without pulmonary metastases determined by radiographs of the thorax.

Sources and manufacturers

- a. CanAg, Fujirebio Diagnostics AB, Göteborg, Sweden.
- b. eBioscience Diagnostic Inc., Vienna, Austria.
- c. SpectraMax 190 absorbance microplate reader, Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA.

- d. Dako North America Inc., Carpinteria, CA.
- e. Advance HRP visualization method, Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark.
- f. GraphPad Prisms v. 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

This work was financially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

References

1. Bertagnolli AC, et al. Canine mammary mixed tumours: immunohistochemical expressions of EGFR and HER-2. *Aust Vet J* 2011;89:312–317.
2. Campos LC, et al. CA15.3, CEA and LDH in dogs with malignant mammary tumors. *J Vet Intern Med* 2012;26:1383–1388.
3. Cassali GD, et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors—2013. *Braz J Vet Pathol* 2014;7:38–69.
4. Cavalcanti MF, Cassali GD. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas—revisão [Prognostic factors in clinical and histopathological diagnosis of breast tumors in female dogs-review]. *Rev Clin Vet* 2006;XI:56–63. Portuguese.

5. Croce MV, et al. Patterns of MUC1 tissue expression defined by an anti-MUC1 cytoplasmic tail monoclonal antibody in breast cancer. *J Histochem Cytochem* 2003;51:781–788.
6. Dutra AP, et al. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:1673–1681.
7. Ferreira E, et al. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol* 2009;7:230–235.
8. Lüftner D, et al. Serum HER-2/neu in the management of breast cancer patients. *Clin Biochem* 2003;36:233–240.
9. Manuali E, et al. CA 15-3 cell lines and tissue expression in canine mammary cancer and the correlation between serum levels and tumour histological grade. *BMC Vet Res* 2012;8:86–98.
10. Shinoda H, et al. Significance of ER α , HER2, and CAV1 expression and molecular subtype classification to canine mammary gland tumor. *J Vet Diagn Invest* 2014;26:390–403.
11. van der Vegt B, et al. The expression pattern of MUC1 (EMA) is related to tumour characteristics and clinical outcome of invasive ductal breast carcinoma. *Histopathology* 2007;51:322–335.
12. Vinothini G, et al. Evaluation of molecular markers in canine mammary tumors: correlation with histological grading. *Oncol Res* 2009;18:193–201.
13. Wesseling J, et al. A mechanism for inhibition of E-cadherin-mediated cell–cell adhesion by the membrane-associated mucin episialian/MUC1. *Mol Biol Cell* 1996;7:565–577.
14. Willsher PC, et al. Prognostic significance of serum c-erbB-2 protein in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1996;40:251–255.

Authors' contributions

LC Campos, E Ferreira , and GD Cassali contributed to conception and design of the study. LC Campos, MR Araújo, E Ferreira contributed to acquisition, analysis, and interpretation of data. LC Campos , JO Silva and FS Santos contributed to acquisition and analysis of data. GE lavelle contributed to acquisition of data. LC Campos, E Ferreira, and GD Cassali drafted the manuscript. LC Campos, MR Araújo, E Ferreira, and GD Cassali critically revised the manuscript. All authors agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions relating to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Table 1. MUC1 and HER2 serum levels in female dogs from groups I, II, and III (mean \pm standard deviation).*

Group†	MUC1 (U/mL)	HER2 (ng/mL)
Group I (20)	0.31 \pm 0.19 ^a	0.55 \pm 0.19 ^a
Group II (14)	0.53 \pm 0.45 ^a	0.81 \pm 0.34 ^a
Group III (14)	1.08 \pm 0.44 ^b	0.95 \pm 0.89 ^a

* Different superscript letters in the same column differ statistically with a p value <0.05 .

Group I: female dogs without mammary cancer; group II: female dogs with mammary cancer without metastasis; group III: female dogs with metastasis to regional lymph nodes in mammary cancer.

† n = numbers in parentheses.

Table 2. Association of immunohistochemical (IHC) expression and MUC1 serum levels in female dogs with mammary cancer ($n = 28$).*

MUC1 serum	IHC MUC1					
	Cytoplasm		Nucleus		Membrane	
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
Positive	18 (64.2)	10 (90.9)	3 (100)	17 (65.3)	13 (72.2)	7 (63.6)
Negative	8 (29.7)	1 (9.1)	0 (0)	9 (34.7)	5 (27.8)	4 (36.4)
Total	26 (100)	11 (100)	3 (100)	26 (100)	18 (100)	11 (100)

* MUC1 serum positive: ≥ 0.50 U/mL; MUC1 serum negative: < 0.50 U/mL; IHC MUC1

positive: $\geq 20\%$ of the cells labeled; IHC MUC1 negative: $< 20\%$ of the cells labeled. Numbers in parentheses are percentages.

Table 3. Evaluation of immunohistochemical expression of HER2 and MUC1 in female dogs from group II ($n = 14$) and group III ($n = 14$).†

	MUC1			HER2
	MP	CP	NP	
Group II				
Positive	7 (50)	14 (100)	1 (7)	4 (29)
Negative	7 (50)	0 (0)	13 (93)	10 (71)
Group III				
Positive	11 (78)*	12 (86)	2 (15)	5 (37)
Negative	3 (22)	2 (14)	12 (85)	9 (63)

† MP = membrane pattern; CP = cytoplasmic pattern; NP = nuclear pattern. Group II: female dogs with mammary cancer without metastasis; group III: female dogs with metastasis to regional lymph nodes in mammary cancer. Immunohistochemistry (IHC) HER2 positive (score 2+ or 3+); IHC HER2 negative (score 0 or 1+); IHC MUC1 positive: $\geq 20\%$ of the cells labeled; IHC MUC1 negative: $< 20\%$ of the cells labeled. Numbers in parentheses are percentages.

* $p < 0.05$.

Table 4. Association of immunohistochemical (IHC) expression and HER2 serum levels in female dogs with mammary cancer ($n = 28$).†

HER2 serum	IHC HER2		
	Positive	Negative*	Total
Positive	7 (77.7)	5 (26.3)	13 (44.8)
Negative	2 (22.3)	14 (73.7)	16 (55.2)
Total	9 (100)	19 (100)	28 (100)

† HER2 serum positive: ≥ 0.62 U/mL; HER2 serum negative: < 0.62 U/mL; IHC HER2 positive (score 2+ or 3+); IHC HER2 negative (score 0 or 1+). Numbers in parentheses are percentages.

* $p < 0.05$.

Table 5. Evaluation of immunohistochemical expression of HER2 and MUC1 in canine mammary neoplasms ($n = 28$).*

Intensity scoring	HER2	MUC1		
	MP	MP	CP	NP
0	9 (32.1)	3 (10.7)	0 (0)	21 (75)
1+	10 (35.8)	7 (25.0)	2 (7.0)	4 (14.2)
2+	9 (32.1)	7 (25.0)	3 (10.3)	3 (10.7)
3+	0 (0)	11 (39.2)	24 (82.7)	0 (0)

* MP = membrane pattern; CP = cytoplasmic pattern; NP = nuclear pattern. Numbers in parentheses are percentages.

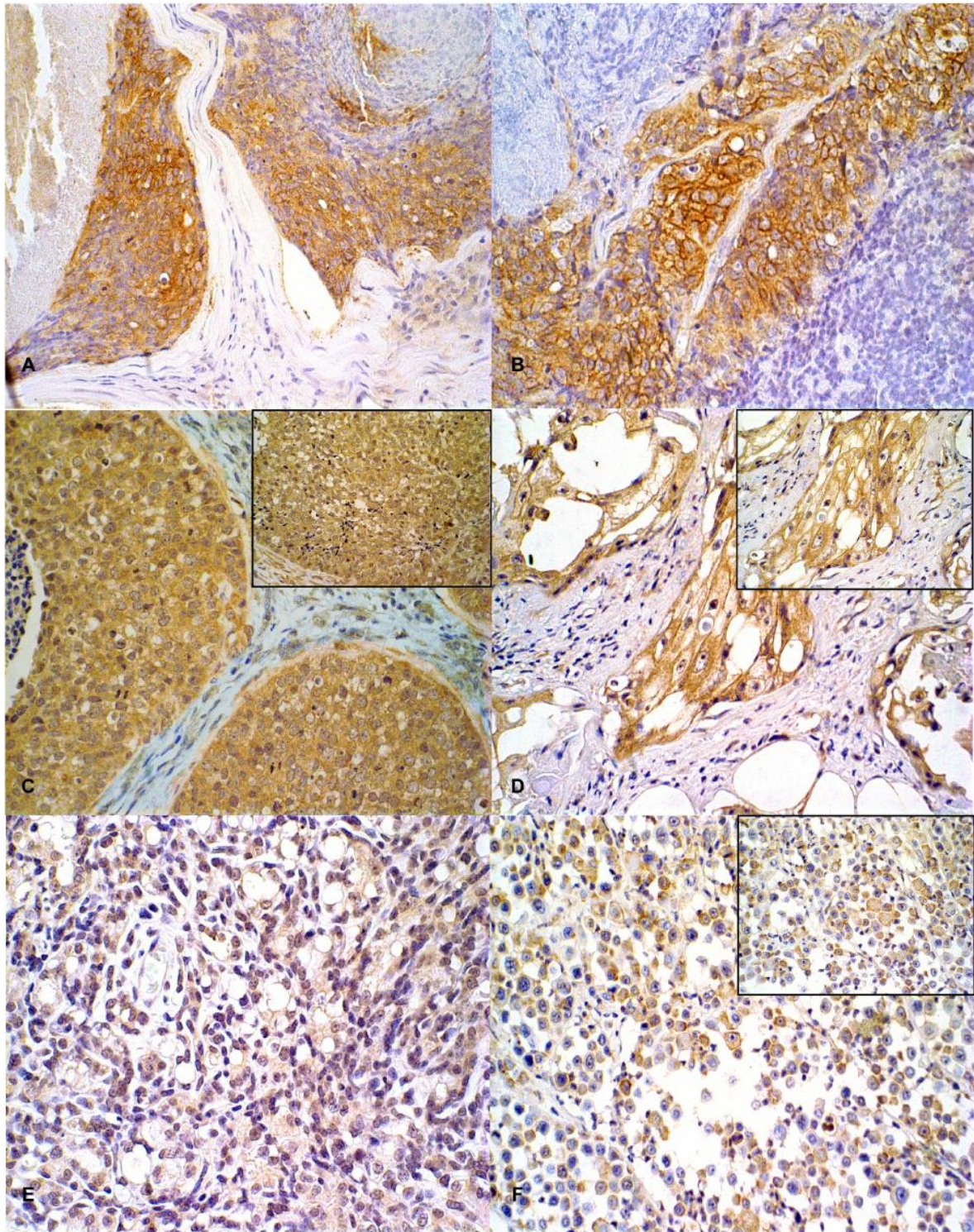


Figure 1. Immunohistochemical staining of canine mammary carcinoma sections. **A**, HER2 protein expression, complete membrane staining (2+), 0 \times . **B**, HER2 protein expression, complete membrane staining (2+), 40 \times . **C**, MUC1 protein expression, cytoplasmic pattern (3+), 40 \times . **D**, MUC1 protein expression, membrane pattern (3+), 40 \times . **E**, MUC1 protein expression, nuclear pattern (3+), 40 \times . **F**, MUC1 protein expression, mixed pattern (3+), 40 \times .

ARTIGO 2

MUC-1 e MUC-16 sérico e tecidual em cadelas com carcinomas mamários metastáticos: Associação com a sobrevida dos pacientes e com a expressão tecidual de RE, RP, HER-2, Ki-67 e E-caderina

Submetido para publicação em
Pesquisa Veterinária Brasileira

MUC-1 e MUC-16 sérico e tecidual em cadelas com carcinomas mamários metastáticos: Associação com a sobrevida dos pacientes e com a expressão tecidual de RE, RP, HER-2, KI-67 e E-caderina

Liliane C. Campos¹, Juliana O. Silva¹, Marina R. Araújo¹, Cecília B. Campos^{1,2}, Gleidice E.Lavalle³, Enio Ferreira¹, Geovanni D. Cassali¹

¹ Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

² Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Jaboticabal, SP, Brasil

³ Escola de Veterinária/ Hospital Veterinário/ Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

Autor correspondente: Dr. Geovanni Dantas Cassali, Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

Fone: +55 31 34092891

E-mail: cassalig@icb.ufmg.br

Resumo

Mucinas são glicoproteínas transmembranares presentes na superfície das células epiteliais e podem apresentar-se superexpressas em vários tipos de carcinomas, como exemplo a expressão de MUC-1 e MUC-16 em tumores mamários na mulheres. Apesar da alta incidência de neoplasias mamárias em cadelas, poucos trabalhos abordam a relação da expressão das mucinas e seu caráter prognóstico nesse tipo de câncer. O objetivo deste estudo foi analisar a dosagem sérica e a expressão tecidual de MUC-1 e MUC-16 em cadelas com carcinoma mamário metastático e avaliar a sua associação com a sobrevida das pacientes e com a expressão tumoral de receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), HER-2, Ki-67 e E-caderina. Foram coletadas 58 amostras sanguíneas sendo 20 amostras de cadelas híginas e 38 de cadelas diagnosticadas com carcinoma mamário e metástase linfonodal, submetidas à exérese tumoral seguido de tratamento quimioterápico. Foi realizada imunohistoquímica, para MUC-1, MUC-16, RE, RP, HER-2, Ki-67 e E-caderina. As dosagens séricas foram realizadas na exérese cirúrgica do tumor, durante a quimioterapia adjuvante e após o fim do tratamento. Como resultado, observou-se uma concentração significativamente maior ($p=0,001$) de MUC-1 sérico nas cadelas com carcinoma mamário e metástase linfonodal ($0,86\pm 0,10$) comparada às cadelas híginas ($0,36\pm 0,03$), o que não foi observado nos níveis de MUC-16 ($p>0,05$). A expressão de RE, RP, HER-2, Ki-67 e E-caderina, não apresentou associação com a expressão sérica e tecidual das mucinas ($p>0,05$). Por fim, observou-se uma diminuição significativa da expressão sérica de MUC-1 e MUC-16 após o tratamento quimioterápico com aumento no tempo de sobrevida. Estes achados sugerem que a expressão das mucinas seja independente da expressão dos fatores prognósticos RE, RP, HER-2, Ki67 e E-caderina, e que a dosagem sérica das mucinas pode ser utilizada na avaliação da resposta tumoral frente ao tratamento, sendo a MUC-1 uma ferramenta de auxílio na identificação de metástases em carcinomas mamários caninos.

