

**UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO**

Escola de Ciências da Vida e do Ambiente  
Mestrado em Biologia Clínica e Laboratorial

**Estudo da expressão imunohistoquímica do  
c-kit e da sua relação com a angiogénese nos tumores mamários  
da cadela**

**Marlene Isabel Santos Dias**

**Orientador:**

Professora Doutora Felisbina Luísa Pereira Guedes Queiroga

**Coorientador:**

Mestre Maria Isabel da Silva Carvalho



**VILA REAL, 2016**

**UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO**

Escola de Ciências da Vida e do Ambiente  
Mestrado em Biologia Clínica e Laboratorial

**Estudo da expressão imunohistoquímica do  
c-kit e da sua relação com a angiogénese nos tumores mamários  
da cadela**

**Marlene Isabel Santos Dias**

**Orientador:**

Professora Doutora Felisbina Luísa Pereira Guedes Queiroga

**Coorientador:**

Mestre Maria Isabel da Silva Carvalho

**Composição do Júri:**

---

---

---

**VILA REAL, 2016**

À minha estrela guia que me acompanha todos os dias.

“Persevere na sua tarefa, faça dela a sua vida e  
Envelheça cumprindo o seu dever.”

**Eclesiastes, 11:20**

---

## Resumo

Os tumores de mama são as neoplasias mais comuns na espécie canina, mais particularmente os tumores malignos têm vindo a aumentar consideravelmente nestes animais. Contudo, os estudos realizados nesta vertente, mostram-se ainda insuficientes para o prognóstico e posterior tratamento destas neoplasias tão agressivas.

O presente estudo pretendeu estudar a expressão do c-kit, VEGF e CD31 em 81 tumores malignos da mama da cadela através de estudos de imunohistoquímica e relacionar a sua expressão com diversos parâmetros clinicopatológicos. Por conseguinte as 81 amostras foram submetidas à deteção imunohistoquímica do c-kit, VEGF e CD31, juntamente com parâmetros clinicopatológicos de agressividade do tumor.

De acordo com os resultados obtidos concluímos que o c-kit apresenta relação positiva com a malignidade tumoral, bem como com parâmetros de angiogénese verificados pela expressão do VEGF e CD31.

Tumores com maior expressão de c-kit apresentam fenótipos mais agressivos, nomeadamente, maior grau histológico de malignidade, presença de êmbolos vasculares e presença de metástases nos gânglios linfáticos regionais.

A sobreexpressão do c-kit revelou correlação positiva com o VEGF ( $r = 0,322$ ,  $P < 0,009$ ) e com o CD31 ( $r = 0,470$ ,  $P < 0,001$ ). O grupo c-kit/angiogénese foi associado com elevado grau de malignidade ( $P < 0,001$ ), presença de êmbolos intravasculares ( $P < 0,001$ ) e invasão dos gânglios linfáticos ( $P < 0,001$ ).

Estes resultados sugerem que o c-kit pode partilhar vias de sinalização comuns com VEGF e CD31 na progressão de CMT e pode contribuir para o aumento da angiogénese, agressividade e mau prognóstico destes tumores.

*Palavras-chave:* Tumores mamários caninos; Angiogénese; C-kit; VEGF; CD31.

**Abstract**

The breast tumors are the most common neoplasia in canine species, mainly malignant tumors have been increasing in these animals. However, studies on this issue are still insufficient for the prognosis and subsequent treatment of these aggressive tumors.

This study aimed to examine the expression of c-kit, VEGF and CD31 in 81 breast malignant tumors of the dog through immunohistochemical studies and relate their expression with various clinical-pathological parameters. Therefore 81 samples were submitted to immunohistochemical detection of c-kit, VEGF and CD31, together with clinicopathological parameters of tumor aggressiveness.

According to the obtained results we conclude that c-kit has a positive relationship with tumor malignancy and parameters of angiogenesis like VEGF and CD31 expression.

Tumors with greater expression of c-kit demonstrated more aggressive phenotypes, in particular, greater histological grade of malignancy, presence of neoplastic intravascular emboli and presence of metastasis in the lymph nodes.

C-kit overexpression revealed a positive correlation with VEGF ( $r=0.322$ ,  $P<0.009$ ) and CD31 ( $r=0.470$ ,  $P<0.001$ ). The group c-kit/angiogenesis was associated with elevated grade of malignancy ( $P<0,001$ ), presence of intravascular emboli ( $P<0,001$ ) and presence of lymph node metastasis ( $P<0,001$ ).

Present results suggest that c-kit may share common signaling pathways with VEGF and CD31 in CMT progression and may contribute to increased angiogenesis, aggression and poor prognosis in these tumors.

*Keywords:* Canine mammary tumors; Angiogenesis; C-kit; VEGF; CD31.

---

**Índice geral**

Resumo .....	v
Abstract .....	vi
Índice de figuras .....	x
Índice de gráficos .....	xi
Índice de quadros .....	xii
Siglas e Abreviaturas .....	xiii
Agradecimentos .....	xv
<b>Capítulo 1 – Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1. Tumores mamários em cadela .....	1
1.1.1. Etiologia .....	2
1.2. Proto-oncogene c-kit .....	3
1.2.1. Expressão do c-kit .....	5
1.2.2. Tumores mamários e c-kit .....	6
1.3. Marcadores de angiogénese tumoral .....	8
1.3.1. Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) .....	8
1.3.2. CD31 .....	10
1.4. Relação do c-kit com os marcadores de angiogénese tumoral .....	11
<b>Capítulo 2 – Objetivos .....</b>	<b>13</b>
<b>Capítulo 3 – Material e Métodos .....</b>	<b>14</b>
3.1. Descrição do material utilizado e sua origem .....	14
3.2. Métodos .....	14

---

3.2.1. Avaliação histopatológica .....	14
3.2.2. Avaliação clinicopatológica do tumor .....	15
3.2.3. Técnica da imunohistoquímica .....	16
3.2.3.1. Procedimento .....	17
3.2.3.2. Métodos de quantificação da imunorreatividade .....	19
3.2.4. Análise Estatística .....	20
<b>Capítulo 4 – Resultados .....</b>	<b>21</b>
4.1. Análise descritiva da amostra em estudo .....	21
4.1.1. Variáveis clinicopatológicas .....	21
4.1.2. Classificação histológica dos tumores .....	21
4.2. Análise comparativa entre os marcadores tumorais .....	23
4.2.1. Imunorreatividade do c-kit .....	23
4.2.2. Imunorreatividade do VEGF .....	24
4.2.3. Imunorreatividade do CD31 .....	25
4.3. Marcadores e variáveis clinicopatológicas .....	25
4.3.1. Imunorreatividade do c-kit: Relação com variáveis clinicopatológicas .....	25
4.3.2. Imunorreatividade do VEGF: Relação com variáveis clinicopatológicas .....	27

---

4.3.3. Imunorreatividade do CD31: Relação com variáveis clinicopatológicas .....	29
4.4. Relação entre C-kit, CD31 e VEGF .....	31
4.5. Associação do C-kit com VEGF e densidade de microvasos (CD31) .....	32
4.6. Grupos C-kit/ angiogénese e relação com variáveis de agressividade tumoral .....	33
<b>Capítulo 5 – Discussão .....</b>	<b>35</b>
<b>Capítulo 6 – Conclusão .....</b>	<b>41</b>
<b>Capítulo 7 – Estudos Futuros .....</b>	<b>42</b>
<b>Capítulo 8 – Referências Bibliográficas .....</b>	<b>43</b>

**Índice de figuras**

**Figura 1**| Imunorreatividade do c-kit em carcinoma tubulo-papilar; marcação simultaneamente citoplasmática e membranar ..... 34

**Figura 2**| Imunorreatividade do c-kit em carcinosarcoma ..... 34

**Figura 3**| Imunorreatividade do c-kit na glândula mamária anexa não-tumoral ..... 34

## Índice de gráficos

Gráfico 1   Associação do C-kit/VEGF com a DMV em tumores mamários malignos do cão .....	32
---	----

---

**Índice de quadros**

Quadro 1  Avaliação do grau histológico de malignidade segundo Goldschmidt e colaboradores, 2011 .....	16
Quadro 2  Soros usados, concentrações, tempo e temperatura de incubação e tratamentos efetuados para recuperação antigénica .....	17
Quadro 3  Características da amostra, frequências absolutas e percentagens .....	22
Quadro 4  Diferenciação dos tipos histológicos malignos .....	23
Quadro 5  Imunorreatividade para a intensidade de c-kit e extensão de c-kit .....	24
Quadro 6  Imunorreatividade para o VEGF .....	25
Quadro 7  Imunorreatividade para o CD31 .....	25
Quadro 8  Associação entre o c-kit e os parâmetros clinicopatológicos .....	26
Quadro 9  Associação entre o índice de proliferação do VEGF e os parâmetros clinicopatológicos .....	27
Quadro 10  Associação entre o CD31 e os parâmetros clinicopatológicos .....	29
Quadro 11  Relação entre os valores médios do C-kit, CD31 e VEGF – Correlações de Spearman's .....	31
Gráfico 12  Relação entre os grupos C-kit/angiogénese com as variáveis de agressividade tumoral .....	33

## Siglas e abreviaturas

% – Percentagem

$\mu$ l – Microlitro

$\mu$ m – Micrometro

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ANOVA – Análise de variância

°C – Graus Celsius

**c-kit** – Proteína tirosina cínase Kit

**CD117** – Proteína tirosina cínase Kit

**cm** – centímetros

**CPPC** – Cancro pulmão pequenas células

**DAB** – Tetra-hidrocloro de 3,3'-diaminobenzidina

**dm<sup>3</sup>** – decímetro cúbico

**DMV** – Densidade de microvasos

**g** – grama

**gg** – gânglios linfáticos regionais

**GD** – Grau de diferenciação

**GHM** – Grau histológico de malignidade

**GN** – Grau nuclear

**H&E** – Hematoxilina-Eosina

**HIF-1- $\alpha$**  – Fator indutor de hipóxia 1-alfa

**HVUTAD** – Hospital Veterinário da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Ig** – Imunoglobulina-like

**IGF-I** – Factor de crescimento insulínico do tipo I

**IL-1** – Interleucina 1

**IM** – Índice mitótico

**KDa** – KiloDalton

**M** – Molar

**min.** – minuto

**mL** – Mililitro

**n** – Número de amostras

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**P** – Significância estatística

**PBS** – Tampão fosfato salino

**PCNA** – Antígeno nuclear de proliferação celular

**PDGF** – Fator de crescimento derivado de plaquetas

**r** – Coeficiente de correlação

®- Marca registada

**RE** – Recetores de estrogénio

**RNA<sup>m</sup>** – Ácido ribonucleico de transferência

**RTK** – Recetores de tirosina cínase

**se** – Erro padrão

**SCF** – Fator de células estaminais

**SHP-1** – Tirosina-fosfatase

**SPSS** – Statistical Pachage for the Social Sciences

**SRD** – Sem raça determinada

**T** – Tamanho do tumor

**TF** – Tumores filoides de mama humana

**TMC** – Tumores mamários caninos

**UTAD** – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**VEGF** – Fator de crescimento vascular endotelial

**W** – Watts

**x** – vezes

## Agradecimentos

À Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), na pessoa do Excelentíssimo Reitor, Professor António Augusto Fontainhas Fernandes, manifesto o meu agradecimento pela possibilidade de ter realizado esta dissertação de Mestrado.

Agradeço à Professora Doutora Felisbina Luísa Pereira Gomes Queiroga, orientadora desta tese, por toda a ajuda, paciência e auxílio prestado na realização deste trabalho, sobretudo, por ter permitido realizasse esta dissertação de Mestrado.

De forma muito especial e particular à Mestre Maria Isabel da Silva Carvalho, coorientadora desta dissertação de mestrado, por tudo o que fez por mim, por todas as horas disponibilizadas para me ajudar, sempre com um sorriso e uma palavra de incentivo.

Agradeço à Professora Doutora Isabel Cristina Ribeiro Pires pela ajuda prestada neste trabalho e por se mostrar sempre disponível.

Agradeço às Sras. Dona Lígia Lourenço e Dona Glória pelo apoio laboratorial e ajuda prestada.

Agradeço ao “Reino Maravilhoso”, a cidade de Vila Real, que tão bem me acolheu e aos meus parceiros de curso e de morada. Tudo se tornou essencial ao meu percurso académico. Em modo particular à Bibiana e à Carolina, amigas de todas as horas de estudo e de desabafos, sem vocês nada seria possível; à Paula, à Sofia, à Rita e ao Zé que sempre estiveram disponíveis para ouvir as minhas dúvidas e me auxiliar. À Inês, à Maria e à Diana que mostraram ser amigas para a vida. A todos eles: obrigada, de coração!

Agradeço aos meus colegas de trabalho, que por tantas vezes me auxiliaram e permitiram ausências, dando sempre as melhores palavras de incentivo.

A toda a minha família, em particular à minha prima Joana, ao meu querido e incomparável irmão, Rui e à minha tão amada mãe e ao meu pai que, acredito, deram sempre o seu melhor e permitiram que tudo fosse possível mesmo na presença de tantas adversidades.

Àquele que me acompanha há longos anos sem nunca hesitar, nem desanimar, o meu Jorge, namorado e amigo, que Deus me permita partilhar contigo mais momentos felizes como este.

Por fim, à minha estrela guia que eleva o ânimo e a força sempre que falham e que sempre me mostrou o melhor caminho e melhor exemplo.

A Deus e a todos quantos cruzaram a minha vida, de uma maneira ou de outra, foram determinantes.

---

## Capítulo 1 – Introdução

### 1.1. Tumores mamários em cadela

As neoplasias mamárias ocorrem frequentemente em cadelas (Uva and others, 2009). O estudo destas neoplasias tem particular interesse para a própria espécie, uma vez que estas apresentam uma grande diversidade biológica dificultando as opções de tratamento especialmente nos animais que manifestam doença metastática (Morrison, 1998; Peleteiro, 2011; Queiroga and Lopes, 2002; Queiroga and others, 2008).

A comparação entre os tumores mamários da cadela (TMC) e da mulher é inevitável, uma vez que compartilham características epidemiológicas, clínicas, genéticas e moleculares. À semelhança da espécie humana, nas cadelas é também no sexo feminino que se verificam mais casos desta neoplasia, sendo apenas 1% dos casos referentes ao sexo masculino. Por estes motivos, os TMC têm sido descritos como um bom modelo biológico para o estudo dos tumores mamários da mulher (Porrello and others, 2006).

Os TMC apresentam elevada incidência (cerca de 25 a 50% dos tumores registados na espécie canina) (Millanta and others, 2005; Sorenmo, 2003) e afetam maioritariamente cadelas com idade mais avançada (Egenvall and others, 2005; Kurzman and Gilbertson, 1986). É a partir da meia-idade, geralmente a partir dos 6 anos, mas com mais relevância entre os 10 e os 11 anos, que os casos são mais frequentes, sendo que animais com idade inferior ou igual a 4 anos não apresentam incidência significativa (Perez Alenza and others, 2000). Sabe-se que as glândulas mamárias mais afetadas são geralmente mais próximas da zona caudal do animal (Misdorp, 2002b; Peleteiro, 2011).

