

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**EXPRESSÃO DE P63 E P53 EM TUMORES
MAMÁRIOS MISTOS DE CADELAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Angélica Cavalheiro Bertagnolli

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**EXPRESSÃO DE P63 E P53 EM TUMORES MAMÁRIOS
MISTOS DE CADELAS**

por

Angélica Cavalheiro Bertagnolli

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Fisiopatologia da Reprodução Animal (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof. Paulo Bayard Dias Gonçalves

Santa Maria, RS, Brasil

2006

Universidade Federal de Santa Maria

Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EXPRESSÃO DE P63 E P53 EM TUMORES MAMÁRIOS MISTOS DE
CADELAS**

elaborada por
Angélica Cavalheiro Bertagnolli

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Paulo Bayard Dias Gonçalves, Dr.
(Presidente/Orientador)

Rui Fernando Felix Lopes, Dr. (UFRGS)

Josiane Bonel Raposo, Dr. (UFPel)

Santa Maria, 10 de Fevereiro de 2006

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar presente em todos os momentos da minha vida protegendo e iluminado meu caminho

Aos meus queridos pais, para os quais dedico minhas conquistas, pelo incentivo, exemplo de vida, compreensão e amor incondicional.

Ao meu orientador Prof. Paulo Bayard por ter me dado a oportunidade de ingressar na carreira científica, pelo incentivo, credibilidade, exemplo profissional, amizade e pelos conhecimentos transmitidos ao longo desses cinco anos de convivência.

Ao meu co-orientador Prof. Geovanni Dantas Cassali pela acolhida, amizade, exemplo profissional e por ter transmitido os conhecimentos imprescindíveis para a realização desse trabalho. Agradeço também pelas longas horas extras dedicadas a leitura de lâminas e pelo apoio emocional.

Ao Prof. João Francisco Coelho pela amizade, pelos conhecimentos transmitidos, pelo exemplo profissional e por todo o auxílio técnico prestado.

À todos os colegas da família BioRep pela amizade, companheirismo, apoio técnico e emocional que fazem da nossa família um ambiente de crescimento profissional e pessoal.

À todos os colegas do Laboratório de Patologia Comparada em especial a Mariana, Fabiano, Enio e Marisa pela acolhida, amizade, apoio emocional e técnico.

Ao amigo e colega de pós - graduação, Enio pelos ensinamentos fundamentais para o desenvolvimento desse estudo, pela amizade, sinceridade e bom humor.

As amigas Mônica, Jana, Fernanda e Bruna pela amizade, pelo apoio técnico e pelos momentos de descontração.

Ao amigo e colega Juca pela amizade, companheirismo e por estar sempre disposto a auxiliar de alguma forma.

À família Almeida Costa pela hospitalidade, carinho e por terem preenchido o espaço deixado pela distância e saudade dos familiares.

Aos amigos e colegas de pós- graduação, Rogério e Anita pela amizade e apoio.

À prof^a Gleidice Lavallo pela amizade e auxílio prestado

À Ângela e Fabiana pela amizade e hospitalidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

À universidade Federal de Santa Maria e Universidade Federal de Minas Gerais por proporcionar ensino de qualidade e gratuito.

O encanto
sobrenatural
que há
nas coisas da Natureza!
No entanto, amiga,
Se nelas algo te dá
encanto ou medo,
não me digas que seja feia
ou má,
é, acaso, singular...
E deixa-me dizer-te em segredo
um dos grandes segredos do mundo:
-Essas coisas que parece
não ter beleza
nenhuma
-é simplesmente porque
Não houve nunca quem lhes desse ao
menos
Um segundo
Olhar!

Mario Quintana

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

EXPRESSÃO DE P63 E P53 EM TUMORES MAMÁRIOS MISTOS DE CADELAS

AUTORA: ANGÉLICA CAVALHEIRO BERTAGNOLLI

ORIENTADOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 10 de fevereiro de 2006.