Palavras-chave: canino, carcinoma, glândula mamária, MUC-1, MUC-16.

Abstract

Mucins are transmembrane glycoproteins that cover the surface of epithelial cells and may be overexpressed in several tumor types of epithelial origin, such as MUC-1 and MUC-16 in women with breast cancer. Although canine mammary neoplasms present a high incidence, few papers approach the relation between mucin expression and their prognostic value in this type of cancer. The aim of the present study was to evaluate and investigate the relation among serum levels and tissue expression of MUC-1 and MUC-16 in bitches diagnosed with metastatic mammary gland carcinomas, with overall survival and tumor expression for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), E-cadherin, HER-2, and Ki-67. Fifty-eight blood samples were collected, divided as 20 samples from healthy bitches and 38 from bitches diagnosed with mammary gland carcinomas with lymph node metastasis, submitted to tumor excision followed by chemotherapy. Immunohistochemistry for MUC-1, MUC-16, ER, PR, HER-2, Ki-67 and E-cadherin. Serum levels were assessed during surgical excision of the tumor, adjuvant chemotherapy and after treatment. Our results demonstrated a significantly higher concentration ($p=0.001$) of MUC-1 in bitches with mammary gland carcinomas and lymph node metastasis (0.86 ± 0.10) when compared to healthy bitches (0.36 ± 0.03), which was not observed in MUC-16 levels ($p>0.05$). Immunolabeling for ER, PR, HER-2, Ki-67 and E-cadherin, was not associated to mucin serum or tissue expression ($p>0.05$). Furthermore, a significant decrease in serum expression of MUC-1 and MUC-16 was observed following chemotherapy treatment with an increase in overall survival. The findings suggest that the mucin expressions is independent of the expression of the prognostic factors ER, PR, E-cadherin, HER-2, and Ki-67. Mucin serum levels may be used in the evaluation of tumor response regarding treatment and MUC-1 is an ancillary diagnostic tool in metastatic mammary gland carcinomas in the canine species.

Key-words: Canine, mammary gland, carcinoma, MUC-1, MUC-16.

Introdução

Mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular presentes na superfície das células epiteliais e são responsáveis por sua proteção e lubrificação (Hatrup and Glender, 2008). A família das mucinas (MUC) é composta por membros designados MUC1 a MUC21, e foram subclassificados em formas secretadas e transmembranares (Senapati *et al*, 2009). As mucinas secretadas formam uma barreira física fornecendo proteção para as células epiteliais que revestem as vias respiratórias, gastrointestinais e as superfícies ductais de órgãos tais como o fígado, coração, pâncreas e rim (Kufe, 2009). As mucinas transmembranares também contribuem para a proteção da célula e devido a sua localização tornam-se essenciais em muitos processos patológicos em que há interação célula epitelial - estroma, como em doenças inflamatórias, infecciosas, em cânceres e suas metástases (Dekker *et al*, 2002; Kufe, 2009).

As mucinas MUC-1 e MUC-16 são do tipo transmembranares e podem ser encontradas superexpressas em vários tipos de tumores de origem epitelial como, por exemplo, no câncer de mama (Duraisamy *et al*, 2006; Das Srustidhar, 2012).

A MUC-1, produto do gene *MUC-1*, é uma glicoproteína transmembranar de alto peso molecular (300-400 Kd) e também é conhecida como CA15.3 quando expressa no soro (Duffy *et al*, 2004). A avaliação sérica desta mucina é especialmente utilizada em pacientes com câncer de mama humano no acompanhamento da resposta ao tratamento (Souza 2002). Em relação à sua expressão tecidual, essa se limita à superfície apical da maioria das células do epitélio ductal normal, na transformação neoplásica a mucina passa a se localizar por toda a superfície celular. Por isso esta proteína tem sido extensivamente estudada e correlacionada com a progressão do câncer, metástases, pior resposta ao tratamento e piora na sobrevivência do paciente (Duraisamy *et al*, 2006; Horm & Schroeder, 2013).

A mucina MUC-16 ou antígeno do câncer 125 (CA125 como é nomeado quando encontrado no sangue) é o biomarcador sanguíneo rotineiramente utilizado para monitorar a progressão do câncer epitelial de ovário (Lakshmanan *et al*, 2012). Os níveis séricos de MUC-16/CA125 são rotineiramente monitorados em pacientes com câncer de ovário, e um aumento de uma concentração é um indicador prognóstico de recorrência do câncer (Thériault *et al*, 2011). O aumento dos níveis séricos de MUC-16 também é observado em outros tipos de adenocarcinomas, como o câncer de mama, no entanto, seu papel na progressão desse tumor

ainda não é bem esclarecida (Lakshmanan *et al*, 2012). Partes da MUC-16 possuem muitas semelhanças estruturais com MUC1, mucina previamente relacionada à carcinogênese por vários mecanismos. Dessa forma, pode-se supor que a maior presença de MUC-16 em células neoplásicas possa exercer uma série de funções em adenocarcinomas que são idênticas à MUC-1 (Thériault *et al*, 2011).

Em medicina veterinária, os tumores mamários estão entre os mais prevalentes na espécie canina, sendo 50% deles malignos (Ferreira *et al*, 2009). Sendo assim, vários estudos são direcionados à procura de ferramentas, como marcadores biológicos, que possam auxiliar no diagnóstico, tratamento e acompanhamento da evolução da doença (Dutra *et al*, 2004; Gama *et al*, 2008; Ferreira *et al*, 2009). Entretanto poucos trabalhos abordam a relação das mucinas e o câncer de mama canino (Nouwen *et al*, 2006; Oliveira *et al*, 2009, Marchesi *et al*, 2010; Campos *et al*, 2012), e nenhum trabalho relata a utilização do MUC-16 na espécie.

Sendo assim, nosso trabalho tem como objetivo avaliar a dosagem sérica e expressão tecidual de MUC-1 e MUC-16 em cadelas com carcinoma metastático da glândula mamária. Pretendemos ainda avaliar a associação da expressão dessas mucinas com a sobrevivência das pacientes e com a expressão de receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), HER-2, Ki-67 e E-caderina.

Material e Métodos

Animais e amostras

O estudo foi conduzido de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/ UFMG), sob protocolo nº 279/10.

Cinquenta e oito cadelas, independente da raça ou idade, provenientes do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG, foram incluídas no estudo. Cadelas diagnosticadas com carcinomas mamários com evidências de metástase para linfonodos regionais (axilares ou inguinais) foram selecionadas. Para avaliação de metástases regionais ou distantes, todas as pacientes foram submetidas a exames radiográficos do tórax e ultrassonografia abdominal, análise citológica de linfonodos regionais com consistência, forma e superfície alterada durante o exame clínico e análise histopatológica dos linfonodos axilares ou inguinais excisados durante a mastectomia. O procedimento cirúrgico selecionado foi de acordo com a

extensão da doença, drenagem linfática, do tamanho e localização da lesão, como descrito por Cassali *et al* (2014). Somente metástases para linfonodos regionais foram observadas em todos os casos analisados. Trinta dias após a cirurgia os animais deram início ao tratamento quimioterápico correspondendo a 4 ciclos de administração medicamentosa com intervalos de 21 dias. Os pacientes foram rotineiramente submetidos ao acompanhamento clínico, composto por avaliação clínica do animal e realização de hemograma, testes séricos de função renal e hepática, radiografias torácicas e ultrassonografias abdominais, sendo acompanhados neste período por coletas de amostras séricas para análise de ELISA.

Para o grupo controle, foram selecionadas cadelas sem evidência clínica de neoplasias mamárias, diagnosticadas na consulta de rotina por meio da anamneses, exame clínico e exames radiológicos (abdominal e tórax latero-lateral e ventro-dorsal).

Os tumores mamários caninos extirpados cirurgicamente foram coletados e fixados em formol neutro tamponado 10%, processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina, seccionados a 4 μ m e corados pela hematoxilina e eosina. Todos os casos foram avaliados e diagnosticados por dois veterinários patologistas (GDC e EF). Foram empregados critérios baseado nas características histopatológicas descritas por Misdorp *et al* (1999) e Cassali *et al* (2014).

Imunoensaio

Para a determinação da dosagem sérica de MUC-1 e MUC-16 foi utilizada a técnica de imunoensaio ELISA. Com a finalidade de observar possíveis variações na concentração das mucinas, 6 amostras de sangue foram obtidas de cada paciente nos seguintes momentos: no momento cirúrgico, durante os quatro ciclos de quimioterapia (intervalados em 21 dias) e na consulta de retorno 30 dias após o último ciclo de quimioterapia. Após cada coleta, as amostras sanguíneas foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos para separação do soro e armazenadas -20°C até a realização do ensaio.

Os imunoensaios foram realizados pela técnica de ELISA de acordo com o protocolo estabelecido pelo próprio fabricante. Foram utilizados anticorpos para detecção de MUC1 (Mab 695/ Mab 552) (CanAg - Fujirebio[®] Diagnostics, Inc., Sweden) e MUC16 (MabOv197/ MabOv185) (CanAg - Fujirebio[®] Diagnostics, Inc., Sweden). Todas as corridas foram realizadas em duplicata e com controles positivo e negativo (disponível no próprio *kit*) com

intervalo de concentração conhecido. Na ausência de valores de referências para os marcadores analisados na espécie canina, o ponto de corte para avaliar positividade ou negatividade da amostra foi estabelecido através da curva ROC.

Imuno-histoquímica

Para a análise imuno-histoquímica, secções de 4µm foram cortadas e colocadas sobre lâminas gelatinizadas. As lâminas foram desparafinadas, re-hidratadas em uma série de álcoois progressivamente diluídos, submetidas à recuperação antigênica e posteriormente incubadas em peróxido de hidrogênio 3% em metanol para o bloqueio da atividade da peroxidase endógena. Reagentes foram aplicados manualmente e a imunorreatividade foi visualizada através da exposição das lâminas por 10 minutos ao cromógeno diaminobenzidina (DAB Substrate System, Laboratory Vision) e contra-coradas com hematoxilina. Descrição dos anticorpos, diluições, antígeno retrieval, tempo de incubação e imunomarcação estão apresentadas na tabela 1.

Como controle positivo para imunomarcação de MUC-1 e MUC-16 foi avaliada a parte normal do tecido com marcação para parte apical das células ductais no epitélio mamário normal adjacente (Oliveira *et al*, 2009; Nouwen *et al*, 1990). Controles negativos foram obtidos pela substituição do anticorpo primário por PBS.

Avaliação Imuno-histoquímica

A imunomarcação para receptor de estrógeno (RE) e receptor de progesterone (RP) foi considerada positiva em casos com mais de 1% de marcação nuclear presente nas células tumorais (Hammond *et al*, 2010). O índice de proliferação foi calculado a partir da contagem de células com marcação nuclear positiva para Ki-67 (anti-MIB-1) em um total de 1000 células neoplásicas para cada lesão (Dutra *et al*, 2004). A imunomarcação para E-caderina foi avaliada semi-quantitativamente e considerados positivos os casos com mais de 10% das células tumorais com marcação membranar (Prasad *et al*, 2009). A imunexpressão de HER-2 foi avaliada segundo os critérios estabelecidos pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO/CAP), a qual considera positivos os casos em que há marcação membranar contínua, completa e de intensidade forte em mais de 10% das células epiteliais tumorais (Wolff *et al*, 2013).

A avaliação da expressão de MUC-1 foi realizada semi-quantitativamente e considerados os padrões de marcação citoplasmática, membranar e nuclear. A reatividade para MUC-1 foi considerada positiva quando pelo menos um destes componentes foi marcado. A avaliação da proteína foi realizada por estimativa de porcentagem de células reativas: (-) ausência de marcação; ($\leq 20\%$) marcação fraca; ($\geq 20 \leq 50\%$) marcação moderada; ($\geq 50\%$) marcação forte (Croce *et al*, 2003; Manuali *et al*, 2012). Para análise de associação e sobrevida, os casos com imunomarcação $\leq 20\%$ foram considerados negativos, e com resultados $\geq 20\%$ foram considerados positivos para MUC-1.

A avaliação de reatividade para MUC-16 foi graduada em uma escala de 0 a 3 (0 para ausência de marcação; (+) marcação fraca; (++) marcação moderada; (+++) marcação forte). A porcentagem de células tumorais que apresentaram imunoreatividade para MUC-16 seguiram o seguinte critério: 1 (0–25%); 2 (26–50%); 3 (51–75%) e 4 (76–100%) Os valores da intensidade de marcação e células imunoreativas foram multiplicadas para obtenção do valor final que variou de 0 a 12 (Chauhan *et al*, 2006). Para análise de associação e sobrevida, os casos com imunomarcação ≤ 2 foram considerados negativos, e com resultados > 2 foram considerados positivos para MUC-16.