Estudos afirmam que existem raças com maior propensão para tumores de mama (Priester and McKay, 1980; Zatloukal J, 2005) e que a incidência de TMC é menor em cães de pequeno porte (Itoh and others, 2005). Contudo, estas conclusões foram obtidas a partir de estudos com uma população reduzida, pelo que é necessário ter em consideração que estes resultados podem ser distintos de acordo com a região geográfica (Peleteiro, 2011).

### 1.1.1. Etiologia

Conhecem-se vários fatores que se relacionam com o aparecimento de TMC, pelo que estes são caracterizados como sendo tumores multifatoriais (Perez Alenza and others, 2000). Agentes hormonais, bem como genéticos e imunitários, revelam-se extremamente importantes no conhecimento desta enfermidade (Todorova, 2006).

Atualmente, vários estudos admitem que os agentes hormonais são um fator preponderante no desenvolvimento dos TMC, sendo muitos destes tumores hormono-dependentes (Queiroga and others, 2005b; Queiroga and others, 2008). As hormonas sexuais estão envolvidas no grau de diferenciação tumoral, sendo que o maior grau de malignidade está correlacionado com a diminuição da expressão de, por exemplo, recetores de estrogénio (RE) (Martin de las Mulas and others, 2004). Estudos confirmam este facto em carcinomas invasivos. É também avaliada a expressão de recetores de progesterona, que se manifesta inferior em neoplasias benignas e malignas da mama, quando comparada ao tecido mamário normal (Millanta and others, 2005).

Outros estudos admitem que a produção de estrogénio, progesterona, prolactina e hormonas de crescimento transmitem sinais moleculares que retardam a apoptose de várias células epiteliais mamárias e estão intimamente associadas ao crescimento e desenvolvimento da glândula mamária (Misdorp, 2002b; Rutteman, 1990). Contudo, em determinadas circunstâncias, estes complexos hormonais podem atuar de forma díspar, estando o aumento da sua expressão relacionado com a malignidade dos TMC (Queiroga and others, 2005b). Vários investigadores relacionam o aumento da prolactina por indução, à proliferação celular de tumores de mama em vários animais (Hankinson and others, 1999). Em TMC malignos já foram descritos níveis superiores de prolactina relativamente a TMC benignos e tecido mamário normal (Queiroga and others, 2005b). Mais recentemente, foram obtidos resultados que exprimem uma forte relação entre os elevados níveis de progesterona e de hormona de crescimento que, por consequência, levam ao aumento do fator de crescimento insulínico do tipo I (IGF-1) (Queiroga and others, 2008). Assim a elevada concentração destes componentes em TMC malignos, sugere a sua participação na carcinogénese deste tipo de neoplasias (Queiroga and others, 2010).

Os fatores genéticos apresentam uma participação significativa no desenvolvimento e progressão desta afeção. As mutações de genes estão presentes em elevado número nos TMC, nomeadamente os genes de supressão tumoral, como é exemplo o P53, que em cerca de 35%

das neoplasias mamárias se encontra mutado (Lee and Kweon, 2002; Veldhoen and others, 1999). O gene P53 é responsável pela codificação de uma proteína que, ao atuar como fator de transcrição nuclear, é capaz de inibir a progressão do ciclo celular de células que possuam erros ao longo da sua cadeia de ADN, ativar enzimas para reparação desses mesmos erros genéticos e incitar a apoptose das células com danos irreversíveis (Thamm 2007). Estão descritos cerca de 12 genes envolvidos no processo neoplásico do tumor de mama. Regra geral, estes onco-genes podem apresentar a sua função amplificada ou sobre expressa (Berg and Hutter, 1995; Sakorafas and Tsiotou, 2000). A sobre-expressão de determinados oncogenes ativa uma série de vias de sinalização celulares que culminam em fatores favorecedores da carcinogénese mamária. As proteínas cínases, envolvidas nas vias de sinalização celulares, são responsáveis pela transdução do sinal e encontram-se no domínio intracitoplasmático dos recetores dos fatores de crescimento. Durante a carcinogénese mamária há uma ativação contínua destas proteínas cínases, induzindo uma proliferação descontrolada das células neoplásicas (Mendelsohn, 2015).

## **1.2. Proto-oncogene c-kit**

No cancro de mama da mulher estão identificados diversos recetores tirosina-cínase designados por RTK, que apresentam domínios ditos fundamentais: o domínio extracelular de ligação hormonal, o domínio transmembranar hidrofóbico e o domínio citoplasmático (Suo and others, 1998). Os diferentes recetores de tirosina-cínase (RTK) dividem-se em subfamílias, as quais diferem pelo tipo de recetores. O c-kit é um recetor tipo III, uma vez que o segmento das moléculas de adesão contém cinco domínios imunoglobulina-like (Ig) (Kierszenbaum, 2012; Mendelsohn, 2015). Também designado de CD117, este proto-oncogene está relacionado com a codificação do complexo tirosina-cínase do recetor de crescimento do tipo III (Canonica and others, 2001; Gibson and Cooper, 2002). O ligando do c-kit, atualmente denominado de fator de células estaminais ou stem cell factor (SCF), apresenta elevada importância na determinação da expressão tumoral de diferentes carcinomas. Acredita-se que haja um mecanismo autócrino que desencadeia o crescimento celular pela ligação do c-kit ao seu ligando (Bellone and others, 2001; Blume-Jensen and others, 1998; Carson and others, 1994).

Aquando da dimerização do recetor tirosina-cínase com o seu ligando SCF, dá-se a ativação do proto-oncogene c-kit e este é translocado para vesículas citoplasmáticas (Jahn and others, 2002). Após este processo ocorre autofosforilação da tirosina-cínase em

resíduos específicos de tirosina. Os resíduos da tirosina atuam como locais de ligação a proteínas intracelulares de transdução do sinal, que induzem ativação de várias vias de sinalização celular envolvidas em situações de resposta a fatores de crescimento. Esta interação poderá iniciar-se sem que haja interferência dos fatores de crescimento, contudo terá que se verificar a degradação de uma tirosina-fosfatase (SHP-1) que é responsável pela sinalização negativa do c-kit. Sempre que a tirosina-fosfatase, SHP-1, se conjuga com uma tirosina do complexo justamembranar do c-kit altera a transdução do sinal deste proto-oncogene (Broudy and others, 1999; Smith and others, 2001). Decorrente da interação do c-kit com o seu ligando SCF, verifica-se um aumento de proteínas de transdução de sinal (Keshet and others, 1991), uma vez que este processo permite a criação de locais de ancoragem para proteínas sinalizadoras (Yee and others, 1994). De salientar que ao longo destes processos, a tirosina-cínase é constantemente reciclada (Palumbo and others, 2002; Shibamura and others, 2002).

À semelhança do que acontece nos tumores de mama da mulher, nos TMC o c-kit é referenciado como um gene no qual ocorrem mutações. A mutação poderá provocar uma ativação constitutiva no seu recetor, pelo que se dá uma resposta por feedback negativo (London, 2009). Estudos realizados em cancro da mama da mulher determinam que a presença da proteína do c-kit pode estar relacionada com o crescimento e diferenciação do tecido mamário normal (Lammie and others, 1994).

A proteína do c-kit pode apresentar-se inativa na membrana citoplasmática, caso não se encontre ligada ao SCF. Já o ligando do c-kit, SCF, poderá encontrar-se como uma molécula solúvel ou localizar-se na superfície das células estromais, formando dímeros essenciais para a funcionalidade do c-kit (Zhang and others, 2000). Deste modo, quando expressa, esta proteína torna-se essencial para o desenvolvimento de diversas células, tais como as células estaminais hematopoiéticas, mastócitos ou melanócitos (Smith and others, 2001).

A dimerização do kit e a autofosforilação da tirosina, dão-se ao nível do domínio intracelular do recetor, pela ligação do SCF. Assim, são criados locais passíveis de receber moléculas de transdução do sinal, chamadas de pontos de ancoragem, que por sua vez permitem a fosforilação e a ligação ao substrato (Vivanco and Sawyers, 2002; Zhang and others, 2000). As mutações oncogénicas kit de perda de função, são geralmente associadas a vários tumores. Num estudo realizado em 1998, demonstrou-se que a diminuição da expressão do produto do gene c-kit está envolvido no desenvolvimento do fenótipo maligno.

Em TMC, o nível de transcrição do c-kit em tumores malignos foi menor do que em tumores benignos. Mais estudos corroboram estes achados, admitindo que as mutações que resultam da ativação do kit ou fosforilação constitutiva do ligando, poderão estar envolvidas na progressão de tumores menos agressivos em tumores de elevada agressividade e na transformação de linhas celulares dependentes de fatores de crescimento, em linhas celulares não dependentes desses fatores (Allander and others, 2001; Hirota and others, 2000; Longley and others, 2001).

Existem vários tipos de mutações que podem ativar a proteína kit. No tipo pocket, estas mutações podem provocar um desarranjo na sequência de aminoácidos do local enzimático, afetando por conseguinte a sua ativação e a ansa de ativação na cínase do kit (Ashman, 1999; Hirota and others, 2001; Moskaluk and others, 1999). Já no tipo regulador, as mutações não afetam o local enzimático da sequência de aminoácidos, mas lesam a regulação da cínase, levando à ativação constitutiva do kit. Deste modo a identificação do tipo de mutação poderá ser implementada na identificação dos TMC, já que respondem de forma divergente aos inibidores da cínase do kit (Ma and others, 2002).

### **1.2.1. Expressão do C-kit**

Diversos autores dirigem os seus estudos para compreender como se processa a expressão do c-kit. Este proto-oncogene apresenta estrutura simples e semelhante a genes codificantes de outros recetores tirosina-cínase do tipo III (Andre and others, 1997; Gokkel and others, 1992; Vandenbark and others, 1992). A proteína kit codificada pelo c-kit, apresenta três domínios fundamentais (Ashman, 1999). Os cinco domínios da Ig encontram-se no domínio extracelular desta proteína monomérica, onde está presente o local de ancoragem com o ligando SCF. Atualmente confere-se aos domínios extracelulares da Ig diversas funções como ligação e dimerização do recetor SCF e degradação proteica do kit (Broudy and others, 2001). Esta proteína apresenta também um domínio transmembranar e um domínio intracelular constituído por uma cínase intracelular, na qual se encontra o local de ativação (pocket enzimático), e por uma hélice inibitória justamembranar que inibe a atividade do kit (Broudy and others, 2001).

Estudos em melanomas e carcinomas humanos revelam que a metastização está relacionada com a perda de função do c-kit (Huang and others, 1998). Os níveis da proteína do c-kit são regulados por outras citocinas de forma específica para cada tipo celular. Por exemplo, em células endoteliais, a interleucina 1 (IL-1) desencadeia, uma diminuição do

RNAM do c-kit. Assim, o aumento do SCF, realça a importância da relação do c-kit com o seu ligando na inflamação da parede vascular (Dubois and others, 1994).

A própria síntese e degradação da proteína do c-kit está envolvida no processo que regula a expressão do c-kit. A quebra das ligações peptídicas do recetor do c-kit leva à ativação do mesmo e consequentemente à libertação do domínio extracelular solúvel (Vandenbark and others, 1996).

É importante referir a existência de compostos inibidores da expressão do c-kit. Estes compostos de inibição da tirosina-cínase são denominados de anti-neoplásicos de primeira linha, já que estão envolvidos na anulação das atividades bioquímicas resultantes de mutações com ganho de função (Reddy and Kaelin, 2002).

No tratamento de cancro de mama da mulher, já se utilizam fármacos que inibem seletivamente a tirosina-cínase (Hochhaus and others, 2001). Contudo, apesar de se conhecer o efeito da perda de expressão do c-kit, são ainda desenvolvidos estudos com o objetivo de perceber a consequência de mutações com ganho de função nos tumores de mama (Hines and others, 1999).

### **1.1.2. Tumores mamários e c-kit**

O recetor c-kit foi já estudado em tumores de mama da mulher. Um estudo realizado em 2012 obteve resultados que indicam que a menor imunorreatividade do c-kit poderá estar associada a carcinomas de mama invasivos e a características mais agressivas do tumor, como maiores dimensões, elevado grau histológico de malignidade e maior capacidade de metastização. Foi ainda quantificada a presença de recetores hormonais, em que menores quantidades de recetores de estrogénio e de progesterona foram verificadas em casos de menor imunorreatividade do recetor c-kit (Amin and others, 2012).

Estudos realizados em tumores filoides de mama humana (TF), demonstraram sobre-expressão do PDGF, que por ser um recetor tirosina cínase tipo III, poderá ter comportamento equiparável ao c-kit. Este estimula a diferenciação dos fibroblastos nos TF, atuando como agente mitogénico para células mesenquimatosas (Shao and others, 2000). Por este motivo, segundo *Shao* e seus colaboradores, o PDGF despoleta a hiperplasia do tecido fibroso nas neoplasias da mama.

As mutações ocorridas no proto-oncogene c-kit são frequentemente associadas ao desenvolvimento de tumores não só na espécie humana, como também em cães. Estudos em mastocitomas caninos admitem que esta neoplasia cutânea é resultante de uma duplicação

interna nos exões 11 e 12 que codificam o c-kit em cerca de 30 a 50% dos animais afetados. A mutação, como referido anteriormente, promove uma resposta por feedback negativo, sendo que a ativação do recetor poderá ocorrer com ausência do ligando do c-kit (London, 2009). Este fenômeno foi associado à proliferação neoplásica descontrolada e ao grau de malignidade dos tumores (Strefezzi Rde and others, 2009).

Mais estudos, também em mastocitomas, salientam uma possível relação entre as mutações descritas em c-kit e a agressividade do tumor. Os resultados mostram que os tumores bem diferenciados apresentam menor número de mutações, contrariamente ao que se verifica em tumores com grau de diferenciação menor (London, 2009; Welle and others, 2008). A partir de dados como estes, alguns autores distinguem os tipos tumorais em mastocitomas. Esta avaliação baseia-se na observação da expressão do c-kit na membrana celular e no limite do núcleo, sendo esta última descrita na maioria dos casos (Kiupel and others, 2004).

Num estudo mais recente, em que foi analisada a expressão do c-kit em 39 tumores melanocíticos cutâneos do cão, a importância deste proto-oncogene é também salientada. Segundo os resultados, os tumores malignos apresentam marcação reduzida ou inexistente do c-kit comparativamente aos tumores benignos. E, mais uma vez, narram a possibilidade do recetor c-kit ser uma forte indicação clínica da agressividade do tumor (Gomes and others, 2012).

Devido às suas potenciais características diagnósticas, os estudos com c-kit têm vindo a aumentar. Um recente estudo em tumores de mama da cadela, analisou a expressão do c-kit em tumores benignos e malignos, contudo as conclusões não estão em concordância com os demais estudos em neoplasias humanas e caninas. Segundo os seus resultados, há diminuição na expressão do c-kit em tumores benignos, quando comparados com tecido mamário normal e não relatam diminuição na sua expressão em tumores malignos (Brunetti and others, 2014).

Apesar desta recente publicação, o assunto não está bem esclarecido, pelo que são necessários estudos adicionais que permitam clarificar a ação do c-kit sobre tumores de mama da cadela, uma vez que este poderá suscitar outras possibilidades em termos de alvos terapêuticos.

---

## 1.2. Marcadores de angiogênese tumoral

A angiogênese tumoral é estudada há vários anos como base do desenvolvimento tumoral. Inclui uma diversidade de fatores proangiogênicos e antiangiogênicos endógenos, sendo por isso considerado um sistema de elevada regulação. O crescimento dos tumores apenas é possível por uma simbiose entre a formação de novos vasos sanguíneos já existentes e um aumento vascular (Folkman, 1995; Mutsaers, 2009).

Neste processo de angiogênese tumoral, a formação de novos capilares a partir de vasos sanguíneos pré-existentes, dá-se dentro e fora do tumor permitindo o seu desenvolvimento metastático. O desenvolvimento de metástases desencadeia uma cascata de expressão de fatores angiogênicos preponderantes na atividade tumoral (Chiarugi and others, 2002).

A capacidade de um tumor evoluir no grau de malignidade é já relacionada com a sua atividade angiogénica (Kerkela and Saarialho-Kere, 2003). Por este motivo são avaliados fatores angiogênicos, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e a densidade de microvasos (DMV) para prognóstico de diversos tumores (Foote and others, 2005).

### 1.3.1. Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)

A glicoproteína VEGF, está intimamente relacionada com a angiogênese, proliferação e transferência de células vasculares endoteliais, surgindo frequentemente em processos como a diferenciação e crescimento destas células e do endotélio vascular (Brustmann, 2004). Está também envolvida em processos de permeabilidade microvascular transportando proteínas do plasma o que impede situações de hipoxia e isquemia (Semenza, 2007; Tjwa and others, 2003).

Existem diferentes mecanismos capazes de regular a atividade do VEGF. O principal fator de desencadeamento da angiogênese é a hipoxia que pela ausência de oxigénio faz despoletar sensores de células endoteliais que por sua vez interagem com fatores induzidos e sensíveis à hipoxia. Os fatores de crescimento celular, as hormonas e as vitaminas também estão estreitamente relacionados com a atividade do VEGF (Tjwa and others, 2003).

O VEGF incita nas células endoteliais, a imunoexpressão de proteínas como a survivina, que se distinguem por serem anti-apoptóticas, tornando esta glicoproteína um importante fator de sobrevivência (Puxeddu and others, 2005).

A proliferação induzida pelo VEGF desencadeia metastização pelo aparecimento de capilares e desenvolvimento de células neoplásicas. Os novos capilares sanguíneos formados apresentam membranas basais que facilitam a comunicação com as células tumorais (Restucci and others, 2002).

Em medicina humana, o VEGF é um importante fator angiogénico, produzido por tumores como o da mama, estando a sua expressão associada à densidade dos microvasos. É também relatada a sua produção em elevadas proporções noutros tumores sólidos como pulmão, cólon e estômago (Dai and others, 2005). Estudos em humanos, nomeadamente em carcinomas ováricos, apresentaram correlações positivas entre a imunomarcagem do VEGF e o não aparecimento de tumor (Garzetti and others, 1999).

Foi já descrita a sua atividade pró-angiogénica em células osteoblásticas (Clarkin and others, 2008) em tumores ósseos. É responsável por ativar a remodelação óssea, fazendo a ponte entre a angiogénese e a formação de osso novo através de células osteocompetentes (osteogénese) (Clarkin and others, 2008; Kanczler and Oreffo, 2008; Stessels and others, 2004).

Existe correlação molecular e funcional do VEGF em tumores humanos e em neoplasmas caninos (Scheidegger and others, 1999). Estudos realizados em TMC, revelam que a sua expressão é aumentada em tumores malignos comparativamente a tumores benignos ou com menor grau de malignidade (Rebuzzi and others, 2007).

Enunciando estes resultados, Rebuzzi et al. (2007) verificou que em mastocitoma canino, o VEGF era expresso em grande parte dos mastócitos de tumores de grau II e III, ao passo que em tumores de grau I, a imunomarcagem era mais limitada e em reduzido número de células (Rebuzzi and others, 2007).

Neste estudo em TMC, é pretendido verificar a relação do VEGF com as variáveis clinicopatológicas sugestivas de mau prognóstico, bem como averiguar uma possível correlação deste marcador de angiogénese com o c-kit.

---

### 1.3.2. CD31

O CD31 é um antigénio utilizado na marcação de células endoteliais caninas, por se tratar de uma glicoproteína com cerca de 100 kDa, confere adesão entre células endoteliais e plaquetas. A imunoexpressão do CD31 foi já relatada por Ferrer e seus colaboradores, tendo sido salientada a sua ação permanente em qualquer célula endotelial canina (Ferrer and others, 1995).

As células endoteliais exprimem o CD31, deste modo, os anticorpos contra este marcador são utilizados como método de identificação da origem vascular das neoplasias humanas. Em determinado estudo o CD31 demonstrou-se específico e sensível para as células endoteliais vasculares (De Young and others, 1998).

A densidade de microvasos é tida em conta na determinação do tumor de mama da mulher (van Dijke and others, 1996) e mede a intensidade da angiogénese (Cassali and others, 2011). Que seja do nosso conhecimento, em humanos são mais os estudos que afirmam uma relação positiva entre a densidade de microvasos, metastização e prognóstico do tumor mamário do que o inverso (Guidi and others, 2000; Weidner and others, 1991).

Em animais, a DMV está relacionada com diversos estudos, nomeadamente o tumor de mama da cadela e melanomas caninos (Molteni and others, 2007). Em estudos com mastocitomas caninos, a DMV foi usada como prognóstico, determinada pela presença do antigénio CD31 e relacionado com o fator VIII. Os resultados obtidos revelam a elevada importância deste método de prognóstico (Restucci and others, 2002). Também em mastocitomas de grau III a DMV foi superior à registada em tumores de grau II e grau I (Ranieri and others, 2003), o que poderá revelar uma possível intervenção em métodos de diagnóstico.

A sua ação é ainda controversa, pelo que são necessários mais estudos que permitam estabelecer possíveis relações com as variáveis de agressividade tumoral. Em determinados estudos está associada a um diagnóstico mais eficaz, noutros é identificada como promotor de uma maior agressividade e desenvolvimento tumoral (Mareel and Leroy, 2003). Neste trabalho é pretendido definir o envolvimento do CD31 nos TMC, correlacionando-o com o c-kit e com parâmetros clinicopatológicos.

---

## 1.4. Relação do c-kit com os marcadores de angiogénese tumoral

A desregulação do c-kit ao instigar a ativação de diversas vias de sinalização pode resultar em inflamações crónicas que, a posteriori, poderão resultar em diversas doenças, entre elas o cancro de mama (Liang and others, 2013; Oriss and others, 2014; Ray and others, 2010).

Diversos autores divergem relativamente à imunoexpressão do c-kit em tumores mamário. Em determinados estudos a sobre-expressão é relacionada com a angiogénese e desenvolvimento tumoral, ao passo que, outros propõem que é a perda de expressão do c-kit que está associado a este desenvolvimento tumoral (Chui and others, 1996; Tsutsui and others, 2006a).

A expressão do c-kit tem sido relatada tanto em estudos com epitélio de mama normal, como em células neoplásicas, contudo os resultados obtidos são controversos, pelo que há necessidade de efetuar estudos adicionais acerca do papel deste marcador molecular na carcinogénese mamária da cadela. Assim torna-se relevante utilizar series mais alargadas de tumores, bem como relacionar o c-kit com outros marcadores tumorais descritos como importantes em diversos tumores (Tsuura and others, 1994).

Muitos são os investigadores que partilham as mesmas conclusões no que respeita à disseminação hematogénica de células tumorais estar relacionada com a densidade de microvasos (DMV). Isto revela que uma maior formação de microvasos a partir de vasos sanguíneos pré-existentes está associada à metastização e crescimento do tumor e mau prognóstico, nomeadamente, o tumor de mama da mulher (Baeriswyl and Christofori, 2009; Uzzan and others, 2004).

Num estudo em tumor de mama da mulher (Amin and others, 2012), comparou-se a imunorreatividade do c-kit com a densidade dos microvasos. Contudo os resultados não vão ao encontro do relatado por Pelosi e seus colaboradores (Pelosi and others, 2004), que verificaram que a imunorreatividade do c-kit era mais prevalente em carcinomas com maior DMV. No primeiro, (Amin and others, 2012), observou-se imunorreatividade do c-kit no carcinoma de mama invasivo em 28,6% dos casos, seria de esperar que a densidade dos microvasos fosse aumentada nesta amostra, o que não se verificou.

Atendendo a estes factos, o c-kit associado a marcadores de angiogénese tumoral poderá constituir um bom indicador de prognóstico para o tumor de mama, uma vez que o grau de malignidade é geralmente associado ao tamanho do tumor e presença de metástases à distância (Frederick L, 2002).

## Capítulo 2 – Objetivos

Com a realização desta dissertação pretende-se:

- Estudar a expressão do c-kit, CD31 e VEGF em tumores da mama da cadela através de estudos de imunohistoquímica.
- Analisar a relação da imunoexpressão destes marcadores com vários parâmetros clinicopatológicos.
- Estabelecer uma correlação entre os diferentes marcadores.

---

## Capítulo 3 – Material e Métodos

### 3.1. Descrição do material utilizado e sua origem

O presente estudo abrangeu 81 casos clínicos de neoplasias malignas da mama da cadela. As amostras foram recolhidas por excisão cirúrgica de cadelas de diversas raças e idades, sendo o material proveniente de dois hospitais veterinários da cidade do Porto.

### 3.2. Métodos

#### 3.2.1. Avaliação histopatológica

Através da análise dos tumores, registou-se o número de nódulos, conservando-se as amostras pelo método de fixação por imersão em formol tamponado a 10%. Cada peça foi contida em parafina sintética Shandon®, de acordo com a metodologia convencional. Os cortes dos blocos realizaram-se num micrótomo automático Leica® RM 2255, com 3µm de espessura para cada tumor. Estes foram colocados em lâminas de vidro e levados à estufa a 37°C para secagem. Seguidamente procedeu-se à desparafinação em xilol e hidratação em série decrescente de álcoois. Por último recorreu-se à coloração habitual de Hematoxilina-Eosina (H&E) para posterior diagnóstico histopatológico.

A classificação histológica dos tumores foi estabelecida pela observação sistemática das lâminas, de acordo com os métodos estabelecidos pela OMS (OMS) para tumores mamários caninos (Misdorp and others, 1999). A classificação tumoral foi realizada tendo em conta as suas características histológicas mais relevantes e, em situações em que o mesmo animal apresentava mais do que um tumor maligno, admitiu-se o tumor que apresentasse características histológicas de malignidade superior (elevado índice mitótico, elevado grau nuclear e elevado grau histológico de malignidade).

As preparações foram observadas por um microscópio Elipse E600 associado a uma câmara digital DXM 1200, Nikon®, do mesmo fabricante. As imagens de cada preparação foram obtidas por um programa informático característico para a atividade, Nikon ACT-1.

### 3.2.2. Avaliação clinicopatológica do tumor

Neste trabalho, foram estudadas variáveis clinicopatológicas como: raça do animal, idade no momento da excisão cirúrgica do tumor, tamanho do tumor, presença ou ausência de ulceração cutânea, tipo histológico, presença ou ausência de necrose, índice mitótico, grau nuclear, grau de diferenciação, grau histológico de malignidade, envolvimento dos gânglios linfáticos regionais e presença de êmbolos neoplásicos intravasculares.

Na análise do tamanho do tumor, admitiu-se T como sendo o diâmetro máximo do tumor principal, os tumores foram distribuídos em T<sub>1</sub> – tumores inferiores a 3 cm; T<sub>2</sub> – tumores entre 3-5 cm e T<sub>3</sub> – tumores superiores a 5 cm. Relativamente à invasão dos gânglios linfáticos regionais (gg), para a presença de metástases ganglionares considerou-se N<sub>+</sub> e N<sub>0</sub> para gânglios livres de metástases.

Para a análise do grau nuclear (GN), isto é, o pleomorfismo nuclear, admitiu-se GN I sempre que os núcleos observados apresentavam reduzidas alterações no tamanho e forma, relativamente à glândula mamária normal, nucléolos ocasionais e ligeiro pleomorfismo e coloração, GN II sempre que estas alterações eram moderadas, com presença de nucléolos proeminentes, pleomorfismo nuclear e núcleos hipercromáticos e GN III, quando os núcleos se apresentavam com forma irregular, de tamanho elevado e nucléolos frequentemente proeminentes.

Relativamente ao grau de diferenciação, nomeadamente a formação tubular, estabeleceram-se os seguintes critérios. GD I quando a formação de túbulos era superior a 75% da preparação e bem diferenciados, GD II sempre que a formação apresentava parâmetros moderados entre 10 e 75% da preparação, com locais de crescimento tumoral sólido, por fim, GD III no caso da formação tubular se encontrar nula ou mesmo inexistente, inferior a 10% da preparação.

Em relação ao índice mitótico (IM), (Quadro 1), este foi calculado, de acordo com Goldschmidt (Goldschmidt and others, 2011) pela contagem das mitoses existentes em 10 campos, com ampliação de 400x. Admitiu-se IM I no caso do número de mitoses se localizar entre 0 e 9, IM II sempre que o número de mitoses estava incluído entre 10 e 19 e IM III sempre que o número de mitoses era superior a 20.

O grau histológico de malignidade (GHM) foi determinado em concordância com o proposto por Goldschmidt (Goldschmidt and others, 2011) (Quadro 1), obtendo-se pela soma dos seguintes parâmetros: formação tubular (grau de diferenciação), pleomorfismo nuclear (grau nuclear) e índice mitótico. Deste modo, foi admitido GHM I quando o total do score se encontrava entre 3 e 5, GHM II quando o total do score se situava entre 6 e 7 e GHM III quando o total do score se compreendia entre 8 e 9.

**Quadro 1** | Avaliação do grau histológico de malignidade segundo Goldschmidt e colaboradores, 2011.

<b>Parâmetros considerados na determinação do GHM</b>	<b>Score</b>
<b>Formação tubular</b>	
Boa formação tubular	1
Moderada formação tubular	2
Baixa formação tubular	3
<b>Pleomorfismo nuclear</b>	
Baixo (células uniformes e regulares)	1
Moderado (aumento no tamanho e variabilidade celular)	2
Elevado (marcada variação)	3
<b>Contagem mitótica</b>	
0-9	1
10-19	2
Maior que 20	3
<b>Total do score</b>	<b>Grau de malignidade</b>
3-5	I
6-7	II
8-9	III

### 3.2.3. Técnica da imunohistoquímica

A metodologia utilizada para a avaliação imunohistoquímica foi a convencional para este tipo de técnicas. Foram realizados cortes seriados de cada tumor, com 3 µm de espessura e colocados em lâminas antecipadamente revestidas com uma solução de Silane (3-Aminopropyltriethoxysilane, Sigma®). Para avaliar a expressão proteica utilizou-se o método indireto da estreptavidina-biotina-peroxidase, usando como cromogéneo a solução de DAB.

Para otimizar os resultados foram realizados estudos prévios à técnica utilizada e só depois colocado o anticorpo primário em todas as amostras (Quadro 2). Com este tipo de análise foi inevitável a otimização da metodologia, nomeadamente no que respeita à necessidade de proteólise (para libertar epitopes mascarados pela fixação em formol).