Tempo de sobrevida

Os animais foram acompanhados durante 879 dias. O acompanhamento, realizado no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG, incluiu exérese tumoral, 4 ciclos de quimioterapia com intervalos de 21 dias e um retorno 30 dias após o fim da quimioterapia para exame clínico de rotina. Exames radiográficos do tórax e abdômen de todas as pacientes foram realizados para descartar metástases pulmonares.

O tempo de sobrevida foi definido (em dias) como sendo o período entre a data da exérese cirúrgica do tumor até a data de óbito do animal pela doença (*end point*). A causa da morte foi confirmada na necropsia. Os animais foram considerados censurados quando a causa da morte era desconhecida ou não relacionada com a doença.

Análise Estatística

As análises estatísticas e gráficos foram realizados com auxílio do *software* estatístico GraphPad Prism^d. Os testes D'Agostino & Pearson omnibus normality foram utilizados para determinar a normalidade dos dados. Para os dados paramétricos foram aplicados o teste de

análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK) ou T Student Test. Para correlações foram utilizados teste de Correlação de Pearson ou Spearman. As associações foram analisadas pelos testes Qui-quadrado ou Exato de Fisher. Para dados não-paramétricos os testes utilizados foram Mann Whitney e Wilcoxon. Os resultados foram considerados positivos quando $p < 0,05$.

A curva de sobrevida foi calculada usando a estimativa de Kaplan–Meier e a significância estatística foi determinada quando o valor de p foi menor que 0,05 pelo teste de log-rank. Os dados de sobrevida foram avaliados considerando os resultados positivos e negativos para a expressão sérica de MUC-1 e MUC-16.

Resultados

Foram obtidas 58 amostras de sangue no total, sendo 20 amostras de cadelas hígdas, sem evidências de neoplasias, selecionadas para o grupo controle e 38 amostras de cadelas diagnosticadas com câncer de mama e metástase para linfonodos. Tais pacientes foram submetidas à exérese tumoral e 4 ciclos de quimioterapia. Das 38 cadelas com câncer de mama, nenhuma apresentou evidências de metástase à distância, 94% (35/38) apresentaram mais de um tipo de lesão tumoral, sendo o carcinoma em tumor misto o tipo predominante.

Com relação às análises séricas coletadas no dia da cirurgia, as médias de concentrações para as dosagens de MUC-1 e MUC-16 foram respectivamente $0,83 \pm 0,10$ ng/mL e $2,86 \pm 0,61$ ng/mL. A dosagem de MUC-1 foi significativamente maior nas cadelas com câncer de mama e metástase em linfonodos ($0,83 \pm 0,10$) quando comparadas às dosagens do grupo controle ($0,36 \pm 0,03$) ($p = 0,001$). Na análise de MUC-16 não foi observado uma diferença significativa entre os grupos. No entanto, a análise isolada das dosagens séricas comparando a concentração de cada mucina no momento cirúrgico e no primeiro retorno pós-tratamento, evidenciou uma diminuição significativa na expressão sérica de ambos os biomarcadores ($p < 0,05$) (Fig. 1). A análise sérica das mucinas durante as 6 coletas realizadas (mastectomia, 4 ciclos de quimioterapia e primeiro retorno pós tratamento) está apresentada na Tabela 2. As concentrações de MUC-1 e MUC-16 não apresentaram correlação ($r = -0,226$, $p = 0,17$) e associação ($p = 0,74$) significativas.

A análise imuno-histoquímica para expressão de MUC-16 apresentou intensidade de imunomarcção 2+ em 58% (18/32) dos casos avaliados e porcentagem de células reativas 3+ para 59% (19/32) dos casos. Para marcação de MUC-1 os casos apresentaram padrões distintos de expressão, sendo o padrão citoplasmático de marcação o de maior prevalência (83,3 % dos casos) (Fig. 2) (Tab. 3).

Para a análise de associação da expressão das mucinas séricas e teciduais os animais foram divididos em grupos de baixa e alta expressão, com definição dos seguintes pontos de corte estabelecidos pela curva ROC: MUC-1 $\geq 0,50$ ng/mL e MUC-16 $\geq 2,70$ ng/mL para casos positivos, ambos com especificidade de 90%. Não foram observadas associações entre os níveis séricos de MUC-1 e MUC-16 e as expressões teciduais dessas mucinas nos carcinomas mamários em estudo.

A expressão dos biomarcadores RE, RP, E-caderina e HER-2 foram analisadas e as porcentagens de positividade estão apresentadas na Tabela 3. Para a análise de associação e comparação de médias, a expressão de RE, RP, E-caderina, HER-2 e Ki-67 foi separada em grupos positivos e negativos para expressão sérica de MUC-1 e MUC-16. Todos os casos positivos para MUC-1 apresentaram positividade para os receptores hormonais RE e RP (Tab. 4), no entanto esta associação não foi significativa ($p > 0,05$). Na comparação da expressão dos marcadores entre os grupos positivos e negativos para expressão sérica das mucinas não foi houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

Foi observada uma correlação positiva entre a expressão sérica de MUC-1 e expressão de RP ($r = 0,35$; $p = 0,05$) e negativa entre E-caderina e MUC-1 nuclear ($r = -0,435$; $p = 0,02$).

A mediana de sobrevida global foi de 403 dias (35-879 dias). Em nosso estudo, foi avaliada a correlação entre a expressão sérica de MUC-1 e MUC-16 e a sobrevida em amostras colhidas em dois momentos: mastectomia e 30 dias após o tratamento. As médias das amostras colhidas no momento da exérese tumoral não apresentaram correlação significativa com a sobrevida das pacientes ($p > 0,05$) (Fig. 3, A e B). No entanto, as amostras colhidas no pós-tratamento evidenciaram aumento significativo da sobrevida nos casos que apresentavam expressão sérica negativa para MUC-1 ($p = 0,008$) e MUC-16 ($p = 0,003$) (Fig. 3, C e D).

Na avaliação combinada da expressão sérica para ambos marcadores, foram identificados 6 casos positivos para MUC-1 e MUC-16 e 8 casos negativos para MUC-1 e MUC-16, sem no entanto apresentar correlação com a sobrevida (Figura 4A). Ao avaliar a combinação da expressão sérica e tecidual para as mucinas em estudo não foram observadas diferenças entre o tempo de sobrevida nos animais. (Fig. 4B, C e D).

Com base no padrão de expressão tecidual das mucinas avaliadas isoladamente, não houve diferença significativa no tempo de sobrevida entre os casos positivos e negativos para MUC-16 ou para MUC-1 (nos três padrões de imunexpressão: citoplasmática, membranar ou nuclear) ($p > 0,05$). (Fig. 5).

Discussão

A análise de marcadores tumorais séricos tem sido extensamente utilizada como ferramenta de auxílio para o acompanhamento da evolução do câncer na espécie humana. Em medicina veterinária uma variedade de técnicas tem sido utilizada a fim de identificar marcadores prognósticos para neoplasias, incluindo parâmetros clínicos, padrões histológicos, imunohistoquímicos, mutações genômicas entre outras. No entanto poucos trabalhos abordaram a avaliação de dosagens de proteínas séricas envolvidas com processos neoplásicos.

Em nosso trabalho, avaliamos as mucinas MUC-1 e MUC-16 e sua expressão sérica e tecidual em carcinoma mamário metastáticos em cadelas. Semelhante ao observado em estudos prévios, o tipo tumoral mais freqüente foi o carcinoma em tumor misto (Campos *et al*, 2012). Ao avaliar a expressão sérica de MUC-1, observou-se uma concentração significativamente maior nos casos que apresentavam tumores metastáticos quando comparados àqueles do grupo controle. Estes dados corroboram com estudos tanto na espécie humana quanto canina que apontam uma superexpressão sérica da proteína em pacientes diagnosticados com câncer de mama (Souza, 2002; Campos *et al*, 2012; Horm & Schroeder, 2013). Além disso, observou-se uma diminuição significativa na concentração desta proteína na dosagem após o tratamento quimioterápico em relação à concentração sérica no momento da mastectomia. Estes resultados sugerem uma possível utilização da dosagem de MUC-1 sérico como ferramenta no auxílio do diagnóstico do câncer de mama canino e acompanhamento da resposta tumoral frente ao tratamento. Na mulher, uma diminuição na concentração sérica de MUC-1 após o tratamento indica resposta terapêutica (Given *et al*, 2000; Duffy *et al*, 2004).

A expressão sérica de MUC-16 é observada em diversos tipos de neoplasias epiteliais na espécie humana, incluindo o câncer de mama (Duraisamy et al, 2006; Lakshmanan *et al*, 2012; Haridas *et al*, 2014). Em nosso trabalho, não foi observado uma diferença estatística significativa entre a expressão sérica de MUC-16 em cadelas com câncer de mama comparada às cadelas clinicamente saudáveis. No entanto, quando as dosagens foram realizadas apenas no grupo com câncer, observou-se uma diminuição significativa na concentração sérica da proteína após sessões de quimioterapia, sugerindo assim um sucesso na escolha terapêutica. Nouwen e colaboradores (1990) desenvolveram um estudo apresentando a expressão tecidual de MUC-16 na glândula mamária na espécie canina, no entanto não há relatos a respeito da análise deste marcador em amostras séricas de cadelas com câncer de mama.

Em relação à expressão tumoral para as mucinas em estudo, MUC-1 e a perda da localização apical da MUC-1 e a perda de polaridade para MUC-16 foram observadas concordando com trabalhos na espécie humana e canina (Van *et al*, 2007; Oliveira *et al*, 2009; Das Srustidhar, 2012; Haridas *et al*, 2014). Além disso, a positividade de expressão de MUC-16 em 94,1% dos casos analisados, superam a incidência de positividade para o câncer de mama na mulher que corresponde a 54% dos casos em geral (Lakshmanan *et al*, 2012).

Em nosso trabalho não foi observado uma associação entre a expressão das mucinas séricas e teciduais. Esse dado diverge de estudos realizados em mulheres que apontam uma expressão de MUC-1 e MUC-16 correspondente no soro e no tecido de pacientes com câncer de mama e endométrio respectivamente (Croce *et al*, 2003; Ginath *et al*, 2002) Por apresentar uma maior taxa de positividade das proteínas na expressão tecidual, estes dados sugerem que exista algum mecanismo que impede a saída eficaz das mucinas para a circulação sanguínea, dificultando assim sua detecção em imunoenaios.

Na espécie canina, receptores hormonais têm sido identificados em neoplasias mamárias benignas e malignas (Ferreira *et al*, 2009). De forma geral, os tumores de maior grau de malignidade, apresentam menor expressão destes receptores, e o mesmo pode ser observado em fases mais avançadas da doença, indicando certa evolução na independência tumoral (Sorenmo, 2003; Chang *et al*, 2009). No presente estudo, a expressão sérica de MUC-1 apresentou uma correlação positiva e significativa, à alta expressão tecidual de RP. Além disso, todos os casos positivos para MUC-1 sérico apresentaram positividade para RE, o que

está de acordo com trabalhos que apontam uma relação entre a expressão de MUC-1 e receptores de estrogênio no câncer de mama da mulher (McGuckin *et al*, 1995; Atoum *et al*, 2012). Este dado sugere que, apesar da transformação maligna celular com maior expressão de MUC-1, as células tumorais mantêm sua capacidade de diferenciação e expressão dos receptores hormonais.

Além dos receptores hormonais, a expressão da E-caderina também pode representar um fator prognóstico para os carcinomas mamários da mulher e da cadela (Queiroga *et al*, 2011). Em nossos resultados observamos uma diminuição significativa da expressão de E-caderina relacionada ao aumento da expressão de MUC-1 tecidual, sugerindo um maior potencial de transformação maligna das células neoplásicas. Perda da expressão de E-caderina está associada ao fenótipo maligno e pode estar relacionada ao potencial de invasão e disseminação tumoral (Matos *et al*, 2007; Gama *et al*, 2008).

A relação entre a agressividade tumoral e a expressão de MUC-1 e MUC-16 evidencia-se com a menor sobrevida das pacientes que apresentavam positividade para expressão sérica das mucinas após o tratamento quimioterápico. Estes resultados corroboram com estudos que apontam uma relação entre o aumento da expressão das mucinas e o menor tempo de sobrevida no câncer de mama na mulher (McGuckin *et al*, 1995; Hollingsworth & Wanson, 2004). Além disso, sugerem a possibilidade da dosagem de MUC-1 e MUC-16 após o tratamento quimioterápico como forma de avaliar a resposta do tumor frente ao tratamento.

Conclusão

Nossos resultados revelam que as expressões das mucinas MUC-1 e MUC-16 não estão associadas à expressão dos fatores prognósticos RE, RP, E-caderina e Ki67. Entretanto, observa-se uma elevação da concentração de MUC-1 sérico em cadelas portadoras de carcinomas metastáticos da glândula mamária, podendo sua dosagem auxiliar no diagnóstico da doença. Além disso, a concentração sérica de MUC-1 e MUC-16 diminuiu frente ao tratamento e essa diminuição está relacionada com o aumento do tempo de sobrevida do animal, sugerindo assim a utilização da dosagem sérica das mucinas na avaliação da respostaterapêutica.