Todos os soros utilizados foram diluídos em PBS (pH 7,4) e as incubações foram realizadas em câmara húmida horizontal, Bio Optica<sup>®</sup>.

**Quadro 2** | Soros usados, concentrações, tempo e temperatura de incubação e tratamentos efetuados para recuperação antigénica.

Anticorpo	Clone/ Origem	Diluição	Incubação	Recuperação antigénica	
				Tratamento proteolítico em meio ácido com tripsina (Merck <sup>®</sup> )	Tratamento térmico (Microondas 750 W)
<b>C-kit</b>	Policlonal Dako <sup>®</sup>	1:100	Durante a noite, a 4°C	10 min. a 37°C	3 ciclos de 5 min. em tampão citrato (0,01M, pH 7,4), intervalados de 1min. e 30 seg.
<b>CD31</b>	Clone JC70A Dako <sup>®</sup>	1:20	Durante a noite, a 4 °C	Não efetuado	3 ciclos de 5min. em tampão citrato (0,01 M, pH 7,4)
<b>VEGF</b>	Clone JH121, Thermo Scientific <sup>®</sup>	1:100	Durante a noite, a 4 °C	Não efetuado	2 ciclos de 5 min. em tampão citrato (0,0 1 M, pH 7,4)

### 3.2.3.1. Procedimento

A metodologia utilizada na técnica imunohistoquímica recorreu a um kit da Labvision<sup>®</sup>, designado de Sistema de deteção Ultravision de volume Anti-Polivalente, HRP.

Posteriormente à desparafinação em xilol (15min.) e à hidratação da secção do tecido numa série decrescente de álcoois (mantendo-se as lâminas cerca de 3 minutos em cada álcool), sujeitaram-se as preparações a um pré-tratamento de recuperação antigénica (Quadro 2). Depois do tratamento para recuperação antigénica, os cortes foram mantidos à temperatura ambiente, durante cerca de 30 minutos, para arrefecimento.

Para inibição das peroxidases endógenas utilizou-se peróxido de hidrogénio a 3% em água destilada, ao longo de 30 minutos. Após o procedimento, os cortes foram secos, identificados com caneta hidrofóbica e dispostos no suporte. Realizaram-se quatro lavagens consecutivas com tampão fosfato salino (PBS), de modo a extrair todo o peróxido de hidrogénio em demasia. A incubação foi realizada com o Bloqueador Ultra V, por um período de 5 minutos, para bloquear a coloração de fundo não específica. De acordo com os métodos estabelecidos, esta incubação não deve exceder os 10 minutos sob pena de a coloração pretendida se tornar reduzida.

Após a incubação com bloqueador, recorreu-se à incubação com anticorpos primários (anticorpos específicos), respeitando os valores de temperatura, tempo e diluições determinadas para cada anticorpo (Quadro 2). Seguidamente foi retirado o anticorpo primário com uma série de quatro lavagens com tampão PBS e os cortes foram incubados por 10 minutos com o Anti-Polivalente de Cabra Biotinilado (anticorpo secundário). Repetiu-se a lavagem com tampão PBS e, seguidamente, as lâminas foram incubadas com a Streptavidina Peroxidase durante 10 minutos. A revelação das lâminas foi efetuada depois de nova lavagem com tampão PBS e executada pela incubação das lâminas durante 10 minutos em solução aquosa de tetra-hidrocloreto de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) Novo Castra<sup>®</sup> na concentração de 1g/dm<sup>3</sup>, na qual se adicionou 2 µl de peróxido de hidrogénio (a 30%) por cada mililitro (mL) de solução. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente e em água destilada, sendo o contraste nuclear obtido por coloração com Hematoxilina de Gill, durante 1 minuto, seguido de uma lavagem em água corrente morna, durante cerca de 10 minutos. Por fim, realizou-se a desidratação (as lâminas são colocadas aproximadamente 3 minutos em cada álcool), a diafanização (colocação das lâminas em xilol) e a montagem das lâminas com Entellan (Merck<sup>®</sup>).

Este método imunohistoquímico utiliza controlos positivos específicos para as proteínas em estudo. Como controlo positivo usaram-se seções de mastocitomas cutâneos de grau III com positividade conhecida para o c-kit, Angiossarcoma de cão para o CD31 e seção de fígado para o VEGF. Como controlo negativo, o anticorpo primário foi substituído por PBS.

### 3.2.3.2. Métodos de quantificação da imunorreatividade

A imunorreatividade do c-kit foi avaliada de acordo com parâmetros já descritos em tumores cutâneos melanocíticos do cão (Gomes and others, 2012) e TMC (Williams and others, 1990) por determinação da percentagem das células marcadas positivamente e pela intensidade de marcação. A percentagem de células positivamente marcadas (extensão) foi definida como: negativo (0%), focal (1 – 19%), intermédia (20-49%), ou difusa (50%).

A intensidade de marcação foi definida como: negativa (-), fraca (+), moderada (++) ou forte (+++). Posteriormente, as duas pontuações foram combinadas (soma) e obteve-se um score final. Foi considerada baixa imunorreatividade para valores de score final iguais ou inferiores a 4 e alta imunorreatividade para valores de score final entre 5 e 6. O local de marcação foi determinado como citoplasmática, membranar ou ambos.

A avaliação da densidade de microvasos (DMV) pelo CD31 baseou-se num método aplicado num estudo de angiogénese nos TMC (Carvalho and others, 2011). Com ampliação de baixa potência (40 x), foram identificados duas áreas de maior intensidade de marcação. Posteriormente, com uma ampliação de 200x os microvasos foram contados. Utilizaram-se três campos diferentes de contagem em cada uma das áreas selecionadas (Schor and others, 1998). O somatório do número de microvasos (DMV) foi posteriormente calculado.

Para a marcação do VEGF foi utilizado um método previamente aplicado em estudos em TMC (Carvalho and others, 2011). Este método categoriza a marcação em: '0' (sem marcação de células tumorais); '+/-' (<10% da área do tumor marcada positivamente); '+' (10–25% de marcação), '++' (>25–50% de marcação) ou '+++' (>51% de marcação). Quando mais de 10% das células tumorais apresentava marcação positiva para o VEGF, a seção do tumor era considerada positiva na expressão de VEGF.

### 3.2.4. Análise Estatística

O programa utilizado para análise estatística foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, EUA), versão 19.0.

Todos os resultados foram apresentados em frequências absolutas e relativas e, para as variáveis quantitativas foi realizada a estatística descritiva com o cálculo da média, desvio padrão, erro padrão, máximo e mínimo.

Para relacionar as variáveis quantitativas aplicaram-se os testes de ANOVA (Análise de variância), o teste de Tukey para comparação múltipla de médias foi aplicado nos casos em que o seu uso se mostrou apropriado. Para relacionar as variáveis categóricas aplicaram-se os testes de Qui-quadrado. Foi ainda realizado Testes de correlação de Person de modo a comparar os valores dos marcadores em estudo.

Foram consideradas estatisticamente significativas, todas as associações com valores de  $P < 0,05$ .

---

## Capítulo 4 – Resultados

### 4.1. Análise descritiva da amostra em estudo

#### 4.1.1. Variáveis clinicopatológicas

Para se perceberem especificidades referentes à progressão e biologia do tumor de mama da cadela, determinaram-se diversas características dos animais e das amostras tumorais. No quadro 3, estão descritas as frequências absolutas e relativas alusivas a essas determinadas características.

Sendo toda a amostra referente a tumores malignos, as variáveis analisadas foram: o grau nuclear, o grau de diferenciação, o índice mitótico, o grau histológico de malignidade, o envolvimento dos gânglios linfáticos regionais e a presença de êmbolos neoplásicos intravasculares.

#### 4.1.2. Classificação histológica dos tumores

Como referido, a amostra em estudo apenas inclui neoplasias malignas da mama da cadela, estando presentes diversos tipos tumorais, num total de 81 tumores (n=81). O grupo tumoral mais frequente foi o Carcinoma tubulo-papilar (46,9%), seguido do Carcinoma complexo e Carcinosarcoma, ambos presentes em 17,3%. A restante percentagem distribui-se por Carcinoma anaplásico (3,7%), Carcinoma sólido (9,9%) e Tumor misto maligno (4,9%).

Quadro 3| Características da amostra, frequências absolutas e percentagens.

Variáveis	n	%
<b>Idade (n=58)</b>		
< 10 anos	29	50,0
> 10 anos	29	50,0
<b>Raça (n=81)</b>		
SRD	51	62,9
Caniche	5	6,2
Lavrador	3	3,7
Pinscher	3	3,7
Cocker	2	2,5
Epagneul	2	2,5
Boxer	1	1,2
Cão d'água	1	1,2
Dalmata	1	1,2
Domerman	1	1,2
Gold Retriever	1	1,2
Husky	1	1,2
Lhasa Apso	1	1,2
Pastor Alemão	1	1,2
Pekinois	1	1,2
Podengo	1	1,2
Poodle	1	1,2
Scottish terrier	1	1,2
Sharpei	1	1,2
Terra Nova	1	1,2
Yorkshire	1	1,2
<b>Tamanho (n=79)</b>		
T <sub>1</sub> – <3cm	29	36,7
T <sub>2</sub> – 3-5cm	23	29,1
T <sub>3</sub> – >5cm	27	34,2
<b>Ulceração (n=81)</b>		
Ausente	57	70,4
Presente	24	29,6
<b>Necrose (n=80)</b>		
Ausente	34	42,5
Presente	46	57,5
<b>Índice mitótico (IM) (n=81)</b>		
I (<10)	23	28,4
II (10-20)	29	35,8
III (>20)	29	35,8
<b>Grau nuclear (GN) (n=81)</b>		
I	2	2,5
II	30	37,0
III	49	60,5
<b>Grau diferenciação (GD) (n=81)</b>		
I	10	12,3
II	25	30,9
III	46	56,8
<b>Grau histológico de malignidade (GHM) (n=81)</b>		
I		
II	21	25,9
III	20	24,7
	40	49,4

<b>Êmbolos vasculares (n=81)</b>		
Ausente	56	69,1
Presente	25	30,9
<b>Invasão dos gl. linfáticos (n=81)</b>		
Ausente	50	61,7
Presente	31	38,3

n – número de amostras; % – percentagem

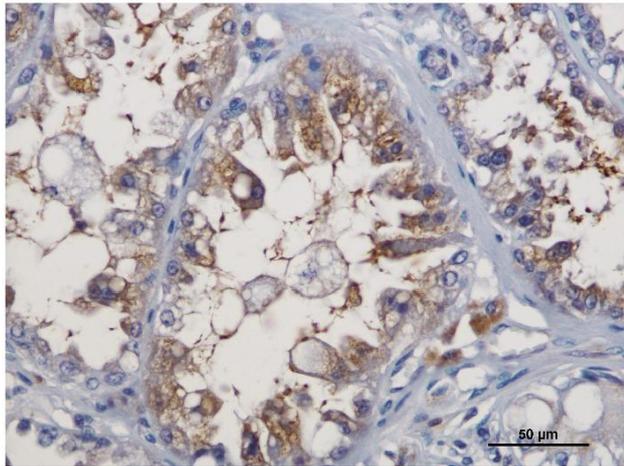
**Quadro 4|** Diferenciação dos tipos histológicos malignos.

Diagnóstico histológico	Número de amostras
Carcinoma anaplásico	3
Carcinoma complexo	18
Carcinoma sólido	8
Carcinoma tubulo-papilar	38
Carcinossarcoma	14
<b>Total da amostra</b>	<b>81</b>

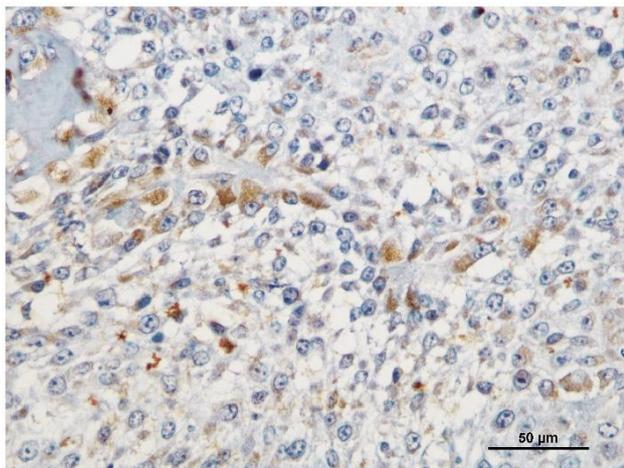
## 4.2. Análise comparativa entre os marcadores tumorais

### 4.2.1. Imunorreatividade do c-kit

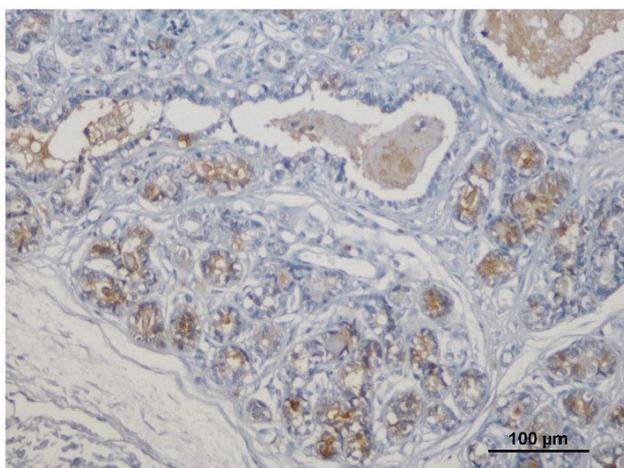
A imunoexpressão do c-kit foi visualizada em 67 casos (82,7%), nos restantes 14 casos não foi conseguida uma marcação consistente. A imunomarcação mostrou-se principalmente citoplasmática (92,6%, n=75), com determinados casos em que a expressão era simultaneamente citoplasmática e membranar (7,4%, n=6) (Figura 1). Na área intratumoral as células marcadas eram preferencialmente epiteliais, contudo, foi também observada imunorreatividade em células mioepiteliais malignas em carcinossarcoma (Figura 2). Na glândula mamária anexa não-tumoral observou-se expressão de c-kit no epitélio mamário alveolar e ductal em proporções menores comparativamente à registada no tumor (Figura 3).



**Figura 1** | Imunorreatividade do c-kit em carcinoma tubulopapilar; marcação simultaneamente citoplasmática e membranar; bar = 50 μm. (Escala=50 μm).



**Figura 2** | Imunorreatividade do c-kit em carcinosarcoma; (Escala=50 μm).



**Figura 3** | Imunorreatividade do c-kit na glândula mamária anexa não-tumoral; (Escala=100 μm).

Na avaliação da extensão, apenas 2 casos apresentaram extensão negativa (3,0%, n=2). A maioria dos tumores apresentava extensão difusa (64,2%, n=43), alguns tumores com extensão intermédia (26,8%, n=18), enquanto os tumores com extensão focal foram mais raros (6,0%, n=4). Para a intensidade, houve uma distribuição relativamente homogênea entre duas categorias: forte (+++) (46,3%, n=31) e moderada (++) (37,3%, n=25), enquanto que os tumores com fraca intensidade (13,4%, n = 9) foram menos frequentes e com intensidade “0” foram registados 2 casos (3,0%, n=2) (Quadro 5).

**Quadro 5|** Imunorreatividade para a intensidade de C-kit e extensão de C-kit.

		<b>n</b>	<b>Média %</b>
<b>C-kit intensidade</b>	<b>0</b>	2	3,0
	<b>+</b>	9	13,4
	<b>++</b>	25	37,3
	<b>+++</b>	31	46,3
<b>C-kit extensão</b>	<b>Negativa</b>	2	3,0
	<b>Focal</b>	4	6,0
	<b>Intermédia</b>	18	26,8
	<b>Difusa</b>	43	64,2
<b>C-kit score</b>	<b>1</b>	44	65,7
	<b>2</b>	23	34,3

n – número de amostras; % – percentagem

#### **4.2.2. Imunorreatividade do VEGF**

A avaliação da imunorreatividade do VEGF foi possível em 75 casos, dos quais, 18 casos (24,0%) apresentaram imunorreatividade baixa, ao passo que 57 casos (76,0%) apresentaram elevada imunorreatividade.

A imunoexpressão do VEGF identificada no nosso trabalho seguiu os padrões normais referenciados em outros trabalhos (Queiroga and others, 2005a) e encontra-se expressa detalhadamente no quadro 6. Observou-se imunoexpressão do VEGF frequentemente no citoplasma das células tumorais com padrão granulado, sendo mais intensa em células epiteliais neoplásicas de revestimento dos dutos ou formações tubulopapilares.

Ocasionalmente as células do estroma manifestaram positividade fraca, mas sempre menos intensa que a positividade das células epiteliais neoplásicas.

**Quadro 6** | Imunorreatividade para o VEGF.

		n	Média %
VEGF score	Baixo	18	24,0
	Alto	57	76,0

n – número de amostras; % – percentagem

#### 4.2.3. Imunorreatividade do CD31

A imunoexpressão do CD31 apenas se observou em 77 casos, nomeadamente em células endoteliais como um ligeiro contorno castanho dos microvasos e, ocasionalmente, marcação nos macrófagos. Apresentou-se com padrões iguais de imunomarcação referenciados em outros estudos (Queiroga and others, 2005a). O número médio ( $\pm$ se) de CD31 foi 39,12 ( $\pm$ 20,7), mínimo 8 e máximo 106, como mostra o quadro 7.

**Quadro 7** | Imunorreatividade para o CD31.

	n	Média	se	Mínimo	Máximo
CD31	77	39,12	2,363	8	106

n – número de amostras; se – erro padrão

### 4.3. Marcadores e variáveis clinicopatológicas

#### 4.3.1. Imunorreatividade do c-kit: Relação com variáveis clinicopatológicas

A imunorreatividade do c-kit apresenta significância estatística com grande maioria das variáveis clinicopatológicas estudadas. Em tumores com grau de malignidade superior e no que diz respeito a parâmetros tumorais, como é exemplo o índice mitótico ( $P=0,001$ ), o grau nuclear ( $P=0,001$ ), o grau diferenciação ( $P=0,001$ ), o grau histológico de malignidade ( $P<0,001$ ), a presença de êmbolos vasculares ( $P=0,004$ ) e a invasão dos gânglios linfáticos

( $P < 0,001$ ), estes apresentaram valores de expressão do c-kit estatisticamente significativos.

Parâmetros como o tamanho, a ulceração, o tipo histológico e a necrose não apresentam relação estatisticamente significativa com a expressão do c-kit. No quadro 8 encontram-se detalhados os resultados obtidos.

**Quadro 8** | Associação entre o c-kit e os parâmetros clinicopatológicos.

Variáveis	C-kit baixo n	C-kit alto n	P
<b>Tamanho</b>			
T <sub>1</sub>	7	16	<b>0,782</b>
T <sub>2</sub>	6	15	
T <sub>3</sub>	8	13	
<b>Ulceração</b>			
Ausente	16	32	<b>0,577</b>
Presente	5	14	
<b>Tipo Histológico</b>			
Carcinoma anaplásico	0	2	<b>0,146</b>
Carcinoma complexo	7	6	
Carcinoma sólido	0	6	
Carcinoma tubulo-papilar	12	21	
Carcinossarcoma	2	11	
<b>Necrose</b>			
Ausente	11	18	<b>0,233</b>
Presente	9	28	
<b>IM</b>			
I	10	10	<b>0,001</b>
II	10	13	
III	1	23	
<b>GN</b>			
I	1	1	<b>0,001</b>
II	15	12	
III	5	33	
<b>Grau diferenciação (GD)</b>			
I	2	2	<b>0,001</b>
II	10	12	
III	5	32	
<b>GHM</b>			
I	9	9	<b>&lt;0,001</b>
II	10	8	
III	2	29	
<b>Êmbolos vasculares</b>			
Ausente	20	28	<b>0,004</b>
Presente	1	18	
<b>Invasão dos gl. linfáticos</b>			
Ausente	20	23	<b>&lt;0,001</b>
Presente	1	23	

n – número de amostras; P – significância estatística. Os valores médios com diferentes letras em superscript denotam diferenças estatísticas significativas em cada item considerado – Teste Post Hoc tuckey ( $p < 0,001$ )

### 4.3.2. Imunorreatividade do VEGF: Relação com variáveis clinicopatológicas

A imunorreatividade do VEGF foi também cruzada com as diferentes variáveis clinicopatológicas, de forma obter relações estatísticas significativas. No quadro seguinte encontram-se pormenorizados os resultados obtidos.

**Quadro 9** | Associação entre o índice de proliferação do VEGF e os parâmetros clinicopatológicos.

Variáveis	VEGF baixo n	VEGF alto n	P
<b>Tamanho</b>			
T <sub>1</sub>	10	17	
T <sub>2</sub>	6	16	<b>0,056</b>
T <sub>3</sub>	2	22	
Ausente			
<b>Ulceração</b>			
Ausente	16	37	<b>0,051</b>
Presente	2	20	
<b>Tipo Histológico</b>			
Carcinoma anaplásico	0	3	
Carcinoma complexo	6	11	<b>0,472</b>
Carcinoma sólido	0	6	
Carcinoma tubulo-papilar	10	25	
Carcinossarcoma	2	12	
<b>Necrose</b>			
Ausente	9	23	<b>0,358</b>
Presente	8	34	
<b>IM</b>			
I	14	8	
II	4	22	<b>&lt;0,001</b>
III	0	27	
<b>GN</b>			
I	0	2	
II	13	15	<b>0,002</b>
III	5	40	
<b>GD</b>			
I	3	6	
II	11	14	<b>0,005</b>
III	4	37	
<b>GHM</b>			
I	10	10	
II	8	11	<b>&lt;0,001</b>
III	0	36	
<b>Êmbolos vasculares</b>			
Ausente	18	37	<b>0,003</b>
Presente	0	20	
<b>Invasão dos gl. linfáticos</b>			
Ausente	18	30	<b>&lt;0,001</b>
Presente	0	27	

n – número de amostras; P – significância estatística. Os valores médios com diferentes letras em superscript denotam diferenças estatísticas significativas em cada item considerado – Teste Post Hoc Bonferoni ( $p < 0,001$ )

Analisando o quadro a supra, podemos inferir que o VEGF encontra-se estatisticamente associado com o índice mitótico ( $P < 0,001$ ), o grau nuclear ( $P = 0,002$ ), o grau de diferenciação ( $P = 0,005$ ), o grau histológico de malignidade ( $P < 0,001$ ), presença de êmbolos vasculares ( $P = 0,003$ ) e o comprometimento dos gânglios linfáticos regionais ( $P < 0,001$ ).

Os valores de alta imunorreatividade do VEGF associados às variáveis clinicopatológicas referidas anteriormente, foram observados na grande maioria dos tumores analisados neste estudo.

De salientar que os valores obtidos para o tamanho e a ulceração, encontram-se muito próximos do que é estatisticamente reconhecido como significativo ( $P = 0,056$  e  $P = 0,051$ , respetivamente), isto é, valores próximos de 0,05.

Pela análise do quadro 10, é ainda revelado que o VEGF não manifesta associação significativa em termos estatísticos com o tipo histológico e a necrose, apresentando significâncias estatísticas superiores a 0,05 para ambos os casos.

### 4.3.3. Imunorreatividade do CD31: Relação com variáveis clinicopatológicas

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que a imunorreatividade do CD31 está relacionada com diversos parâmetros clinicopatológicos avaliados neste estudo. As associações obtidas encontram-se sumariadas no quadro 10.

**Quadro 10|** Associação entre o CD31 e os parâmetros clinicopatológicos.

Variáveis	n	CD31		
		Média	se	p
<b>Tamanho</b>				
T <sub>1</sub>	28	30,00 <sup>a</sup>	3,151	<b>&lt;0,001</b>
T <sub>2</sub>	22	34,50 <sup>a</sup>	3,425	
T <sub>3</sub>	25	53,08 <sup>b</sup>	4,438	
<b>Ulceração</b>				
Ausente	54	34,67	2,487	<b>0,003</b>
Presente	23	49,57	4,746	
<b>Tipo Histológico</b>				
Carcinoma anaplásico	3	66,67 <sup>b</sup>	19,802	<b>0,005</b>
Carcinoma complexo	17	28,23 <sup>a</sup>	5,429	
Carcinoma sólido	6	55,17 <sup>ab</sup>	5,735	
Carcinoma tubulo-papilar	37	38,16 <sup>ab</sup>	3,248	
Carcinossarcoma	14	43,50 <sup>ab</sup>	4,643	
<b>Necrose</b>				
Ausente	33	31,73	2,835	<b>0,004</b>
Presente	43	45,33	3,345	
<b>IM</b>				
I	23	23,04 <sup>a</sup>	3,137	<b>&lt;0,001</b>
II	27	40,44 <sup>b</sup>	4,227	
III	27	51,48 <sup>c</sup>	2,680	
<b>GN</b>				
I	2	35,00 <sup>ab</sup>	6,000	<b>&lt;0,001</b>
II	29	26,31 <sup>a</sup>	2,719	
III	46	47,37 <sup>b</sup>	3,004	
<b>GD</b>				
I	10	26,30 <sup>a</sup>	4,015	<b>&lt;0,001</b>
II	25	28,88 <sup>a</sup>	3,450	
III	42	48,21 <sup>b</sup>	3,066	
<b>GHM</b>				
I	21	26,71 <sup>a</sup>	3,327	<b>&lt;0,001</b>
II	19	24,05 <sup>a</sup>	2,981	
III	37	53,89 <sup>b</sup>	2,653	
<b>Êmbolos vasculares</b>				
Ausente	56	32,63	2,518	<b>&lt;0,001</b>
Presente	21	56,43	3,273	
<b>Invasão dos gl. linfáticos</b>				
Ausente	49	30,10	2,494	<b>&lt;0,001</b>
Presente	28	54,89	3,065	

n – número de amostras; se – erro padrão; p – significância estatística. Os valores médios com diferentes letras em superscript denotam diferenças estatísticas significativas em cada item considerado – Teste Post Hoc Tuckey ( $p < 0,001$ )

De acordo com a análise do quadro acima, a imunorreatividade do CD31 apresentou associação estatisticamente significativa com o tamanho ( $P<0,001$ ), a ulceração ( $P=0,003$ ), o tipo histológico ( $P=0,005$ ), a necrose ( $P=0,004$ ), o índice mitótico ( $P<0,001$ ), o grau nuclear ( $P<0,001$ ), o grau de diferenciação ( $P<0,001$ ), o grau histológico de malignidade ( $P<0,001$ ) e o comprometimento dos gânglios linfáticos regionais ( $P<0,001$ ).

Os tumores que apresentaram tamanho superior ( $T_3$ ), manifestaram níveis de CD31 superiores, quando comparados com tamanhos inferiores ( $T_1$  e  $T_2$ ), como pode ser observado no quadro 9.

Relativamente ao tipo histológico, os tumores diagnosticados histologicamente como carcinomas anaplásicos, manifestaram valores de imunorreatividade do CD31 superiores, tendo os tumores mistos malignos apresentado valores médios mais baixos.

Os tumores com maior índice mitótico apresentaram níveis de imunomarcção do CD31 mais elevados, estando os valores mais elevados relacionados aos tumores com índice mitótico III.

Os níveis de imunorreatividade do CD31 aumentaram de acordo com o aumento do grau nuclear, isto é, o valor mais elevado é referente ao GN III. O mesmo se verifica com o grau de diferenciação, em que os níveis mais elevados de imunomarcção do CD31 manifestaram-se no GD III.

Os valores superiores de imunorreatividade do CD31 verificam-se no maior grau histológico de malignidade (GHM III).

De acordo com presença de êmbolos vasculares e invasão dos gânglios linfáticos, estes resultados são também indicadores do comprometimento do CD31 nestes parâmetros clinicopatológicos.

Pela análise detalhada do quadro 10, pode salientar-se que todas as variáveis clinicopatológicas se encontram estatisticamente relacionadas com o CD31.

#### 4.4. Relação entre c-kit, VEGF e CD31

Na tentativa de estabelecer uma possível relação entre os valores médios de c-kit, VEGF e CD31, foram realizados testes de correlação de Person. Os resultados obtidos encontram-se sumariados no quadro 11.

**Quadro 11|** Relação entre os valores médios do c-kit, CD31 e VEGF – Correlações de Person

		Correlações de Person		
		C-kit	CD31	VEGF
<b>C-kit</b>	n	67	66	64
	r	1,0	0,470	0,322
	p	-	0,000	0,009
<b>VEGF</b>	n	64	75	75
	r	0,322	0,780	1,0
	p	0,009	0,000	-
<b>CD31</b>	n	66	77	75
	r	0,470	1,0	0,780
	p	0,000	-	0,000

n – número de amostras; r – coeficiente de correlação; p – significância estatística

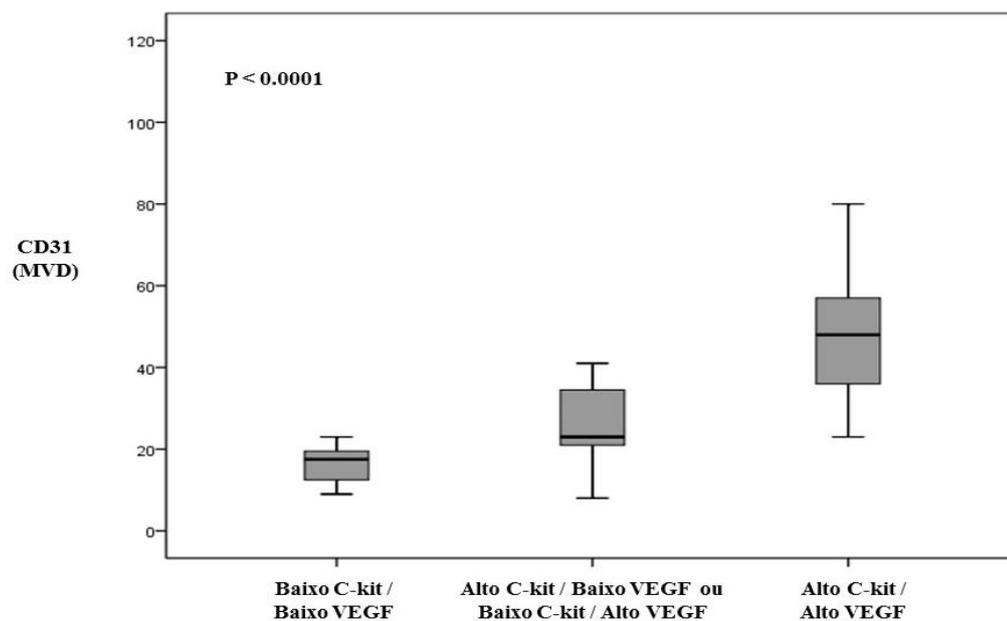
Quando comparado o c-kit com o VEGF, este mostrou correlação positiva ( $r=0,322$ ;  $P=0,009$ ).