Tabela 1: Reagentes para imunohistoquímica e métodos utilizados

Anticorpo	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação (T°)	Tempo de incubação (hs)
RE	1D5	Dako	1:20	PR (125°C)	1
PR	HPRA2	Neomarkers	1:20	PR (125°C)	1
Ki-67	Mib-1	Dako	1:25	PR (125°C)	1
E- caderina	NCH-38	Dako	1:60	BM (98°C)	1
MUC-1	E29	Dako	1:50	BM (98°C)	16
MUC-16	2B11B10	Dako	1:10	BM (98°C)	16
C erb B2	Polyclonal	Dako	1:100	BM (98°C)	16

RE: Receptor de estrogênio; RP: Receptor de Progesterona; PR: Pressurização (Pascal); BM: Banho- maria

Tabela 2: Avaliação sérica das mucinas MUC-1 e MUC-16 durante 6 momentos: mastectomia, durante os 4 ciclos de quimioterapia (intervalos de 21 dias) e primeiro retorno pós-tratamento.

Mucinas séricas (M ± Dp)		
Momento da coleta	MUC-1	MUC-16
Mastectomia	0.83± 0.10 (a)	2.86 ± 0.61 (c)
1° CQ	0.63± 0.08 (ab)	2.42± 0.72 (bc)
2° CQ	0.64± 0.08 (ab)	2.18± 0.56 (ab)
3° CQ	0.57± 0.08 (ab)	2.05± 0.63 (ab)
4° CQ	0.45± 0.07 (b)	1.54± 0.50 (a)
1° retorno	0.38± 0.07 (b)	1.65± 0.48 (a)

M= média, Dp= desvio padrão, CQ= ciclo de quimioterapia

Médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem entre si estatisticamente ao valor de $p < 0,05$.

Tabela 3: Imunoexpressão de MUC-1, MUC-16, RE, RP, E-caderina e HER-2 nos tumores mamários caninos.

Anticorpos		% de casos positivos (número de casos/ total)
MUC-1	citoplasmático	83.3 (30/36)
	nuclear	13.8 (5/36)
	membranar	58.3 (21/36)
MUC-16		94.1 (32/34)
RE		100 (33/33)
RP		88.2 (30/34)
E-caderina		48.5 (17/35)
HER-2		23.3 (7/30)

RE: Receptor de estrógeno; RP: Receptor de Progesterona

Tabela 4: Expressão de RP, RE, E-caderina, HER-2 e Ki-67 em tumores mamários caninos de acordo com a positividade ou negatividade para expressão sérica de MUC1 e MUC16.

Anticorpo	RP		RE		E-cad		HER-2		Ki-67 Índice de proliferação (%) (média±EP)	
	Sérica	+	-	+	-	+	-	+		-
MUC-1	+	23	0	23	0	16	6	4	14	36.7±7.0
	-	7	4	10	0	7	6	3	9	27.8±8.4
MUC-16	+	10	1	10	0	5	2	2	6	34,2 ±5.7
	-	20	3	23	0	17	7	5	17	28.6±6.7

EP= Erro padrão; RE: Receptor de estrógeno; RP: Receptor de Progesterona; E-cad: E-caderina; (+)= positivo; (-)= negativo.

Referências Bibliográficas

1. ATOUM M., NIMER N., ABDELDAYEM S., NASR H. Relationships among Serum CA15-3 Tumor Marker, TNM Staging, and Estrogen and Progesterone Receptor Expression in Benign and Malignant Breast Lesions. *Res Comm.* v.13, p. 857- 860, 2012.
2. CAMPOS L.C., LAVALLE G.E., ESTRELA-LIMA A., *et al.* CA15.3, CEA, and LDH in Dogs with Malignant Mammary Tumors. *J Vet Int Med.* v. 26, p. 1383–1388, 2012.
3. CASSALI G.D., LAVALLE G.E., FERREIRA E., *et al.* Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Braz J Vet Pat.* v. 7, p. 38- 69, 2014.
4. CHANG C.C., TSAI M.H., LIAO J.W., *et. al* Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. *J Am Vet Med Assoc.* v. 235,p. 391–396, 2009.
5. CHAUHAN S.C., SINGH A.P., RUIZ F., *et al.* Aberrant expression of MUC4 in ovarian carcinoma: diagnostic significance alone and in combination with MUC1 and MUC16 (CA125). *Mod. Pathol.*, v.. 19, p.1386–1394, 2006.
6. CROCE M.V., ISLA-LARRAIN M.T., RUA C.E., *et al.* Patterns of MUC1 Tissue Expression defined by an Anti-MUC1 Cytoplasmic Tail Monoclonal Antibody in Breast Cancer. *J Histochem Cytochem.* v. 51, p. 781–788, 2003.
7. DAS SRUSTIDHAR. Molecular Characterization of Human MUC16 (CA125) in Breast. *Annual summary Nebraska Univ at Omaha.*2012. Acessado em 01 de maio de 2015: <<http://oai.dtic.mil/oai/oai?verb=getRecord&metadataPrefix=html&identifier=ADA601644>>.
8. DEKKER J., ROSSEN J.W.A., BÜLLER H.A., EINERHAND A.W.C. The MUC family: an obituary. *Trends Biochem Sci.* V. 27, p.126–131, 2002.
9. DUFFY M., DUGGAN C., KEANE R., *et al.* High preoperative CA 15-3 concentrations predict adverse outcome in node-negative and node-positive breast cancer: Study of 600 patients with histologically confirmed breast cancer. *Clin Chem.* v. 50, p. 559–563, 2004.
10. DURAISAMY S., RAMASAMY S., KHARBANDA S., KUFU D. Distinct evolution of the human carcinoma-associated transmembrane mucins, MUC1, MUC4 AND MUC16. *Gene.* v. 373, p.28-34, 2006.
11. DUTRA A.P., GRANJA N.V.M., SCHMITT F.C., CASSALI G.D. cerbB-2 expression in canine mammary tumors Brazilian Journal of Medical and Biological Research. *Braz. J. Med.Biol. Res.*, v.37, p.1673-1681, 2004.
12. FERREIRA E., BERTAGNOLLI A., CAVALCANTI M.F., *et al.* The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Vet. Comp. Oncol.*, v.7, p.230- 235, 2009.
13. GAMA A., PAREDES J., GARTNER F., ALVES A., SCHMITT F. Expression of E-Cadherin, P-cadherin and b-catenin in canine malignant mammary tumours in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. *Vet. J.* v.177, p. 45–53, 2008.
14. GINATH S., MENCZER J., FINTSI Y., *et al.* Tissue and serum CA125 expression in endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer.* v. 12, p. 372–375, 2002.

15. GIVEN M., SCOTT M., GRATH J.P., GIVEN H.F. The predictive value of tumour markers CA15.3, TPS and CEA in breast cancer recurrence. *The Breast*. v. 9, p. 277- 280, 2000.
16. HAMMOND M.E.H., HAYES D.F., DOWSETT M., *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *J Clin Onc*. v. 28,p. 2784- 2798, 2010.
17. HARIDAS D., PONNUSAMY M.P., CHUGH S., *et al.* MUC16: molecular analysis and its functional implications in benign and malignant conditions. *FASEB J*. v. 28, p. 4183- 4199, 2014.
18. HATTRUP C.L., GENDLER S.J. Structure and Function of the Cell Surface (Tethered) Mucins. *Annu. Rev. Physiol*. v. 70, p. 431- 457, 2008.
19. HOLLINGSWORTH M.A., SWANSON B.J. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nature Rev Canc*. v. 4, p. 45- 60, 2004.
20. HORM T.M. and SCHROEDER J.A. MUC1 and metastatic cancer. *Cell Adh Migr*. v. 7, p. 187-198, 2013.
21. KUFU D.W. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nature*. v. 9, p.874- 885, 2009.
22. LAKSHMANAN I., PONNUSAMY M.P., DAS S., *et al.* MUC16 induced rapid G2/M transition via interactions with JAK2 for increased proliferation and anti-apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*. v. 31, p. 805–817, 2012.
23. MANUALI E., DE GIUSEPPE A., FELIZIANI F., *et al.* CA 15-3 cell lines and tissue expression in canine mammary cancer and the correlation between serum levels and tumour histological grade. *BMC Vet Res*, v. 8, p.1- 10, 2012 .
24. MARCHESI M.C., MANUALI E., PACIFICO E., *et al.* Cancer antigen 15/3: Possible diagnostic use in veterinary clinical oncology. Preliminary study. *Vet Res Commun*. v. 34, p.103–106, 2010.
25. MATOS A.J.F., LOPES C.C.C, FAUSTINO A.M.R, *et al.* E-cadherin,b-catenin,invasion and lymph node metastases incanine malignat mammary tumours. v. 115, p. 327- 334, 2007
26. MCGUCKIN M.A., WALSH M.D., HOHN B.G. et al. Prognostic significance of muc1 epithelial mucin expression in breast cancer. *Human Pathol.*, v.26, p. 432- 439, 1995.
27. MISDORP W, ELSE RW, HELLMEN E, LIPSCOMB TP: Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat, 2nd series, vol VII, pp. 1–59. AFIP, Washington DC, 1999.
28. NOUWEN E.J., DAUWE S., DE BROE E.M. Occurrence of the mucinous differentiation antigen CA125 in genital tract and conductive airway epithelia of diverse mammalian species (rabbit, dog, monkey). *Differentiation*. v. 45, p. 192- 198, 1990.
29. NOUWEN E.J., DAUWE S., DE BROE M.C. Occurrence of the mucinous differentiation antigen CA125 in genital tract and conductive airway epithelia of diverse mammalian species (rabbit, dog, monkey). *Differentiation*. v.45, p.192–198, 2006.

30. OLIVEIRA J.T., PINHO S.S., MATOS A.J., *et al.* MUC1 expression in canine malignant mammary tumours and relationship to clinicopathological features. *Vet J.* v.182, p. 491–493, 2009.
31. PRASAD C.P, RATH G., MATHUR S., *et al.* Expression analysis of E-cadherin, Slug and GSK3 β in invasive ductal carcinoma of breast. *BMC Cancer.* v. 9, p. 325- 335, 2009.
32. QUEIROGA F.L., RAPOSO T., CARVALHO M.I., *et al.* Canine Mammary Tumour Model to Study Human Breast Cancer. *In vivo.* v.25, p. 455- 466, 2011.
33. SENAPATI S., DAS S., BATRA S.K. Mucin-interacting proteins: from function to therapeutics. *Cell Press.* v. 35, p. 236- 245, 2009.
34. SORENMO K, 2003. Canine mammary gland tumors. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 33, 573- 596.
35. SOUZA JV. Marker mucinous cancer associated. *Rev. AMRIGS.* v. 46, p. 70–83, 2002.
36. THERIAULT C., PINARD M., COMAMALA M., *et al.* MUC16 (CA125) regulates epithelial ovarian cancer cell growth,tumorigenesis and metastasis. v. 121, p. 434- 443, 2011.
37. VAN D. V. B., ROOS M.A.J., PETERSE J.L., *et al.* The expression pattern of MUC1 (EMA) is related to tumour characteristics and clinical outcome of invasive ductal breast carcinoma . *Histopathol.*v. 51, p.322–335, 2007.
38. WOLFF A.C., HAMMOND M.E.H., HICKS D.G., *et al.* Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. v.31, p. 3997- 4014, 2013.

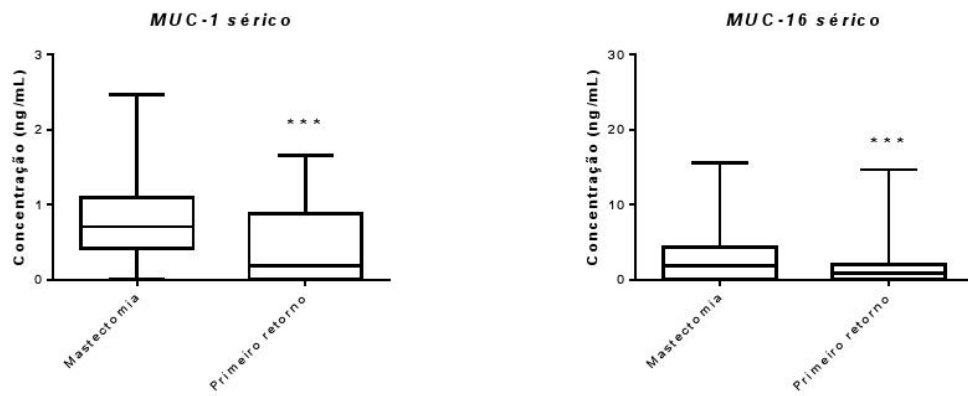


Figura 1: Gráfico Box plot representando a avaliação sérica das mucinas MUC-1 e MUC-16 no momento da mastectomia e 30 dias pós-tratamento. MUC-1 $p=0,003$; MUC-16 $p=0,0016$.

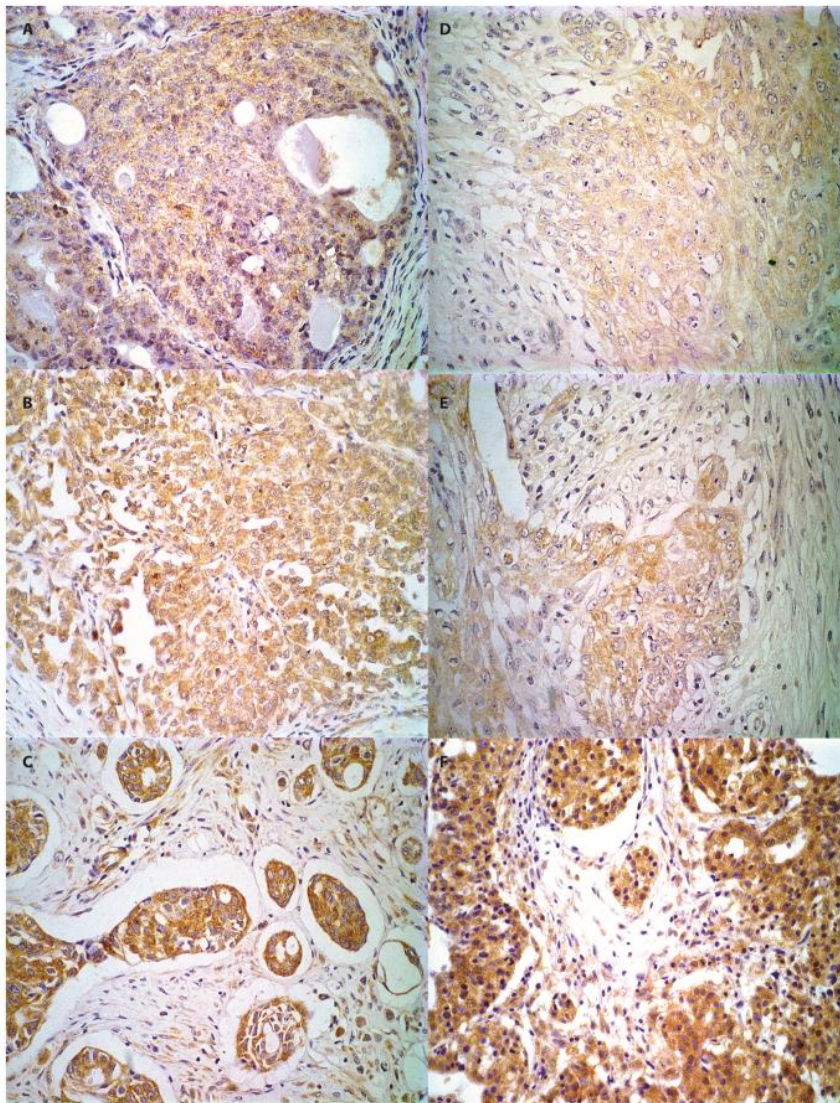


Figura 2: Fragmento de carcinoma mamário canino. Padrão de imunomarcção para MUC-1 e MUC-16. A, expressão citoplasmática positiva (+) para MUC-1, 40x. B, expressão citoplasmática positiva (++) para MUC-1, 40x. C, expressão citoplasmática positiva (+++) para MUC-1, 40x. D, expressão citoplasmática positiva (+) para MUC-16, 40x. E, expressão citoplasmática positiva (++) para MUC-16, 40x. F, expressão citoplasmática positiva (+++) para MUC-16, 40x.

	CN	MD	TOTAL	MED	B	CN	MD	TOTAL	MED
Negativo	11	13	24	508	Negativo	15	9	24	404
Positivo	9	19	28	375	Positivo	4	12	16	275

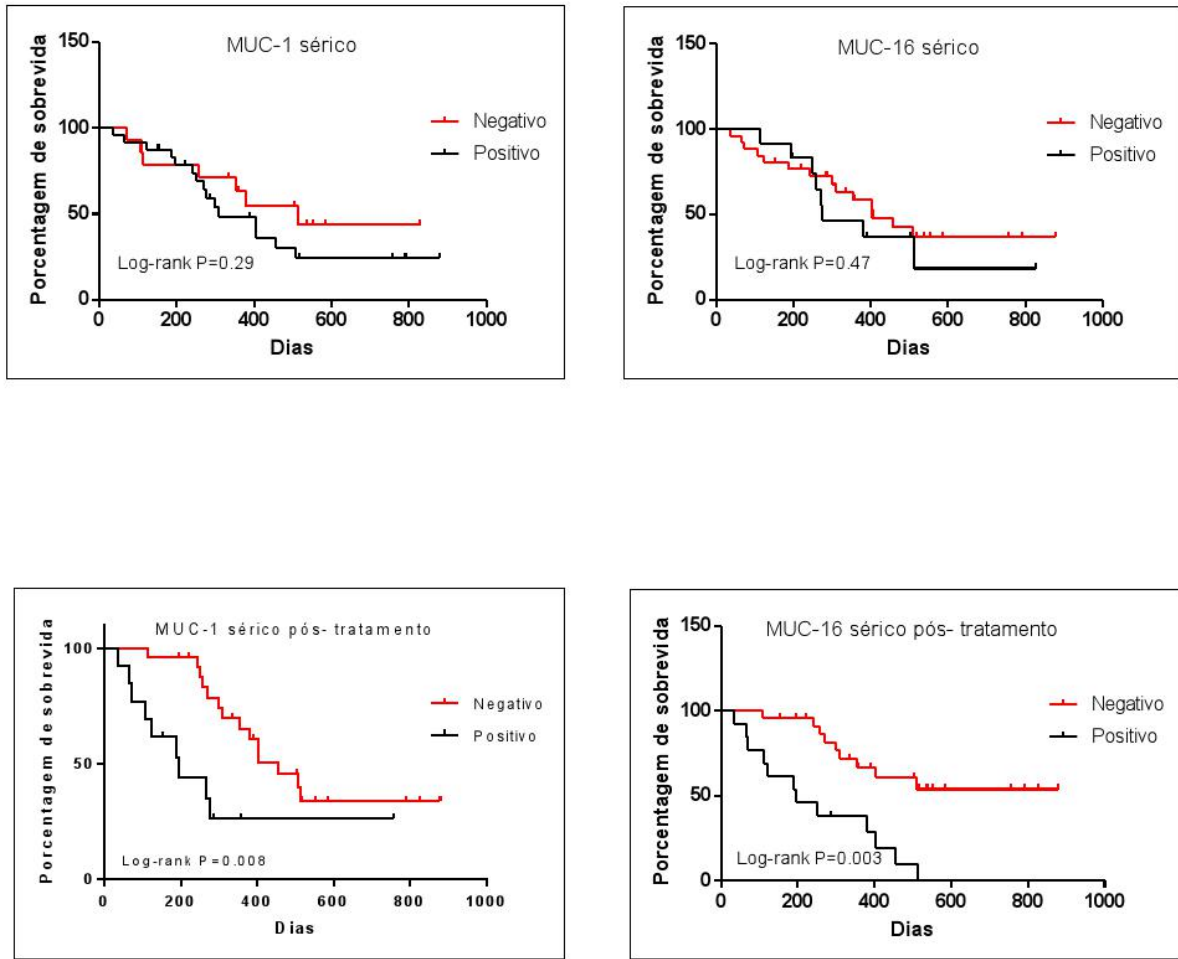


Figura 3: Curvas de Kaplan-Meier para análise de sobrevivência de cadelas com câncer de mama e metástase linfonodal com relação à expressão de MUC-1 e MUC-16: expressão sérica de MUC-1 (A) e MUC-16 (B) no momento da exérese tumoral. Expressão sérica de MUC-1 (C) e MUC-16 (D) no primeiro retorno após tratamento quimioterápico. CN: pacientes censurados; MD: pacientes mortos pela doença; TOTAL: total de número de casos; MED: mediana de sobrevivência (em dias).

	CN	MD	TOTAL	MED	P_D	CN	MD	TOTAL	MED
Negativo	5	3	8	363	Negativo	5	4	9	513
Positivo	2	4	6	270		Positivo	6	3	9

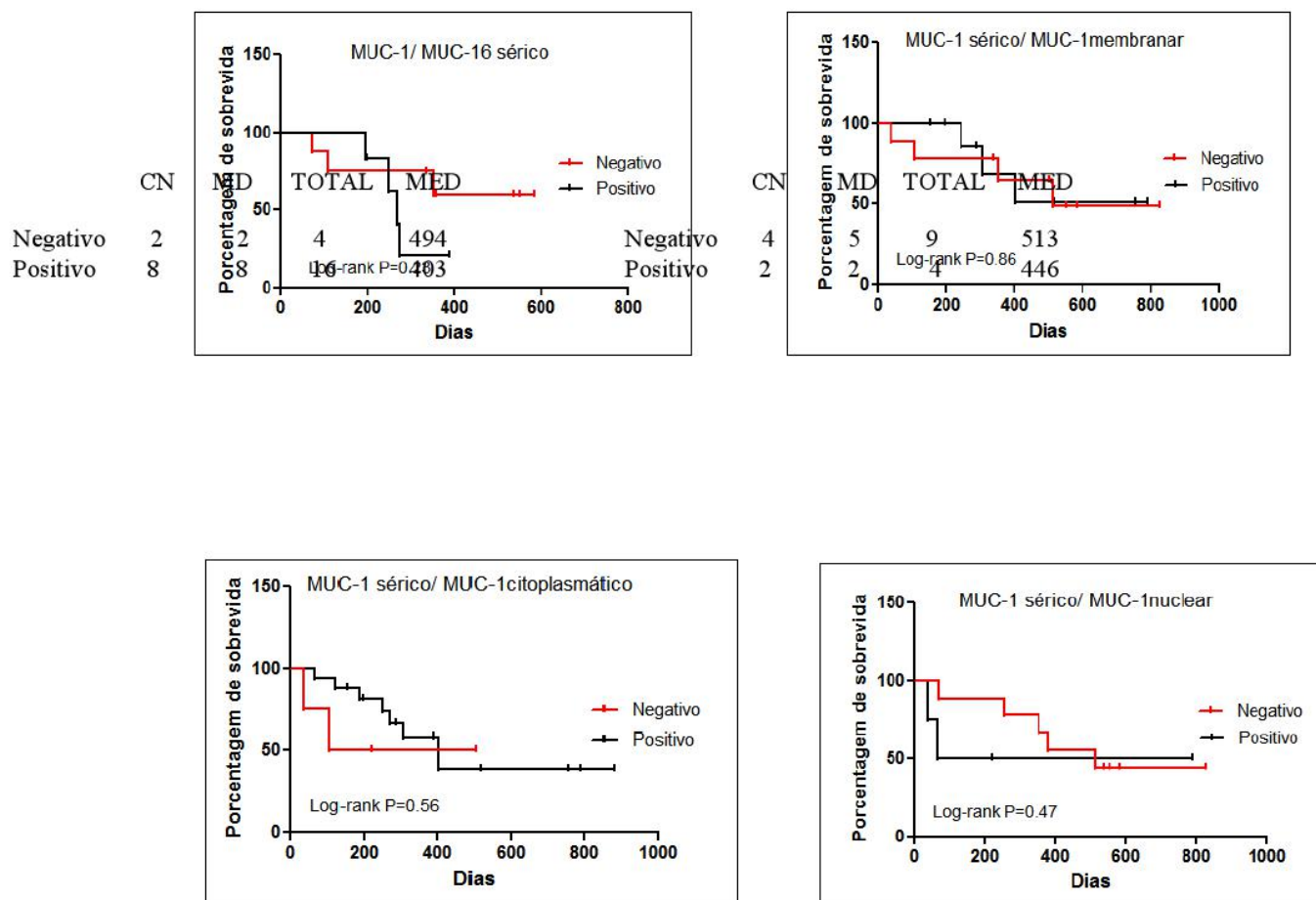
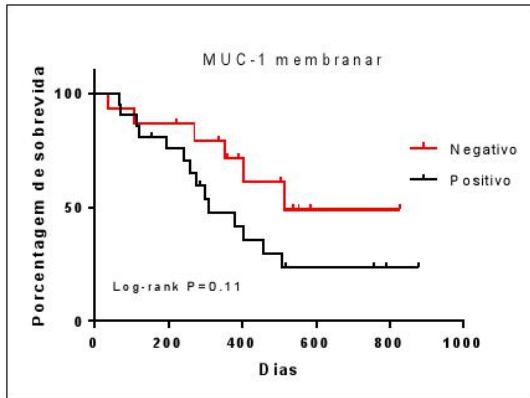
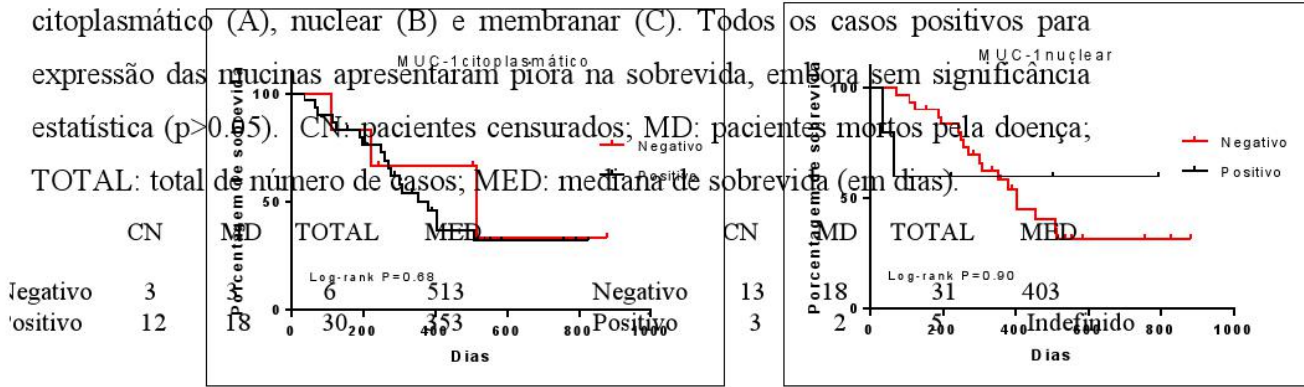


Figura 4: Curvas de Kaplan-Meier para análise de sobrevivência de cadelas com câncer de mama e metástase linfonodal com relação à expressão de MUC-1 e MUC-16. Sobrevivência segundo avaliação combinada da expressão sérica MUC-1/MUC-16 (A). Sobrevivência segundo avaliação combinada da expressão sérica de MUC-1 e sua expressão tecidual nos diferentes padrões: membranar (B), citoplasmático (C) e nuclear (E). Todos os casos positivos para expressão das mucinas evidenciaram uma piora na sobrevivência, embora sem significância estatística ($p > 0.05$). CN: pacientes censurados; MD: pacientes mortos pela doença; TOTAL: total de número de casos; MED: mediana de sobrevivência (em dias).