Pela análise do quadro 11, podemos inferir que também existe correlação positiva ( $r=0,470$ ;  $P<0,001$ ) entre o c-kit e o CD31.

#### 4.5. Associação do c-kit com VEGF e densidade de microvasos (CD31)

Para evidenciar uma possível associação dos grupos c-kit e VEGF com a densidade de microvasos (CD31), estabeleceu-se um grupo contendo c-kit e VEGF e comparou-se com a DMV. Os resultados encontram-se no gráfico seguinte.

**Gráfico 1** | Associação do c-kit/VEGF com a DMV em tumores mamários malignos do cão.



Verificou-se que tumores que apresentavam imunorreatividade alta de c-kit e VEGF, revelavam maior densidade de microvasos ( $P < 0,001$ ).

#### 4.6. Grupos c-kit/ angiogénese e relação com variáveis de agressividade tumoral

Por fim tentou-se estabelecer uma relação entre o grupo c-kit angiogénese e as variáveis de agressividade tumoral, nomeadamente grau histológico de malignidade, presença de êmbolos e invasão dos gânglios linfáticos regionais. Os resultados encontram-se esquematizados no quadro 12.

**Quadro 12** – Relação entre os grupos c-kit/angiogénese com as variáveis de agressividade tumoral.

Variáveis de Agressividade Tumoral		Marcadores Moleculares			
		C-kit / Angiogénese			
		Baixo (I)	Intermédio (II)	Alto (III)	<i>p</i>
GHM	Baixo	9	23	2	<0,001
	Alto	0	6	24	
Êmbolos vasculares	Ausente	9	26	12	<0,001
	Presente	0	3	14	
Invasão gânglios linfáticos	Ausente	9	24	9	<0,001
	Presente	0	5	17	

De acordo com os resultados obtidos, pode inferir-se que valores elevados de GHM estão relacionados com níveis mais elevados de c-kit/angiogénese (II e III), apresentando significância estatística ( $P < 0,001$ ).

Quando comparado com a presença de êmbolos vasculares, os valores mais elevados de c-kit/angiogénese (II e III), apresentam significância estatística ( $P < 0,001$ ).

Por fim, quando se verificam valores elevados do grupo c-kit/angiogénese (II e III), estão associados à presença de metástases nos gânglios linfáticos regionais ( $P < 0,001$ ).

---

## Capítulo 5 – Discussão

Os tumores de mama da cadela são muito frequentes na espécie, estando entre as neoplasias com maiores níveis de ocorrência (Egenvall and others, 2005). As patologias em cães são já alvo de investigação, contudo os tumores de mama da cadela apresentam reduzidos métodos de prognóstico, pelo que são necessários mais estudos que possam verificar a existência de novas metodologias (Lee and others, 2004).

Sendo a investigação clinicopatológica existente pouco direcionada para o prognóstico e etiologia destes tumores, torna-se necessário o estudo mais pormenorizado de fatores de diagnóstico que possam auxiliar na prática clínica (Lee and others, 2004).

Os estudos em tumores de mama em humanos são mais frequentes e constantemente alvo de novas investigações com o propósito de se definir novas técnicas de prognóstico. Contudo em medicina veterinária a realidade é um pouco diferente, existe apenas um estudo que se baseou na utilização do c-kit como marcador tumoral, que seja do nosso conhecimento.

Deste modo, este trabalho pretende responder a questões que possam vir a ter implicação na tumorigénese mamária: Estudar a expressão do c-kit, CD31 e VEGF em tumores da mama da cadela através de estudos de imunohistoquímica, estabelecer relações entre os marcadores moleculares e os parâmetros clinicopatológicos de malignidade tumoral, avaliar a possibilidade de utilização diagnóstica da imunomarcação pelo c-kit, VEGF e CD31 em tumores malignos da cadela.

Ao longo do processo de desenvolvimento do tumor de mama da cadela, as células utilizam diversos mecanismos que as permitem adquirir capacidades tumorais com o intuito de sobreviverem e proliferarem (Ben-Baruch, 2005; Hanahan and Weinberg, 2011). O c-kit está intimamente relacionado com estes mecanismos, uma vez que as vias utilizadas são despoletadas por fatores de crescimento que se ligam a recetores de superfície com domínios tirosina-cínase (Brunetti and others, 2014; Huang and others, 2008; Lemmon and Schlessinger, 2010; Tsuda and others, 2005).

Com este trabalho, podemos corroborar estudos anteriores, quer em humanos quer na cadela, que relatam uma sobre-expressão do c-kit em tumores mamários e apresentam um papel fundamental na progressão tumoral (Brunetti and others, 2014; Carvalho and others, 2011; Georgiannos and others, 2003; Tsuda and others, 2005).

No nosso estudo foi possível visualizar imunorreatividade do c-kit em 82,7% dos casos, esta marcação foi consistente e maioritariamente citoplasmática (92,6%), por vezes

---

citoplasmática e membranas (7,4%). Estes dados vão ao encontro do referido por Brunetti e seus colaboradores (2014) que num estudo em tumores de mama da cadela verificaram uma distribuição equivalente na marcação celular pelo c-kit.

Quando comparado com os parâmetros clinicopatológicos, a imunorreatividade do c-kit mostrou-se estatisticamente significativa com a maioria das variáveis. Como referido anteriormente, a expressão do c-kit em cancro de mama, quer em humanos quer em cães, é ainda um assunto controverso. Segundo um estudo realizado por Amin e seus colaboradores em cancro de mama da mulher (Amin and others, 2012), a perda de imunorreatividade do c-kit foi associada a indicadores de agressividade tumoral, nomeadamente tamanho, grau tumoral e metastização. Por outro lado, Kondi-Pafiti e colaboradores (Kondi-Pafiti and others, 2010), relataram elevada expressão do c-kit em células com alto grau tumoral.

A imunexpressão do c-kit foi já estudada em tumores melanocíticos (Gomes and others, 2012). Os resultados obtidos apontam a perda de expressão de c-kit em melanomas malignos como um critério de agressividade do tumor, indicando que o c-kit pode ser útil no diagnóstico deste tipo de tumores.

Em tumores de mama da cadela, que seja do nosso conhecimento, há apenas um estudo que procura relacionar a imunexpressão do c-kit com parâmetros de progressão do tumor de mama, segundo os seus resultados, existe correlação entre a expressão do c-kit e a atividade de proliferação do tumor, mostrando que os inibidores de tirosina cínase podem constituir uma boa via na terapia de neoplasias mamárias na cadela (Brunetti and others, 2014).

O índice mitótico é frequentemente referido como indicador ímpar no prognóstico tumoral (Queiroga and Lopes, 2002). Ainda assim ocorrem erros de contagens mitóticas que podem influenciar o prognóstico, principalmente em tumores com crescimento acentuado, pelo que deve ser determinado em conjunto com outros fatores. Neste trabalho a imunorreatividade do c-kit foi associada a um índice mitótico mais elevado (III), isto é, a marcação do c-kit aumentava quando se contabilizavam maior número de mitoses celulares ( $P=0,001$ ). Segundo Kiupel (Kiupel and others, 2011; Kiupel and others, 2004), num estudo realizado em mastocitomas cutâneos do cão, índices mitóticos elevados estão associados mastocitomas de grau II e com comportamento benigno. Estes dados estão em discordância com os nossos achados em tumores malignos, porém são poucos os estudos que nos permitem estabelecer ligação da expressão do c-kit com o número de mitoses existentes. O mesmo se passa com a determinação do grau nuclear ( $P=0,001$ ) que por apresentar padrões diferentes,

---

torna difícil uma observação (Liu and others, 1998), no nosso estudo pudemos relacionar o alto grau nuclear com percentagens elevadas de expressão do c-kit.

De acordo com o grau de diferenciação tumoral, no presente estudo associamos o elevado GD à elevada expressão do c-kit ( $P=0,001$ ), este facto não foi relatado em estudos de tumor de mama da mulher, pelo contrário, elevados valores de GD associam-se à perda de imunorreatividade deste marcador (Amin and others, 2012).

Em relação ao grau histológico de malignidade do tumor, que determina a formação tubular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico, apresenta forte relacionamento com o tipo histológico (Karayannopoulou and others, 2005; Misdorp, 2002a), contudo no nosso estudo apenas o grau histológico de malignidade se desenvolveu proporcionalmente ao aumento da imunoeexpressão do c-kit ( $P<0,001$ ).

No que respeita à presença de êmbolos vasculares e à invasão dos gânglios linfáticos estes apresentaram-se relacionados estatisticamente com a expressão do c-kit ( $P=0,004$  e  $P<0,001$ , respetivamente). Mais uma vez, de acordo com Amin (2012), em TMM houve relação estatística entre estes fatores com a diminuição de expressão do c-kit. É importante referir que a incapacidade clínica na deteção de metástases à distância ou regionais está muito carente de uma observação clínica contínua, o que em muitos dos casos pode não estar presente. De salientar que a eutanásia, frequentemente pedida pelos proprietários dos animais, interrompe o desenvolvimento da doença (Queiroga and Lopes, 2002).

As restantes variáveis clinicopatológicas não mostraram relação estatística com a imunoeexpressão do c-kit, porém é de referir que a falta de informação e estudos em cadela se torna preponderante na impossibilidade de uma discussão mais adequada dos nossos resultados (Queiroga and Lopes, 2002).

O VEGF é produzido frequentemente em tumores da mama e pulmão de humanos, por isso é um fator angiogénico importante para o estudo dos TMC. A sua expressão está associada com o CD31, isto é, com a densidade de microvasos. No presente estudo a expressão do VEGF apresentou relação estatística com o índice mitótico ( $P<0,001$ ), grau nuclear ( $P=0,002$ ), grau de diferenciação ( $P=0,005$ ), grau histológico de malignidade ( $P<0,001$ ), presença de êmbolos vasculares ( $P=0,003$ ) e invasão dos gânglios linfáticos ( $P<0,001$ ). De salientar que parâmetros como tamanho e ulceração encontram-se muito próximos do que é estatisticamente reconhecido como significativo ( $P=0,056$  e  $P=0,051$ , respetivamente). Vários estudos em tumores de mama em humanos, revelam relações estatísticas entre o VEGF e algumas das variáveis clinicopatológicas, entre elas a infiltração

---

de macrófagos e vascularização tumoral. Isto pode indicar a possibilidade da expressão deste marcador estar intimamente relacionada com parâmetros de agressividade tumoral (Leek, 2000).

De acordo com os dados obtidos, também a imunorreatividade do CD31 apresentou associação estatisticamente significativa com o tamanho do tumor ( $P<0,001$ ), a ulceração ( $P=0,003$ ), o tipo histológico ( $P=0,005$ ), a necrose ( $P=0,004$ ), o índice mitótico ( $P<0,001$ ), o grau nuclear ( $P<0,001$ ), o grau de diferenciação ( $P<0,001$ ), o grau histológico de malignidade ( $P<0,001$ ) e o comprometimento dos gânglios linfáticos regionais ( $P<0,001$ ).

A densidade de microvasos é já assumida como método de prognóstico de tumores em cadela (TMC e melanomas) (Molteni and others, 2007; Restucci and others, 2002). Preziosi (Preziosi and others, 2004) verificou associação significativa entre o grau histológico e a densidade de microvasos. Deste modo podemos inferir que este seja um bom indicador de malignidade.

Um estudo de 2010 permite concluir que, tanto a expressão do VEGF, como a expressão do CD31 estão relacionadas com diversas variáveis clinicopatológicas. Estes resultados remetem-nos para a participação positiva da angiogénese na atividade tumoral de tumores de mama da cadela (Queiroga and others, 2010).

Com a perspectiva de estabelecer relação entre os valores médios de C-kit, VEGF e CD31, foram realizados testes de correlação de Person. Os resultados obtidos permitiram concluir que, quando comparado o c-kit com o VEGF, este mostrou correlação positiva ( $r=0,322$ ;  $P=0,009$ ), o mesmo se passou com o CD31 ( $r=0,470$ ;  $P<0,001$ ).

Assim, com os dados obtidos neste estudo, podemos verificar uma correlação positiva entre a elevada expressão do c-kit e o VEGF. Pela comparação com os demais estudos, a angiogénese é fundamental no crescimento e disseminação dos tumores mamários com características malignas (Joanne and Rak, 2003; Leek, 2000). Tanto em tumor de mama da mulher (Joanne and Rak, 2003) como em TMC (Carvalho and others, 2011; Carvalho and others, 2014; Estrela-Lima and others, 2010), a inclusão de fatores pro-angiogénicos como o VEGF contribui para a formação de novos vasos sanguíneos e está relacionada com a agressividade tumoral. De acordo com os nossos resultados, pode afirmar-se a possível existência de vias de sinalização comuns entre o c-kit e o VEGF que se mostram fundamentais na malignidade tumoral e mau prognóstico (Carvalho and others, 2015).

Por outro lado, nossos resultados vêm assim contrariar o defendido por Amin (Amin and others, 2012), que evidenciava um aumento da DMV quando a imunoexpressão do c-kit era inferior. Contudo, Pelosi (Pelosi and others, 2004) corrobora os nossos achados, uma vez

---

que verificou em carcinoma de células escamosas do pulmão, uma maior imunorreatividade do c-kit associada a elevada densidade de microvasos.

A escassez de estudos em TMC e a grande controvérsia dos resultados em tumor de mama da mulher (Tsuda and others, 2005; Tsutsui and others, 2006b), limita possíveis comparações que se poderiam efetuar com os nossos resultados. Em cancro de pulmão de pequenas células (CPPC) foi demonstrado que a ativação do c-kit no fator de células estaminais (SCF) leva à predominância da mediação de HIF-1- $\alpha$ . Este fator por induzir hipóxia na expressão do VEGF e inibição da sinalização do c-kit, pode resultar na inibição da angiogénese do tumor (Litz and Krystal, 2006).

Nos últimos anos o interesse pela descoberta de novos fatores de prognóstico nos TMC tem aumentado, talvez pela elevada predominância de neoplasmas malignos (cerca de 50%). Na verdade, o grande impulso para o estudo prende-se à inevitável associação entre tumores de mama na mulher e TMC, considerando a espécie canina um bom modelo biológico (Lee and others, 2004; Mottolise and others, 1994; Raynaud and others, 1981; Vail and MacEwen, 2000). A presença de fatores de prognóstico que possam auxiliar a avaliação da tumorogénese, aumenta a possibilidade de um bom prognóstico, de um tratamento adequado e de uma eventual cura. Deste modo, podemos concluir que é essencial relacionar os vários marcadores tumorais com as variáveis clinicopatológicas com o intuito de minimizar possíveis erros diagnósticos.