Figura 5: Curvas de Kaplan–Meier para análise de sobrevida de cadelas com câncer de mama e metástase linfonodal com relação à expressão de MUC-1. Sobrevida segundo a expressão tecidual de MUC-1 nos diferentes padrões de marcação:



	CN	MD	TOTAL	MED
Negativo	11	13	24	403
Positivo	4	2	6	325

7. CONCLUSÕES GERAIS

- Foi possível analisar a expressão sérica de MUC-1, MUC-16 e HER-2 em cadelas portadoras de carcinoma mamário metastático por meio da técnica de imunensaio (ELISA), evidenciando-se que a concentração sérica de MUC-1 está significativamente aumentada no grupo de cadelas com câncer de mama metastático.
- As concentrações séricas de MUC-1, MUC-16 e HER-2 diminuem com o avanço do tratamento quimioterápico e relacionam-se com o aumento do tempo de sobrevivência do animal.
- Os tumores analisados apresentaram comportamentos distintos para expressão de MUC-1, sendo o padrão citoplasmático o predominante. Além deste marcador, observou-se também uma superexpressão para MUC-16, RE e RP e baixa expressão para HER-2, Ki67 e E-caderina.
- A ausência de superexpressão para HER-2 nos carcinomas mamários está associada à baixa expressão sérica da proteína. Não foram observadas associações entre as expressões tecidual e sérica de MUC-1 e MUC-16 para os diferentes métodos analíticos (Imunohistoquímica e ELISA).
- Não foram identificadas associações entre a expressão sérica e tecidual de MUC-1, MUC-16 e HER-2 e a expressão dos marcadores prognósticos RE, RP, Ki67 e E-caderina em carcinomas mamários caninos metastáticos.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base na alta incidência de tumores mamários caninos, pesquisas na área de medicina veterinária têm dado uma atenção especial na avaliação da expressão de marcadores tumorais que auxiliem no diagnóstico precoce e acompanhamento da doença. Podemos confirmar isto pela própria história do nosso grupo com a padronização de protocolos para o diagnóstico clínico, abordagem cirúrgica, padronização de critérios para avaliação macro e microscópica dos tumores, estudo de marcadores prognósticos e preditivos e tratamento quimioterápico.

Como se imagina, o ideal seria termos uma substância ou técnica suficientemente específica e sensível para detectar a existência de uma neoplasia no seu início, onde as chances de cura após o tratamento são altas. Dosagens de testes séricos são procedimentos pouco invasivos, relativamente práticos, financeiramente viáveis e possibilita o acompanhamento da paciente com a realização de coletas periódicas. Atualmente, a única forma de avaliar o sucesso terapêutico são avaliações realizadas após o tratamento quimioterápico.

Em humanos, alguns marcadores tumorais já são estabelecidos e utilizados na rotina da medicina oncológica, tanto para auxílio no diagnóstico e acompanhamento do câncer de mama, como para direcionamento terapêutico. O presente estudo objetivou avaliar em cadelas com carcinoma mamário a expressão sérica e tecidual de marcadores tumorais envolvidos com o câncer de mama humano.

Nosso trabalho evidenciou a possibilidade de detecção da expressão sérica e tecidual dos marcadores MUC-1, MUC-16 e HER-2. Entre os principais resultados, observamos uma correlação entre o aumento da concentração sérica de MUC-1 e o avanço do câncer de mama na cadela sugerindo que, dentre os biomarcadores avaliados no estudo, a análise sérica de MUC-1 é a melhor para auxiliar na avaliação da progressão da doença metastática.

Outro achado importante foi a diminuição da expressão sérica de MUC-1, MUC-16 e HER-2 após o tratamento, observando-se associação com o aumento da sobrevida das pacientes, o que sugere a avaliação sérica desses marcadores como fator prognóstico importante no acompanhamento durante o tratamento oncológico. Para este acompanhamento as dosagens devem ser comparadas com os níveis séricos obtidos na coleta do dia da cirurgia sendo, portanto, uma abordagem individualizada.

Nossas pesquisas indicam a potencial inserção, em clínicas veterinárias, de dosagens séricas do marcador tumoral MUC-1 no auxílio da avaliação do câncer de mama metastático e dosagens seriadas de MUC-1, MUC-16 e HER-2 para o acompanhamento da evolução da doença frente ao tratamento. Esses achados, similares ao observado em estudos humanos, reforçam as propostas de utilização da cadela como modelo comparativo para estudo do câncer de mama humano, auxiliando na compreensão da doença metastática e avaliação de novas terapêuticas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGHA-HOSSEINI, F.; MIRZAII-DIZGAH, I.; RAHIMI, A. Correlation of serum and salivary CA15-3 levels in patients with breast cancer. *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal*. v. 14, n. 10, p.521-524, 2009.
2. AHERN T.E., BIRD R.C., ALLISON E., *et al* Expression of the oncogene c-erbB2 in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. *American Journal of Veterinary Research*,v. 57, n.5, p.693-696, 1996.
3. ALMEIDA, J.R.C.; NUBIA DE LIMA PEDROSA, N.L ; LEITE, J.B. ; *et al*. Marcadores tumorais : Revisão da literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia*. Rio de Janeiro, v. 53, n. 3, p. 305 – 316, 2007.
4. ANDRIOLO, A. Marcadores tumorais bioquímicos circulantes. In: 1º Congresso Nacional de Saúde da Faculdade de medicina da UFMG, 2008. Faculdade de Medicina da UFMG. Disponível em: < <http://www.ufmg.br/congressodesaude/>> Acesso em: 01/09/2010.
5. ANTUOFERMO E, MILLER MA, PIRINO S, *et al*. Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs a model of breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. v. 16, n. 11, p. 2247–2256, 2007.
6. BAST, R.C.; BADGWELL, D.; LU, Z. *et al*, New tumor markers: CA125 and beyond. *International Journal of Gynecological Cancer*. v. 15, p. 274–281, 2005.
7. BEARS, J.J., SCHULMAN, F.Y., CARTER, D. Histologic, immunohistochemical and clinical features of 27 mammary tumors in 18 male dogs. *Vet Pathol*, v.49, p. 602-607, 2012.
8. CAMPOS L.C., LAVALLE G.E., ESTRELA-LIMA A., *et al*. CA15.3, CEA, and LDH in Dogs with Malignant Mammary Tumors. *J Vet Int Med*. v. 26, p. 1383–1388, 2012.
9. CASSALI G.D., LAVALLE G.E., FERREIRA E., *et al*. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Braz J Vet Pat*. v. 7, p. 38- 69, 2014.
10. CASSALI, G. D. *Estudo morfológico, imuno-histoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela - aspectos comparativos com neoplasias da mama humana*. 2000. 73p. Tese (Doutorado – Ciência Animal)- Universidade Federal de Minas Gerais – Escola de Veterinária, Belo Horizonte.
11. CASSALI, G. D. Patologias da glândula mamária. In: NASCIMENTO, E.F. SANTOS, R.L. *Patologia da Reprodução dos animais domésticos*. v. 2, n.2, 2003. p. 119 – 133.
12. CASSALI, G. GOBBI H, MALM C, SCHMITT F.C. Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative features with human tumours. *Cytopathology*. v. 18, n. 3, p. 191-6, Jun 2007.

13. CAVALCANTI, M.F. *Fatores prognósticos na abordagem clínica e histopatológica dos carcinomas mamários de cadelas: estadiamento TNM e Sistema de Nottingham*. 2006 b. 105f Dissertação (Mestrado em Patologia)- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
14. CAVALCANTI, M.F.; CASSALI, G.D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas- revisão. *Revista Clínica Veterinária*, ano XI, n. 61, p. 56- 63, 2006.
15. CHANG C.C., TSAI M.H., LIAO J.W., *et al* Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. *J Am Vet Med Assoc*, v. 235,p. 391–396, 2009.
16. CHAUHAN S.C., SINGH A.P., RUIZ F., *et al*. Aberrant expression of MUC4 in ovarian carcinoma: diagnostic significance alone and in combination with MUC1 and MUC16 (CA125). *Mod. Pathol.*, v. 19, p.1386–1394, 2006.
17. CHEUNG,K.L.; GRAVES,C.R.L.; ROBERTSON,J.F.R. Tumour marker measurements in the diagnostics and monitoring of breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*. v. 26, p. 91- 102, 2000.
18. CROCE M.V., ISLA-LARRAIN M.T., RUA C .E., *et al*. Patterns of MUC1 Tissue Expression defined by an Anti-MUC1 Cytoplasmic Tail Monoclonal Antibody in Breast Cancer. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. v. 51, p. 781–788, 2003.
19. DALECK, C.R.; FRANCESCHINI P.H.; ALESSI A.C.; *et al*. Aspectos clínicos e cirúrgicos do tumor mamário canino. *Ciência Rural*. v. 28. n. 1, p. 95- 100, 1998.
20. DAS SRUSTIDHAR. Molecular Characterization of Human MUC16 (CA125) in Breast. Annual summary Nebraska Univ at Omaha.2012. Acessado em 01 de maio de 2015: <
<http://oai.dtic.mil/oai/oai?verb=getRecord&metadataPrefix=html&identifier=ADA601644>>.
21. DECKER J., ROSSEN J.W.A., BÜLLER H.A., EINERHAND A.W.C. The MUC family: an obituary. *Trends in Biochemical Sciences*. V. 27, p.126–131, 2002.
22. DISIS M.L., PUPA S.M., GRALOW J.R. *et al* . High-Titer HER-2/neu Protein-Specific Antibody Can Be Detected in Patients With Early-Stage Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. v.15, n. 11, p. 3363-3367, 1997.
23. DUTRA A.P., GRANJA N.V.M., SCHMITT F.C., CASSALI G.D. cerbB-2 expression in canine mammary tumors Brazilian Journal of Medical and Biological Research. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.37, p.1673-1681, 2004.
24. EGENVALL, A., BONNETT, B.N., OHAGEN, P., *et al*. 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*, v. 69, p. 109–127, 2005.

25. ESCOBAR H.M., BECKER K., BOSTOCK D.E., O'FARRELL E. The canine ERBB2 gene maps to a chromosome region frequently affected by aberrations in tumors of the dog (*canis familiaris*), *Cytogenetic Cell Genetics*. v. 94, p.194- 195, 2001.
26. FARZADNIA M., MEIBODI N.T., SHANDIZ F.H., *et al.* Evaluation of HER2/neu oncoprotein in serum and tissue samples of women with breast cancer: Correlation with clinicopathological parameters. *Breast*, v.19, p. 489-492, 2010.
27. FAUSTINO,A.M.R.; VAN GARDEREN, E.; SCHALKEN,J.A.; NEDERBRACKT,H. Tenascin expression in normal, hiperplastic, dysplastic and neoplastic canine mammary tissue. *Journal of Comparative Pathology*. v.126, n.1, p.1-8, 2002.
28. FERREIRA E., BERTAGNOLLI A., CAVALCANTI M.F., *et al.* The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, v.7, p.230- 235, 2009.
29. FERREIRA E., GOBBI H., SARAIVA B.S., CASSALI G.D. Histological and Immunohistochemical Identification of Atypical Ductal Mammary Hyperplasia as a preneoplastic marker in dog. *Veterinary Pathology*. v. 49, n. 2, p. 322- 329, 2012.
30. GAMA A., PAREDES J., GARTNER F., ALVES A., SCHMITT F. Expression of E-Cadherin, P-cadherin and b-catenin in canine malignant mammary tumours in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. *Veterinary Journal*. v.177, p. 45-53, 2008.
31. GILBERTSON, S. R.; KURZMAN, I. D.; ZACHRAU, R. E. *et al.* Canine mammary epithelial neoplasm: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary Pathology*. v. 20, p. 127-142, 1983.
32. GION, M.; DAIDONE, M.G. Circulating biomarkers from tumour bulk to tumour machinery: promises and pitfalls. *European Journal of Cancer*. v. 40, p. 2613- 2622, 2004.
33. GUTIERREZ C., SCHIFF R. HER2: Biology, Detection, and Clinical Implications. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*.v. 135, n. 1, p. 55-62, 2011.
34. HAMMOND M.E.H., HAYES D.F., DOWSETT M., *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. v. 28,p. 2784- 2798, 2010.
- 34.HARRIS, L.; FRITSCHKE, H.; MENNEL, R. *et al.* American Society of Clinical Oncology 2007: Update of recommendations for the use tumor markers in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. v. 25, n. 33, p.5287- 5312, 2007.
- 35.HELGUERO L.A., LINDBERG K., GARDMO C. *et al* Different Roles of Estrogen Receptors A and B in the Regulation of E-Cadherin Protein Levels in a Mouse Mammary Epithelial Cell Line. *The Journal of Cancer Research*. v. 68, n. 21, p. 8697- 8704, 2008.

36. HOLLINGSWORTH M.A., SWANSON B.J. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nature Reviews Cancer*. v. 4, p. 45- 60, 2004.
37. HORM T.M., SCHROEDER J.A. MUC1 and metastatic cancer. *Cell Adhesion & Migration*. v. 7, p. 187-198, 2013.
38. HORTA R.S., LAVALLE G.E., CUNHA R.M.C, *et al.* Influence of Surgical Technique on Overall Survival, Disease Free Interval and New Lesion Development Interval in Dogs with Mammary Tumors. *Advances in Breast Cancer Researchs*. v.3, p. 38-46, 2014.
39. HSU W.L., HUANG H.M., LIAO J.W., WONG M.L., CHANG S.C. Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. *The Veterinary Journal*, v. 180, n. 1, p. 116-122, 2009.
40. KANDIOLER-ECKERSBERGER D., LUDWIG C., MARGARETHE RUDAS M. *et al.* TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. *Clinical Cancer Research*. v. 6, n. 1, p. 50-56, Jan 2000.
41. KHANNA C., LINDBLAD- TOH, K., LONDON C., *et al.* The dog as a cancer model. *Nature Biotechnology*. V. 24, n. 9, p. 1065- 1066, 2006.
42. KOSHIDA K., UCHIBAYASHI T., YAMAMOTO H., *et al.* A potential use of a monoclonal antibody to placental alkaline phosphatase (PLAP) to detect lymph node metastases of seminoma. *Journal of Urology*. v. 155, n. 1, p. 337-41, Jan 1996.
43. KUFU D.W. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nature*. v. 9, p.874-885, 2009.
44. LAKSHMANAN I., PONNUSAMY M.P., DAS S., *et al.* MUC16 induced rapid G2/M transition via interactions with JAK2 for increased proliferation and anti-apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*. v. 31, p. 805–817, 2012.
45. LAS MULAS J. M., REYMUNDO C. Animal models of human breast carcinoma: canine and feline neoplasms. *Reviews Oncology*. v. 2, n. 6, p. 274-281, 2000.
46. LEBEAU A. L'âge du chien et celui de l'homme essai de statistique sur la mortalité canine. *Bulletin de l'Academie Veterinaire*. v. 26, p. 229-232, 1953.
47. LEVENSON V.V. Biomarkers for early detection of breast cancer: What, when, and where? *Biochimica et Biophysica Acta* n. 1770, p. 847- 856, 2007.
48. LINDBLOM A., LILJEGREN A. Regular review: tumour markers in malignancies. *British Medical Journal*. v. 320, n. 7232, p. 424-427, Feb. 2000.
49. MAGRO A.M., BENTO R.S. Marcadores tumorais. *Medicina Interna*. v. 4, n. 3, p. 189- 196, 1997.

50. MANUALI E., DE GIUSEPPE A., FELIZIANI F., *et al.* CA 15-3 cell lines and tissue expression in canine mammary cancer and the correlation between serum levels and tumour histological grade. *BMC Veterinary Research*, v. 8, p.1- 10, 2012.
51. MARCHESI M.C., MANUALI E., PACIFICO E., *et al.* Cancer antigen 15/3: Possible diagnostic use in veterinary clinical oncology. Preliminary study. *Veterinary Research Communications*. v. 34, p.103–106, 2010.
52. MARTIN DE LAS MULAS J., ORDA S.J., MILLA N.Y. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Research and Treatment*. v.80, p.363–367, 2003.
53. MATOS A.J.F., LOPES C., CARVALHEIRA J., *et al.* E-cadherin expression in canine malignant mammary tumours: relationship to other clinico-pathological variables. *Journal of Comparative Pathology*. v. 134, p. 182-189, 2006.
54. MISDORP, W. Malignant Mammary tumors in the dog and cat. In: MOUTON, D.J. *Tumors in Domestic Animals*. 4. ed. Iowa State press, 2002, p.589-606.
55. MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E. *et al.* Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. 2nd Series. v. VII. Washington DC, *Arm. Forc. Inst. Pathol.* American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology. p. 1-59, 1999.
56. MOLINA R.; BARAK V., VAN DALEN A., *et al.* Tumor markers in breast cancer- European Group on Tumor Markers recommendations. *Tumour Biology*, v. 26, n. 6, p. 281-93, 2005.
57. MOULTON, J. E. *Tumors in domestic animals*. 3 ed. Berkeley: University of California, 1990. p. 346- 369.
58. NOUWEN E.J., DAUWE S., DE BROE M.C. Occurrence of the mucinous differentiation antigen CA125 in genital tract and conductive airway epithelia of diverse mammalian species (rabbit, dog, monkey). *Differentiation*. v.45, p.192–198, 2006.
59. NOVOSAD, C.A. Principles of treatment for mammary gland tumors. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, v. 8, n. 2, p. 107- 109, 2003.
60. O'BRIEN TJ, BEARD JB, UNDERWOOD LJ,*et al.* The CA125 gene: an extracellular super- structure dominated by repeat sequences. *Tumour Biology*. v. 22, n. 6, p. 348–366, 2001.
61. OLIVEIRA J.T., PINHO S.S., MATOS A.J., *et al.* MUC1 expression in canine malignant mammary tumours and relationship to clinicopathological features. *The Veterinary Journal*. v. 182, p. 491-493, 2009.


62. OWEN L. N. A comparative study of canine and human breast cancer. *Investigative Cell Pathology*. v. 2, p. 257-275, 1980.
63. PARK B.W., OH J.W., KIM J.H., *et al.* Preoperative Ca15-3 and CEA serum levels as predictor for breast cancer outcomes. *Journal of Oncology*, Oxford, v. 19, n. 4, p. 675-681, April 2008.
64. PELETEIRO, M.C. Tumores mamários na cadela e na gata. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.89, p.10-34, 1994.
65. PEÑA L., GAMA A.,GOLDSCHMIDT M.H., *et al.* Canine Mammary Tumors: A Review and Consensus of Standard Guidelines on Epithelial and Myoepithelial Phenotype Markers, HER2, and Hormone Receptor Assessment Using Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*. v.13, p.1-19, 2013.
66. PEREZ- VILAR J., HILL R.L. The Structure and Assembly of Secreted Mucins. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 274, p. 31751–31754, 1999.
67. PEREZ-ALENZA M.D., PEÑA L., DEL CASTILLO N., *et al.* Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumors. *Journal of Small Animal Practice*. v. 41, p. 287-291, 2000.
68. PHILIBERT J.C., SNYDER P. W., GLICKMAN, N. *et al* Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 17, p. 102-106, 2003.
69. PRASAD C.P, RATH G., MATHUR S., *et al.* Expression analysis of E-cadherin, Slug and GSK3 β in invasive ductal carcinoma of breast. *BMC Cancer*. v. 9, p. 325- 335, 2009.
70. PRESS M.F., SLAMON D.J., FLOM K.J., *et al.* Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *Journal of Clinical Oncology*, v.20,n. 14, p. 3095-3105, 2002.
71. QUEIROGA F., LOPES C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos fatores de prognóstico. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. v. 97, n. 543, p. 2119-2127, 2002.
72. QUEIROGA F.L., RAPOSO T., CARVALHO M.I, *et al.* Canine Mammary Tumours as a Model to Study Human Breast Cancer: Most Recent Findings. *In vivo*. v. 25, p.455-466, 2011.
73. RESSEL L., PULEIO R., LORIA G.R., *et al.* HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. *Research in Veterinary Science*. v. 94, n.2, p.299-305, 2013.

74. SAINI K.S., AZIM H.A., METZGER-FILHO, *et al.* Beyond trastuzumab: new treatment options for HER-2-positive breast cancer. *The Breast*, v. 20, n. 3, p. 20–27, 2011.
75. SCHNEIDER R. Comparison of Age, sex and incidence rates in human and canine. *Cancer*. v. 26, n. 2, p. 419-426, 1970.
76. SENAPATI S., DAS S., BATRA S.K. Mucin-interacting proteins: from function to therapeutics. *Cell Press*. v. 35, p. 236- 245, 2009.
77. SILVA A.E., SERAKIDES R., CASSALI, G.D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio- dependentes. *Ciência Rural*. v.34, n. 2, p. 625- 633, 2004.
78. SINGER J., WEICHSELBAUMER M., STOCKNER T., *et al.* Comparative oncology: ErbB-1 and ErbB-2 homologues in canine cancer are susceptible to cetuximab and trastuzumab targeting. *Molecular Immunology* v. 4, p. 200-209, 2012.
79. SORENMO K, Canine mammary gland tumors. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, v. 33, p. 573- 596, 2003.
80. SORENMO K., KRISTIANSEN V.M., COFONE M.A., *et al.* Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Veterinary Comparative Oncology*. v. 7, n. 3, p. 162-72, Sep 2009.
81. SOUZA J. V. Marcadores mucinosos associados ao câncer. *Revista da Associação médica do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre, v. 46, n. 1,2, p. 70- 83, Jan/Jun 2002.
82. STRANDBERG, J.; GOODMAN, D. Animal model of human disease: canine mammary neoplasia. *American Journal of Pathology*. v. 75, n. 1, p. 225-8, Apr 1974.
83. SUTHERLAND R.L., PRALL O.W.J., WATTS C.K.W. *et al.* Estrogen and Progesterin Regulation of Cell Cycle Progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. v. 3, n.1, p. 630 72, 1998.
84. TAYLOR- PAPADIMITRIOU J., BURCHELL J., MILES D.W. DALZIEL M. Muc-1 and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1455, p 301- 313, 1999.
85. THERIAULT C., PINARD M., COMAMALA M., *et al.* MUC16 (CA125) regulates epithelial ovarian cancer cell growth, tumorigenesis and metastasis. *Gynecologic Oncology*, v. 121, p. 434- 443, 2011.
86. THURÓCZY J., REISVAAG G.J.K., PERGE E., *et al.* Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in canine mammary tumours. *Journal comparative Pathology*. v. 137, n. 2-3, p. 122-9, Aug-Oct 2007.
87. WOLFF A.C., HAMMOND M.E.H., HICKS D.G., *et al.* Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. v.31, p. 3997- 4014, 2013.

88. WU S., CHOU F., RAU K. Clinical significance of a serum CA 15-3 surge and the usefulness of CA 15-3 kinetics in monitoring chemotherapy response in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research Treatment*, v. 124, n. 3, p. 879- 882, Aug 2010.
89. YIN B.W.T., LLOYD K.O. Molecular Cloning of the CA125 Ovarian Cancer Antigen. *The Journal of Biological Chemistry*.v. 276, p. 27371–27375, 2001.

10 . ANEXOS

Anexo I- Carta de aprovação do CETEA/UFMG – Março 2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 279/2010**, relativo ao projeto intitulado **"Marcadores tumorais CA15.3, CEA, HER-2 e CA125 séricos e teciduais em cadelas portadoras de carcinoma mamário"**, que tem como responsável(is) **Geovanni Dantas Cassali**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **30/ 03/2011**.

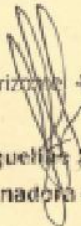
Este certificado expira-se em **30/ 03/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocolo nº 279/2010**, related to the project entitled **"Tumors markers CA15.3, CEA, HER-2 and CA125 in serum and tissue of female dog with mammary carcinoma"**, under the supervisors of **Geovanni Dantas Cassali**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 30, 2011**.

This certificate expires in **March 30, 2016**.

Belo Horizonte, 4 de Abril de 2011.


Profª. Jacqueline Jussara Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 5627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4518
www.ufmg.br/bioetica/etica - etica@proq.ufmg.br

(Mod. Cert. v1.0)

Anexo II – Comprovante de submissão

Pesquisa Veterinária Brasileira



Avaliação sérica e tecidual de MUC-1 e MUC-16 em cadelas com câncer de mama metastático e sua relação com a sobrevida e os marcadores tumorais RE, RP, Ki-67 e E-caderina

Journal:	<i>Pesquisa Veterinária Brasileira</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Campos, Lilliane; UFMG, Patologia Geral; Silva, Juliana; UFMG, Patologia Geral Araujo, Marina; UFMG, Patologia Geral Campos, Cecília; UFMG, Patologia Geral Lavalle, Gleidice; UFMG, Escola de Veterinária Ferreira, Enio; UFMG, Patologia Geral Cassali, Geovanni; UFMG,
Keyword:	Canine, mammary gland , carcinoma, MUC-1, MUC-16

SCHOLARONE®

Anexo III – Produção científica

PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO DE MARÇO DE 2011 A MAIO 2015

RELACIONADO À TESE

a) Artigo aceito:

CAMPOS L.C., Silva J.O., Santos F.S., Araújo M.R., Lavallo G.E., Ferreira E., Cassali G.D. Prognostic significance of tissue and serum HER2 and MUC1 in canine mammary cancer. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. (In Press). v. 27,n.4, July 2015.

b) Artigo submetido:

CAMPOS L.C., SILVA J.O., ARAÚJO M.R., CAMPOS C.B., LAVALLE G.E., FERREIRA E., CASSALI G.D. Avaliação sérica e tecidual de MUC-1 e MUC-16 em cadelas com carcinoma mamário metastático e sua relação com a sobrevivência e os marcadores tumorais RE, RP, Ki-67, E-caderina e HER-2. *Revista Pesquisa Veterinária Brasileira*.

c) Resumos Publicado em Anais/Periódicos de Eventos:

1. **CAMPOS, L. C.**, LAVALLE, G. E., FERREIRA, E., CASSALI, G. D. Marcadores tumorais CA15.3, CEA, HER-2 E CA125 séricos e teciduais em cadelas portadoras de carcinoma mamário, 2012. III Encontro de Patologia (UFMG).