Assim, é uma preocupação constante a determinação de novos e mais eficazes indicadores de prognóstico para o TMC, para auxílio na medicina veterinária (Queiroga e Lopes, 2002). São várias as hipóteses, como análise de ploidia do ADN, imunoexpressão de recetores de estrogénio, análise imunohistoquímica de vários marcadores moleculares, que assistem a prática clínica para o entendimento de cada tumor mamário (Queiroga and Lopes, 2002; Sorenmo, 2003).

Como referido, a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, isto é, a angiogénese é um processo de extrema importância no desenvolvimento e metastização das neoplasias (Amin and others, 2012; Robinson and Stringer, 2001). Nos TMC, a função da angiogénese na progressão neoplásica é estudada pela deteção da densidade de microvasos e do fator de crescimento vascular endotelial, sugerindo que estes podem estar presentes na transformação maligna (Amin and others, 2012; Preziosi and others, 2004; Ranieri and others, 2003; Rebuzzi and others, 2007).

Perante os nossos dados, a determinação da malignidade tumoral não deve ser individualizada a um só parâmetro. Um conjunto de dados, como a já demonstrada expressão

do c-kit associada ao grau histológico de malignidade, à presença de êmbolos vasculares e presença de metástases nos gânglios linfáticos regionais, poderão fornecer informações mais concisas e determinantes na indicação terapêutica.

---

## Capítulo 6 – Conclusão

Deste estudo emergem como potenciais fatores de prognóstico o c-kit e os marcadores de angiogénese, não apenas associados a características clinicopatológicas mas correlacionados entre si.

O c-kit apresentou relação positiva com a agressividade tumoral, revelando ser um bom indicador de malignidade uma vez que a sua imunexpressão é aumentada quando o estágio tumoral é avançado. Em termos gerais está também relacionado com as variáveis clinicopatológicas características de mau prognóstico neoplásico.

Vários estudos em humanos já haviam relatado a associação entre o marcador tumoral c-kit e marcadores de angiogénese, no presente estudo foi possível verificar pela expressão do VEGF e CD31, que o mesmo se passa em tumores malignos da mama da cadela.

Deste modo, tumores com elevado c-kit e elevada imunexpressão de marcadores de angiogénese, apresentam fenótipos mais agressivos (maior grau histológico de malignidade, presença de êmbolos vasculares e presença de metástases nos gânglios linfáticos regionais).

Os resultados deste estudo sugerem que o c-kit, o VEGF e o CD31 podem ter vias de sinalização comuns na progressão dos tumores de mama da cadela, contribuindo para o aumento da angiogénese e agressividade tumoral. Deste modo poderão vir a ser utilizados como critérios de prognóstico e alvos terapêuticos em medicina veterinária.

## Capítulo 7 – Estudos Futuros

Como referido, existem poucos estudos que se debruçam sobre a problemática do prognóstico de tumores de mama da cadela. Posto isto, seria interessante em estudos futuros aprofundar a potencialidade de vários marcadores tumorais, nomeadamente o c-kit.

Diversos autores apontam a cadela como possível modelo de estudo para os tumores de mama da mulher, contudo os resultados são controversos, pelo que seria importante definir se existe alguma relação na progressão do tecido mamário normal para eventuais neoplasmas.

Perante a associação da expressão do c-kit com a malignidade tumoral do tecido neoplásico seria interessante a pesquisa de um análogo do ligando do c-kit, que permitisse a inibição da ligação SCF – c-kit, esclarecendo os mecanismos desta interação.

Aprofundar o estudo de tumores de mama da cadela no sentido de analisar as mutações ativadoras do domínio inibidor justamembranar codificado pelo gene do c-kit.

---

**Capítulo 8 – Referências Bibliográficas**

- Allander SV, Nupponen NN, Ringner M, Hostetter G, Maher GW, Goldberger N, Chen Y, Carpten J, Elkahloun AG, Meltzer PS. 2001. Gastrointestinal stromal tumors with KIT mutations exhibit a remarkably homogeneous gene expression profile. *Cancer Res* 61(24):8624-8628.
- Amin MM, El-Hawary AK, Farouk O. 2012. Relation of CD117 immunoreactivity and microvascular density in invasive breast carcinoma. *Indian journal of pathology & microbiology* 55(4):456-460.
- Andre C, Hampe A, Lachaume P, Martin E, Wang XP, Manus V, Hu WX, Galibert F. 1997. Sequence analysis of two genomic regions containing the KIT and the FMS receptor tyrosine kinase genes. *Genomics* 39(2):216-226.
- Ashman LK. 1999. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *The international journal of biochemistry & cell biology* 31(10):1037-1051.
- Baeriswyl V, Christofori G. 2009. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in cancer biology* 19(5):329-337.
- Bellone G, Carbone A, Sibona N, Bosco O, Tibaudi D, Smirne C, Martone T, Gramigni C, Camandona M, Emanuelli G and others. 2001. Aberrant activation of c-kit protects colon carcinoma cells against apoptosis and enhances their invasive potential. *Cancer Res* 61(5):2200-2206.
- Ben-Baruch A. 2005. Breast cancer progression: A “vicious cycle” of pro-malignancy activities is mediated by inflammatory cells, chemokines and cytokines. *Integration/Interaction of Oncologic Growth: Springer*. p 189-217.
- Berg JW, Hutter RV. 1995. Breast cancer. *Cancer* 75(1 Suppl):257-269.
- Blume-Jensen P, Janknecht R, Hunter T. 1998. The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Current biology : CB* 8(13):779-782.
- Broudy VC, Lin NL, Liles WC, Corey SJ, O'Laughlin B, Mou S, Linnekin D. 1999. Signaling via Src family kinases is required for normal internalization of the receptor c-Kit. *Blood* 94(6):1979-1986.
- Broudy VC, Lin NL, Sabath DF. 2001. The fifth immunoglobulin-like domain of the Kit receptor is required for proteolytic cleavage from the cell surface. *Cytokine* 15(4):188-195.
- Brunetti B, Beha G, Benazzi C, Bondin V, De Tolla L, Sarli G. 2014. CD117 expression influences proliferation but not survival in canine mammary tumours. *Journal of comparative pathology* 151(2-3):202-206.
- Brustmann H. 2004. Vascular endothelial growth factor expression in serous ovarian carcinoma: relationship with topoisomerase II alpha and prognosis. *Gynecologic oncology* 95(1):16-22.
- Canonica B, Felici C, Papa S. 2001. Cd117. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 15(1):90-94.
- Carson WE, Haldar S, Baiocchi RA, Croce CM, Caligiuri MA. 1994. The c-kit ligand suppresses apoptosis of human natural killer cells through the upregulation of bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(16):7553-7557.
- Carvalho MI, Pires I, Dias M, Prada J, Gregorio H, Lobo L, Queiroga F. 2015. Intratumoral CD3+ T-lymphocytes immunoreexpression and its association with c-Kit, angiogenesis, and overall survival in malignant canine mammary tumors. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2015:920409.

- Carvalho MI, Pires I, Prada J, Queiroga FL. 2011. T-lymphocytic infiltrate in canine mammary tumours: clinic and prognostic implications. *In Vivo* 25(6):963-969.
- Carvalho MI, Pires I, Prada J, Queiroga FL. 2014. A role for T-lymphocytes in human breast cancer and in canine mammary tumors. *BioMed research international* 2014:130894.
- Cassali GD, Lavalle GE, De Nardi A, Ferreira E, Bertagnolli AC, Estrela-Lima A, Alessi AC, Daleck CR, Salgado BS, Fernandes CG. 2011. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Brazilian journal of veterinary pathology* 4(2):153-180.
- Chiarugi V, Cinelli M, Magnelli L, Dello SP. 2002. Apoptosis: molecular regulation of cell death and hematologic malignancies. *Molecular biotechnology* 20(3):305-314.
- Chui X, Egami H, Yamashita J, Kurizaki T, Ohmachi H, Yamamoto S, Ogawa M. 1996. Immunohistochemical expression of the c-kit proto-oncogene product in human malignant and non-malignant breast tissues. *British journal of cancer* 73(10):1233-1236.
- Clarkin CE, Garonna E, Pitsillides AA, Wheeler-Jones CP. 2008. Heterotypic contact reveals a COX-2-mediated suppression of osteoblast differentiation by endothelial cells: A negative modulatory role for prostanoids in VEGF-mediated cell: cell communication? *Experimental cell research* 314(17):3152-3161.
- Dai H, Van'T L, Lamb J, He Y, Mao M, Fine B, Bernards R, Vijver Mvande, Deutsch P, Sachs A. 2005. A cell proliferation signature is a marker of extremely poor outcome in a subpopulation of breast cancer patients. *Cancer research* 65.
- De Young BR, Frierson HF, Jr., Ly MN, Smith D, Swanson PE. 1998. CD31 immunoreactivity in carcinomas and mesotheliomas. *American journal of clinical pathology* 110(3):374-377.
- Dubois CM, Ruscetti FW, Stankova J, Keller JR. 1994. Transforming growth factor-beta regulates c-kit message stability and cell-surface protein expression in hematopoietic progenitors. *Blood* 83(11):3138-3145.
- Egenvall A, Bonnett BN, Ohagen P, Olson P, Hedhammar A, von Euler H. 2005. 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* 69(1-2):109-127.
- Estrela-Lima A, Araújo MS, Costa-Neto JM, Teixeira-Carvalho A, Barrouin-Melo SM, Cardoso SV, Martins-Filho OA, Serakides R, Cassali GD. 2010. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC cancer* 10(1):1.
- Ferrer L, Fondevila D, Rabanal RM, Vilafranca M. 1995. Immunohistochemical detection of CD31 antigen in normal and neoplastic canine endothelial cells. *Journal of comparative pathology* 112(4):319-326.
- Folkman J. 1995. The influence of angiogenesis research on management of patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 36(2):109-118.
- Foote RL, Weidner N, Harris J, Hammond E, Lewis JE, Vuong T, Ang KK, Fu KK. 2005. Evaluation of tumor angiogenesis measured with microvessel density (MVD) as a prognostic indicator in nasopharyngeal carcinoma: results of RTOG 9505. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 61(3):745-753.
- Frederick L G. 2002. *Cancer Staging Manual*.
- Garzetti GG, Ciavattini A, Lucarini G, Pugnaroni A, De Nictolis M, Amati S, Romanini C, Biagini G. 1999. Expression of vascular endothelial growth factor related to 72-kilodalton metalloproteinase immunostaining in patients with serous ovarian tumors. *Cancer* 85(10):2219-2225.
- Georgiannos SN, Renaut A, Goode AW, Sheaff M. 2003. The immunophenotype and activation status of the lymphocytic infiltrate in human breast cancers, the role of the

- major histocompatibility complex in cell-mediated immune mechanisms, and their association with prognostic indicators. *Surgery* 134(5):827-834.
- Gibson PC, Cooper K. 2002. CD117 (KIT): a diverse protein with selective applications in surgical pathology. *Advances in anatomic pathology* 9(1):65-69.
- Gokkel E, Grossman Z, Ramot B, Yarden Y, Rechavi G, Givol D. 1992. Structural organization of the murine c-kit proto-oncogene. *Oncogene* 7(7):1423-1429.
- Goldschmidt M, Pena L, Rasotto R, Zappulli V. 2011. Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary pathology* 48(1):117-131.
- Gomes J, Queiroga FL, Prada J, Pires I. 2012. Study of c-kit immunoeexpression in canine cutaneous melanocytic tumors. *Melanoma research* 22(3):195-201.
- Guidi AJ, Berry DA, Broadwater G, Perloff M, Norton L, Barcos MP, Hayes DF. 2000. Association of angiogenesis in lymph node metastases with outcome of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 92(6):486-492.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell* 144(5):646-674.
- Hankinson SE, Willett WC, Michaud DS, Manson JE, Colditz GA, Longcope C, Rosner B, Speizer FE. 1999. Plasma prolactin levels and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women. *Journal of the National Cancer Institute* 91(7):629-634.
- Hines SJ, Litz JS, Krystal GW. 1999. Coexpression of c-kit and stem cell factor in breast cancer results in enhanced sensitivity to members of the EGF family of growth factors. *Breast Cancer Research and Treatment* 58(1):1-10.
- Hirota S, Isozaki K, Nishida T, Kitamura Y. 2000. Effects of loss-of-function and gain-of-function mutations of c-kit on the gastrointestinal tract. *Journal of gastroenterology* 35 Suppl 12:75-79.
- Hirota S, Nishida T, Isozaki K, Taniguchi M, Nakamura J, Okazaki T, Kitamura Y. 2001. Gain-of-function mutation at the extracellular domain of KIT in gastrointestinal stromal tumours. *J Pathol* 193(4):505-510.
- Hochhaus A, Lahaye T, Kreil S, Berger U, Metzgeroth G, Hehlmann R. 2001. [Selective inhibition of tyrosine kinases - a new therapeutic principle in oncology]. *Onkologie* 24 Suppl 5:65-71.
- Huang B, Lei Z, Zhang G-M, Li D, Song C, Li B, Liu Y, Yuan Y, Unkeless J, Xiong H. 2008. SCF-mediated mast cell infiltration and activation exacerbate the inflammation and immunosuppression in tumor microenvironment. *Blood* 112(4):1269-1279.
- Huang S, Jean D, Luca M, Tainsky MA, Bar-Eli M. 1998. Loss of AP-2 results in downregulation of c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis. *The EMBO journal* 17(15):4358-4369.
- Itoh T, Uchida K, Ishikawa K, Kushima K, Kushima E, Tamada H, Moritake T, Nakao H, Shii H. 2005. Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. *J Vet Med Sci* 67(3):345-347.
- Jahn T, Seipel P, Coutinho S, Urschel S, Schwarz K, Miething C, Serve H, Peschel C, Duyster J. 2002. Analysing c-kit internalization using a functional c-kit-EGFP chimera containing the fluorochrome within the extracellular domain. *Oncogene* 21(29):4508-4520.
- Joanne LY, Rak JW. 2003. Host microenvironment in breast cancer development Inflammatory and immune cells in tumour angiogenesis and arteriogenesis. *Breast Cancer Research* 5(2):1.
- Kanczler JM, Oreffo RO. 2008. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *European cells & materials* 15:100-114.

- Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC, Dessiris A. 2005. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *Journal of comparative pathology* 133(4):246-252.
- Kerkela E, Saarialho-Kere U. 2003. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Experimental dermatology* 12(2):109-125.
- Keshet E, Lyman SD, Williams DE, Anderson DM, Jenkins NA, Copeland NG, Parada LF. 1991. Embryonic RNA expression patterns of the c-kit receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development. *The EMBO journal* 10(9):2425-2435.
- Kierszenbaum AL. 2012. *Histologia e Biologia Celular - Uma Introdução à Patologia* 677 págs. .
- Kiupel M, Webster JD, Bailey KL, Best S, DeLay J, Detrisac CJ, Fitzgerald SD, Gamble D, Ginn PE, Goldschmidt MH and others. 2011. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Vet Pathol* 48(1):147-155.
- Kiupel M, Webster JD, Kaneene JB, Miller R, Yuzbasiyan-Gurkan V. 2004. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol* 41(4):371-377.
- Kondi-Pafiti A, Arkadopoulos N, Gennatas C, Michalaki V, Frangou-Plegmenou M, Chatzipantelis P. 2010. Expression of c-kit in common benign and malignant breast lesions. *Tumori* 96(6):978-984.
- Kurzman ID, Gilbertson SR. 1986. Prognostic factors in canine mammary tumors. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1(1):25-32.
- Lammie A, Drobnjak M, Gerald W, Saad A, Cote R, Cordon-Cardo C. 1994. Expression of c-kit and kit ligand proteins in normal human tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 42(11):1417-1425.
- Lee AY, He B, You L, Dadfarmay S, Xu Z, Mazieres J, Mikami I, McCormick F, Jablons DM. 2004. Expression of the secreted frizzled-related protein gene family is downregulated in human mesothelioma. *Oncogene* 23.
- Lee CH, Kweon OK. 2002. Mutations of p53 tumor suppressor gene in spontaneous canine mammary tumors. *Journal of veterinary science* 3(4):321-325.
- Leek RD. 2000. The prognostic role of angiogenesis in breast cancer. *Anticancer research* 21(6B):4325-4331.
- Lemmon MA, Schlessinger J. 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *cell* 141(7):1117-1134.
- Liang J, Wu YL, Chen BJ, Zhang W, Tanaka Y, Sugiyama H. 2013. The C-kit receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases. *International journal of biological sciences* 9(5):435-443.
- Litz J, Krystal GW. 2006. Imatinib inhibits c-Kit-induced hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  activity and vascular endothelial growth factor expression in small cell lung cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* 5(6):1415-1422.
- Liu JR, Fletcher B, Page C, Hu C, Nunez G, Baker V. 1998. Bcl-xL is expressed in ovarian carcinoma and modulates chemotherapy-induced apoptosis. *Gynecologic oncology* 70(3):398-403.
- London CA. 2009. Tyrosine kinase inhibitors in veterinary medicine. *Topics in companion animal medicine* 24(3):106-112.
- Longley BJ, Reguera MJ, Ma Y. 2001. Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. *Leukemia research* 25(7):571-576.

- Ma Y, Zeng S, Metcalfe DD, Akin C, Dimitrijevic S, Butterfield JH, McMahon G, Longley BJ. 2002. The c-KIT mutation causing human mastocytosis is resistant to STI571 and other KIT kinase inhibitors; kinases with enzymatic site mutations show different inhibitor sensitivity profiles than wild-type kinases and those with regulatory-type mutations. *Blood* 99(5):1741-1744.
- Mareel M, Leroy A. 2003. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiological reviews* 83(2):337-376.
- Martin de las Mulas J, Ordas J, Millan MY, Chacon F, De Lara M, Espinosa de los Monteros A, Reymundo C, Jover A. 2004. Immunohistochemical expression of estrogen receptor beta in normal and tumoral canine mammary glands. *Vet Pathol* 41(3):269-272.
- Mendelsohn M, Peter M. Howley, MD, Mark A. Israel, MD, Joe W. Gray, PhD and Craig B. Thompson, MD. 2015. *The molecular basis of cancer*. 888 p.
- Millanta F, Calandrella M, Bari G, Niccolini M, Vannozzi I, Poli A. 2005. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Research in veterinary science* 79(3):225-232.
- Misdorp W. 2002a. Tumors of the mamary gland.
- Misdorp W. 2002b. Tumors of the mammary gland.
- Misdorp W, Else RW, Hellmen E, Lipscomb TP, (U.S.). AFiOP, Pathology. ARo, Oncology. WCCfWRoC. 1999. *Histological classification of mammary tumors of the dog and cat*.
- Molteni A, Wolfe LF, Ward WF, Ts'ao CH, Molteni LB, Veno P, Fish BL, Taylor JM, Quintanilla N, Herndon B and others. 2007. Effect of an angiotensin II receptor blocker and two angiotensin converting enzyme inhibitors on transforming growth factor-beta (TGF-beta) and alpha-actomyosin (alpha SMA), important mediators of radiation-induced pneumopathy and lung fibrosis. *Curr Pharm Des* 13(13):1307-1316.
- Morrison W. 1998. Canine and feline mammary tumors. *Cancer in Dogs and Cats: Medical and Surgical Management*:591-598.
- Moskaluk CA, Tian Q, Marshall CR, Rumpel CA, Franquemont DW, Frierson HF, Jr. 1999. Mutations of c-kit JM domain are found in a minority of human gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene* 18(10):1897-1902.
- Mottolese M, Morelli L, Agrimi U, Benevolo M, Sciarretta F, Antonucci G, Natali PG. 1994. Spontaneous canine mammary tumors. A model for monoclonal antibody diagnosis and treatment of human breast cancer. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 71(2):182-187.
- Mutsaers AJ. 2009. Metronomic chemotherapy. *Topics in companion animal medicine* 24(3):137-143.
- OMS. <http://www.who.int/en/>.
- Oriss TB, Krishnamoorthy N, Ray P, Ray A. 2014. Dendritic cell c-kit signaling and adaptive immunity: implications for the upper airways. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 14(1):7-12.
- Palumbo C, van Roozendaal K, Gillis AJ, van Gurp RH, de Munnik H, Oosterhuis JW, van Zoelen EJ, Looijenga LH. 2002. Expression of the PDGF alpha-receptor 1.5 kb transcript, OCT-4, and c-KIT in human normal and malignant tissues. Implications for the early diagnosis of testicular germ cell tumours and for our understanding of regulatory mechanisms. *J Pathol* 196(4):467-477.
- Peleteiro. 2011. *ATLAS DE CITOLOGIA VETERINÁRIA*. 324 p.
- Pelosi G, Barisella M, Pasini F, Leon ME, Veronesi G, Spaggiari L, Fraggetta F, Iannucci A, Masullo M, Sonzogni A and others. 2004. CD117 immunoreactivity in stage I

- adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung: relevance to prognosis in a subset of adenocarcinoma patients. *Mod Pathol* 17(6):711-721.
- Perez Alenza MD, Pena L, del Castillo N, Nieto AI. 2000. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J Small Anim Pract* 41(7):287-291.
- Porrello A, Cardelli P, Spugnini EP. 2006. Oncology of companion animals as a model for humans. an overview of tumor histotypes. *J Exp Clin Cancer Res* 25.
- Preziosi R, Sarli G, Paltrinieri M. 2004. Prognostic value of intratumoral vessel density in cutaneous mast cell tumors of the dog. *Journal of comparative pathology* 130(2-3):143-151.
- Priester WA, McKay FW. 1980. The occurrence of tumors in domestic animals. National Cancer Institute monograph(54):1-210.
- Puxeddu I, Ribatti D, Crivellato E, Levi-Schaffer F. 2005. Mast cells and eosinophils: a novel link between inflammation and angiogenesis in allergic diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology* 116(3):531-536.
- Queiroga F, Lopes C. 2002. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 97(543):119-127.
- Queiroga FL, Perez-Alenza D, Silvan G, Pena L, Lopes CS, Illera JC. 2010. Serum and intratumoural GH and IGF-I concentrations: prognostic factors in the outcome of canine mammary cancer. *Research in veterinary science* 89(3):396-403.
- Queiroga FL, Perez-Alenza MD, Silvan G, Pena L, Lopes C, Illera JC. 2005a. Cox-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological features and prognostic significance. *Anticancer research* 25(6B):4269-4275.
- Queiroga FL, Perez-Alenza MD, Silvan G, Pena L, Lopes C, Illera JC. 2005b. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 94(1-3):181-187.
- Queiroga FL, Pérez-Alenza MD, Silvan G, Peña L, Lopes CS, Illera JC. 2008. Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17 $\beta$ -estradiol) in canine mammary tumours. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 110(1-2):76-82.
- Ranieri G, Passantino L, Patruno R, Passantino G, Jirillo F, Catino A, Mattioli V, Gadaleta C, Ribatti D. 2003. The dog mast cell tumour as a model to study the relationship between angiogenesis, mast cell density and tumour malignancy. *Oncol Rep* 10(5):1189-1193.
- Ray P, Krishnamoorthy N, Oriss TB, Ray A. 2010. Signaling of c-kit in dendritic cells influences adaptive immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1183:104-122.
- Raynaud JP, Cotard M, Andre F, Mialot JP, Rolland PH, Martin PM. 1981. Spontaneous canine mammary tumour: a model for human endocrine therapy? *Journal of steroid biochemistry* 15:201-207.
- Rebuzzi L, Willmann M, Sonneck K, Gleixner KV, Florian S, Kondo R, Mayerhofer M, Vales A, Gruze A, Pickl WF and others. 2007. Detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors Flt-1 and KDR in canine mastocytoma cells. *Veterinary immunology and immunopathology* 115(3-4):320-333.
- Reddy A, Kaelin WG, Jr. 2002. Using cancer genetics to guide the selection of anticancer drug targets. *Current opinion in pharmacology* 2(4):366-373.
- Restucci B, Papparella S, Maiolino P, De Vico G. 2002. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 39(4):488-493.
- Robinson CJ, Stringer SE. 2001. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *Journal of cell science* 114(Pt 5):853-865.

- Rutteman GR. 1990. Hormones and mammary tumour disease in the female dog: an update. *In Vivo* 4(1):33-40.
- Sakorafas GH, Tsiotou AG. 2000. Genetic predisposition to breast cancer: a surgical perspective. *British Journal of Surgery* 87(2):149-162.
- Scheidegger P, Weiglhofer W, Suarez S, Kaser-Hotz B, Steiner R, Ballmer-Hofer K, Jaussi R. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in tumor-bearing dogs. *Biological chemistry* 380(12):1449-1454.
- Schor AM, Pendleton N, Pazouki S, Smither RL, Morris J, Lessan K, Heerkens E, Chandrachud LM, Carmichael G, Adi M and others. 1998. Assessment of vascularity in histological sections: effects of methodology and value as an index of angiogenesis in breast tumours. *Histochem J* 30(12):849-856.
- Semenza GL. 2007. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2007(407):cm8.
- Shao ZM, Nguyen M, Barsky SH. 2000. Human breast carcinoma desmoplasia is PDGF initiated. *Oncogene* 19(38):4337-4345.
- Shibanuma K, Tong ZB, Vanderhoof VH, Vanevski K, Nelson LM. 2002. Investigation of KIT gene mutations in women with 46,XX spontaneous premature ovarian failure. *BMC women's health* 2(1):8.
- Smith MA, Pallister CJ, Smith JG. 2001. Stem cell factor: biology and relevance to clinical practice. *Acta haematologica* 105(3):143-150.
- Sorenmo K. 2003. Canine mammary gland tumors. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice* 33(3):573-596.
- Stessels F, Van den Eynden G, Van der Auwera I, Salgado R, Van den Heuvel E, Harris AL, Jackson DG, Colpaert CG, van Marck EA, Dirix LY and others. 2004. Breast adenocarcinoma liver metastases, in contrast to colorectal cancer liver metastases, display a non-angiogenic growth pattern that preserves the stroma and lacks hypoxia. *Br J Cancer* 90(7):1429-1436.
- Strefezzi Rde F, Xavier JG, Kleeb SR, Catao-Dias JL. 2009. Nuclear morphometry in cytopathology: a prognostic indicator for canine cutaneous mast cell tumors. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 21(6):821-825.
- Suo Z, Emilsen E, Tveit KM, Nesland JM. 1998. Type 1 protein tyrosine kinases in benign and malignant breast lesions. *Histopathology* 33(6):514-521.
- Thamm VD. 2007. Mast cell tumors.
- Tjwa M, Luttun A, Autiero M, Carmeliet P. 2003. VEGF and PlGF: two pleiotropic growth factors with distinct roles in development and homeostasis. *Cell and tissue research* 314(1):5-14.
- Todorova I. 2006. Prevalence and etiology of the most common malignant tumours in dogs and cats. : *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*.
- Tsuda H, Morita D, Kimura M, Shinto E, Ohtsuka Y, Matsubara O, Inazawa J, Tamaki K, Mochizuki H, Tamai S. 2005. Correlation of KIT and EGFR overexpression with invasive ductal breast carcinoma of the solid- tubular subtype, nuclear grade 3, and mesenchymal or myoepithelial differentiation. *Cancer science* 96(1):48-53.
- Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, Takeuchi H, Nishizaki T, Higashi H, Era S. 2006a. A loss of c-kit expression is associated with an advanced stage and poor prognosis in breast cancer. *British journal of cancer* 94(12):1874-1878.
- Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, Takeuchi H, Nishizaki T, Higashi H, Era S. 2006b. A loss of c-kit expression is associated with an advanced stage and poor prognosis in breast cancer. *British journal of cancer* 94(12):1874-1878.

- Tsuura Y, Hiraki H, Watanabe K, Igarashi S, Shimamura K, Fukuda T, Suzuki T, Seito T. 1994. Preferential localization of c-kit product in tissue mast cells, basal cells of skin, epithelial cells of breast, small cell lung carcinoma and seminoma/dysgerminoma in human: immunohistochemical study on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 424(2):135-141.
- Uva P, Aurisicchio L, Watters J, Loboda A, Kulkarni A, Castle J, Palombo F, Viti V, Mesiti G, Zappulli V and others. 2009. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics* 10(1):1-20.
- Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. 2004. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer research* 64(9):2941-2955.
- Vail DM, MacEwen EG. 2000. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer investigation* 18(8):781-792.
- van Dijke CF, Brasch RC, Roberts TP, Weidner N, Mathur A, Shames DM, Mann JS, Demsar F, Lang P, Schwickert HC. 1996. Mammary carcinoma model: correlation of macromolecular contrast-enhanced MR imaging characterizations of tumor microvasculature and histologic capillary density. *Radiology* 198(3):813-818.
- Vandenbark GR, Chen Y, Friday E, Pavlik K, Anthony B, deCastro C, Kaufman RE. 1996. Complex regulation of human c-kit transcription by promoter repressors, activators, and specific myb elements. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 7(10):1383-1392.
- Vandenbark GR, deCastro CM, Taylor H, Dew-Knight S, Kaufman RE. 1992. Cloning and structural analysis of the human c-kit gene. *Oncogene* 7(7):1259-1266.
- Veldhoen N, Watterson J, Brash M, Milner J. 1999. Identification of tumour-associated and germ line p53 mutations in canine mammary cancer. *Br J Cancer* 81(3):409-415.
- Vivanco I, Sawyers CL. 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2(7):489-501.
- Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. 1991. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324(1):1-8.
- Welle MM, Bley CR, Howard J, Rufenacht S. 2008. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Veterinary dermatology* 19(6):321-339.
- Williams DE, Eisenman J, Baird A, Rauch C, Van Ness K, March CJ, Park LS, Martin U, Mochizuki DY, Boswell HS and others. 1990. Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell* 63(1):167-174.
- Yee NS, Hsiau CW, Serve H, Vosseller K, Besmer P. 1994. Mechanism of down-regulation of c-kit receptor. Roles of receptor tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3'-kinase, and protein kinase C. *J Biol Chem* 269(50):31991-31998.
- Zatloukal J LJ, Tichy F, Nečas A, Kocova H, Kohout P. 2005. Breed and age as a risk factors for canine mammary tumours.
- Zhang Z, Zhang R, Joachimiak A, Schlessinger J, Kong XP. 2000. Crystal structure of human stem cell factor: implication for stem cell factor receptor dimerization and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14):7732-7737.