2. **CAMPOS L.C.**; SILVA J. O.; SANTOS F.S.; LAVALLE G.E.; FERREIRA E.; CASSALI G.D. Valor prognóstico da análise sérica e tecidual dos marcadores tumorais HER-2 e CA15.3 em cadelas com câncer de mama. In: IV Encontro de Patologia da UFMG, 2014, Belo Horizonte, p.16.

NÃO RELACIONADO À TESE

a) Artigos publicados:

CAMPOS, L. C., LAVALLE, G. E., CARNEIRO, R. A., DUTRA, A.P., VIANA, A. A. S., CASSALI, G.D. Carboplatina e inibidor de Cox-2 no tratamento do carcinoma inflamatório de mama em cadela – relato de caso. *Clínica Veterinária*, v.92, p.72 – 76, 2011.

AULER, P.A., BERTAGNOLI, A. C., FERREIRA, E., CAMPOS, G., DIAS, A. P., CAMPOS, C. B., **CAMPOS, L. C.**, CASSALI, G. D. Myeloid metaplasia in canine mixed mammary tumors: occurrence and characterization. *The Veterinary Quarterly*. , v.31, p.173 - 177, 2011.

SOUZA, C. M., DAMASCENO, K.A., GAMBA, C.O., **CAMPOS, L. C.**, CAMPOS, C. B., CASSALI, G. D. Tumor misto de glândula sudorípara canina. *Acta Scientiae Veterinariae* (Online). , v.39, p.1 - 4, 2011.

CAMPOS, L. C., LAVALLE, G. E., ESTRELA-LIMA, A., FARIA, J.C.M., GUIMARAES, J. E., DUTRA, A.P., FERREIRA, E., SOUSA, L. P., RABELO, E. M. L., COSTA, A. F. D. V., CASSALI, G. D. CA15.3, CEA and LDH in dogs with malignant mammary tumors.

Journal of Veterinary Internal Medicine. v. 26, p.1383–1388, 2012.

CAMPOS, L. C., SOUZA, C. M., SANTOS, F. S., ARAUJO, M. R., CASSALI, G. D. Utilização dos modelos animais no estudo de marcadores séricos tumorais no câncer de mama. *Ambito Hospitalar.* , v.215, p.11 - 16, 2012.

GAMBA, C. O., SILVA, J. O., **CAMPOS, L. C.**, BERNARDES, V.F., DAMASCENO, K. A., SOUZA, C. M., CAMPOS, C. B., CASSALI, G. D. Differential Diagnosis of Canine Gastrointestinal Stromal Tumor. *Acta Scientiae Veterinariae (Online).* , v.40, p.1044 -1049, 2012.

DAMASCENO, K. A., RABELO, B.S., GAMBA, C. O., SOUZA, C. M., **CAMPOS, L. C.**, CAMPOS, C. B., FERREIRA, E., CASSALI, G. D. Histopathological and immunophenotypical analysis of canine mucinous rectal adenocarcinoma. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology.* , v.5, p.74 - 77, 2012.

CAMPOS, L. C., SILVA, J. O., SOUZA, C. M., CAMPOS, C. B., GAMBA, C. O., GAMBA, C.O., DAMASCENO, K.A., HORTA, R. S., LAVALLE, G. E., CASSALI, G. D. Adenocarcinoma papilar de seio nasal em cão: Abordagem histomorfológica, imunofenotípica e terapêutica. *Acta Scientiae Veterinariae (Online).* v.41, suppl 1, n. 16, p.1- 6, 2013.

GAMBA, CONRADO O, DIAS, ÉVERTON J, RIBEIRO, LORENA GR, **CAMPOS, LILIANE C**, ESTRELA-LIMA, ALESSANDRA, FERREIRA, ENIO, CASSALI, GEOVANNI D. The diagnostic importance of invasive micropapillary carcinoma in the canine mammary gland: clinicopathological, immunohistochemical and survival analysis. *BMC Proceedings.* , v.7,Suppl. 2, p.17, 2013.

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

3. ARAÚJO M.R., DAMASCENO K.A., GAMBA C.O., CAMPOS C.B., **CAMPOS L.C.**, REIS D.C., SOUZA C.M., CASSALI G.D. Morphological and immuno-histochemical characterization of five phyllodes mammary gland tumors in dogs. *Online Journal of Veterinary Research.*, v. 18, p. 688-695, 2014.

CARVALHO, E. S. C., OLIVEIRA, D. R., **CAMPOS, L. C.**, LEAL, J. A., SAMPAIO, E. V., CASSALI, G. D. Avaliação nutricional de pacientes com câncer de mama atendidas no Serviço de Mastologia do Hospital das Clínicas, Belo Horizonte - MG. *Ciência e Saúde Coletiva*, v. 19, p. 1573- 1580, 2014.

C.O. GAMBA, **L.C. CAMPOS**, G.L. NEGREIROS-LIMA, K. MACIEL-LIMAB, L.P. SOUSA, A. ESTRELA-LIMA, E. FERREIRA, G.D. CASSALI. ZEB2 and ZEB1 expression in a spontaneous canine model of invasive micropapillary carcinoma of the mammary gland., *Research in Veterinary Science.*, v. 97, p. 554–559, 2014.

GEOVANNI D. CASSALI, GLEIDICE E. LAVALLE, ENIO FERREIRA, ALESSANDRA ESTRELA-LIMA, ANDRIGO B. DE NARDI, CRISTINA GHEVER, RENATA A.

SOBRAL, RENNE L. AMORIM, LUCIANA O. OLIVEIRA, FELIPE A. R. SUEIRO, HUGO E. O. BESERRA, ANGÉLICA C. BERTAGNOLLI, CONRADO O. GAMBÁ, KARINE A. DAMASCENO, CECILIA B. CAMPOS, MARINA R. ARAUJO, **LILIANE C. CAMPOS**, LIDIANNE N. MONTEIRO, FERNANDA C. NUNES, RODRIGO S. HORTA, DIEGO C. REIS, MARIA CECILIA R. LUVIZOTTO, GEORGIA M. MAGALHÃES, JOSIANE B. RAPOSO, ANA M. R. FERREIRA, NEIDE M. TANAKA, FABRIZIO GRANDI, RODRIGO UBUKATA, KAREN BATSCHINSKI, ERIKA M. TERRA, ROSANA C. L. SALVADOR, PAULO C. JARK, JULIANA E. R. DELECRODI, NARA A. NASCIMENTO, DANIELLE N. SILVA, LAÍS P. SILVA, KELLY CRISTINE R. S. FERREIRA, MICHELE S. FREHSE, GIOVANA W. DI SANTIS, ELISÂNGELA O. SILVA, TAINÃ N. GUIM, BEATRIZ KERR, PRISCILA P. CINTRA, FRANCIELE B. F. SILVA, JULIANA S. LEITE, MARCELA F. V. MELLO, MARIA DE LOURDES G. FERREIRA, HEIDGE FUKUMASU, BRENO S. SALGADO, RAFAEL TORRES. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology.*, v.7, p.38-69, 2014

REIS, D.C., SOUZA C.M., **CAMPOS L.C.**, SILVA A.C.A., LOPES M.T.P., CASSALI G.D., FERREIRA E. Talidomida promove leucocitose em camundongos inoculados com carcinoma mamário murino 4T1 clínico., *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 50, p. 64-66, 2014.

SOUZA C.M., SILVA A.C.A., FERRACIOLIA C.J., MOREIRA G.V., **CAMPOS L.C.**, REIS D.C., LOPES M.T.P., FERREIRA M.A.N.D, ANDRADE S.P., CASSALI G.D., Combination therapy with carboplatin and thalidomide suppresses tumor growth and metastasis in 4T1 murine breast cancer model. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* v.68, p. 51-57, 2014.

b) Artigo aceito para publicação

ARAUJO M.R., **CAMPOS L.C.**, FERREIRA E., CASSALI G.D. Quantitation of regional node metastatic burden and prognosis in canine malignant mammary tumours. *Journal of Veterinary Internal Medicine* (In Press). 2015.

c) Resumos publicados em anais/periódicos de eventos

CAMPOS, L. C., LAVALLE, G. E., FARIA, J.C.M., DUTRA, A.P., GUIMARAES, J. E., ESTRELA-LIMA, A., FERREIRA, E., CASSALI, G. D. Detection of potential serum tumor markers for canine mammary cancer In: XXVIII Congresso Brasileiro de Patologia Latioamericana, 2011, Maceió. **Jornal Brasileiro de Patologia e medicina laboratorial.**, 2011. v.47. p.532 – 532.

DAMASCENO, K. A., BERTAGNOLLI, A. C., ESTRELA-LIMA, A., RIBEIRO, L. R., RABELO, B.S., CAMPOS, C. B., **CAMPOS, L. C.**, CASSALI, G. D. Avaliação da integridade mioepitelial e membrana basal nos carcinomas em tumores mistos mamários caninos: modelo de progressão tumoral In: XXVIII Congresso Brasileiro de Patologia Latioamericana, 2011, Maceió. *Jornal Brasileiro de Patologia e medicina laboratorial*, 2011. v.47. p.535 – 535.

SOUZA, C.M., DAMASCENO, K. A., REIS, D.C., ARAUJO, M. R., **CAMPOS, L. C.**, SILVA, A. C. A., LOPES, M. T. P., RUSSO, R. C., FERREIRA, M. A. N. D., CASSALI, G. D. Avaliação da resposta inflamatória linfocítica no carcinoma mamário murino 4t1 In:

XXVIII Congresso Brasileiro de Patologia Latioamericana, 2011, Maceió. *Jornal Brasileiro de Patologia e medicina laboratorial*, 2011. v.47. p.546 – 546.

CAMPOS, L. C., SOUZA, C. M., GAMBA, C.O., DAMASCENO, K.A., ARAUJO, M. R., LAVALLE, G. E., CASSALI, G. D. Abordagem Histomorfológica e imunofenotípica de adenocarcinoma papilar de seio nasal: relato de caso, 2011. XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária/ I Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária (Universidade Federal de Goiânia).

DAMASCENO, K., RABELO, B. S., GAMBA, C.O., SOUZA, C.M., **CAMPOS, L. C.**, CAMPOS, C. B., FERREIRA, E., CASSALI, G.D. Análise Histoquímica e imunofenotípica de adenocarcinoma retal mucinoso em cão: Relato de caso, 2011. XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária/ I Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária (Universidade Federal de Goiânia).

REIS, D.C., **CAMPOS, L. C.**, SOUZA, C. M., LOPES, M. T. P., CASSALI, G. D. Avaliação da progressão tumoral e sobrevida de camundongos portadores de tumor mamário 4t1, 2011. 13 Simpósio Mineiro de oncologia.

CAMPOS, C. B., DAMASCENO, K., GAMBA, C.O., SOUZA, C.M., **CAMPOS, L. C.**, ESTRELA-LIMA, A., FERREIRA, E., CASSALI, G.D. Estudo imuno-histoquímico da expressão de E-caderina e sua relação com sobrevida global em tumores mamários caninos, 2011. XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária/ I Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária.

ARAUJO, M. R., FERRACIOLLI, C. J., **CAMPOS, L. C.**, CASSALI, G. D. Avaliação de linfonodos em cadelas portadoras de carcinomas mamários: Uso de uma solução clareadora de gorduras, 2012. III Encontro de Patologia (UFMG)

DAMASCENO, K. A., BERTAGNOLLI, A. C., ESTRELA-LIMA, A., RIBEIRO, L. R., RABELO, B. S., CAMPOS, C. B., **CAMPOS, L. C.**, BARROS, A. L., CASSALI, G. D. Carcinomas em tumores mistos mamários caninos: expressão de Versican e sua relação com invasão estroma e com grau de diferenciação mioepitelial, 2012. III Encontro de Patologia (UFMG)

GAMBA, C. O., DIAS, E. J., RIBEIRO, G. R., **CAMPOS, L. C.**, ESTRELA-LIMA, A., FERREIRA, E., CASSALI, G. D. Histology and immunohistochemistry of invasive micropapillary carcinoma of the canine mammary gland, a retrospective study, 2012. III Encontro de Patologia (UFMG).

CAMPOS, D. C., SILVEIRA, M. B., SANTOS, P. F., FERREIRA, S. Z., SOUZA, C.M., **CAMPOS, L. C.**, FERREIRA, E., ARAUJO, M. R., CASSALI, G. D., MALAMUT, C., SILVA, J. B. Single dose toxicity and biodistribution studies of [18f] fluorocholine In: International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2013, 2013, Recife. Associação Brasileira de Energia Nuclear. Recife: 2013. p. 24 – 29.

REIS, D.C., SOUZA C.M., **CAMPOS L.C.**, SILVA A.C.A., LOPES M.T.P., FERREIRA E., CASSALI G.D. talidomida promove leucocitose em camundongos inoculados com carcinoma mamário murino 4t1. In: II Congresso Brasileiro De Patologia Veterinária/ XVI Encontro Nacional De Patologia Veterinária (ENAPAVE) *Archives of Veterinary Science*, 2013, v. 18, (supl.2), p. 265- 266.

CAMPOS L.C., CAMPOS, C.B., DAMASCENO, K.A., SOUZA, C.M., FERREIRA, E., CASSALI, G.D. Adenoma iridociliar em cão- relato de caso, 2013. II Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, XVI Encontro Nacional de Patologia Veterinária- ENAPAVE (Curitiba).