A proteína p63 é expressa no núcleo das células mioepiteliais da mama e apresenta funções sinérgicas ou antagonistas com a proteína de supressão tumoral p53. A expressão imuno-histoquímica de p63 foi estudada para acessar o papel das células mioepiteliais na histogênese dos tumores mistos. Adicionalmente, avaliou-se a possível relação entre expressão imuno-histoquímica de p63 e p53 com a finalidade de obter informações sobre a biologia desses tumores. Quatro amostras de mama normais, 20 tumores mistos benignos, 35 carcinomas em tumores mistos e 11 carcinomas tubulopapilares foram avaliados. Células mioepiteliais, formando camadas periductais/periacinare contínuas, foram imunoreativas para p63 na mama normal e nos tumores mistos benignos. Todos os carcinomas em tumores mistos e 72,7% (8/11) dos carcinomas tubulopapilares foram reativos para p63. A reatividade para p63 foi superior nos tumores mistos benignos quando comparada com os carcinomas. Nos tumores mistos, células mioepiteliais com formato fusiforme e estrelado, presentes no estroma mucinoso também foram reativas para p63. A proteína p53 foi expressa em 20,0% (4/20), 28,6% (10/35) e 36,4% (4/11) dos tumores mistos benignos, carcinomas em tumores mistos e carcinomas tubulopapilares, respectivamente. Não houve relação entre a expressão de p53 e p63 nos diferentes tipos tumorais. O presente estudo evidenciou a participação das células mioepiteliais na histogênese dos tumores mistos. A diminuição da expressão de p63 nas células mioepiteliais que compõem a camada basal dos carcinomas pode ser um evento importante para a progressão tumoral.

Palavras-chave: p63; p53; célula mioepitelial; mama; cão.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

EXPRESSION OF P63 AND P53 IN CANINE MAMMARY MIXED TUMORS

AUTORA: ANGÉLICA CAVALHEIRO BERTAGNOLLI

ORIENTADOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 10 de fevereiro de 2006.

The p63 protein is expressed in the nuclei of the mammary myoepithelial cells and has synergisms or antagonisms with p53 tumor suppressor protein. The immunohistochemistry expression of p63 was studied for access the role of myoepithelial cells in histogenesis of the mixed tumors. Additionally, the possible association between p63 and p53 for access the biological aspects of this tumors was evaluated. Four specimens of the normal gland, 20 benign mixed tumors, 35 carcinomas in mixed tumors and 11 tubulopapillary carcinomas were evaluated. Myoepithelial cells forming layers periductals/periacinars continuous were reactive for protein p63 in normal gland and in benign mixed tumor. The carcinomas in mixed tumors and 72.7% (8/11) tubulopapillary carcinomas were reactive for p63. In the mixed tumors star and spindle –shaped cells were reactive for p63. The p53 protein was expressed in 20.0% (4/20), 28.6% (10/35) and 36.7% (4/11), benign mixed tumors, carcinoma in mixed tumors and tubulopapillary carcinomas, respectively. There was not relation between p63 and p53 expression in none type of tumor. The present study point the participation of the mioepithelial cells in the histogenesis of the mixed tumors. The decrease in p63 expression in the basal myoepithelial cells of the carcinomas may be important for tumoral progression.

Keywords: p63; p53; myoepithelial cell; breast; dog.

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 – Caracterização da imunoreatividade para p63 nos diferentes tipos celulares dos diferentes tumores da glândula mamária normal de cadelas..... | 45 |
| TABELA 2 – Expressão imuno-histoquímica de p63 e ASMA em células mioepiteliais de tumores mamários de cadelas..... | 46 |
| TABELA 3 – Expressão imuno-histoquímica de p53 e p63 em tumores mamários de cadelas..... | 47 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 - Glândula mamária normal; cadela. Camada de células mioepiteliais em repouso imunoreativas para p63, escore (+++). Células luminais não imunoreativas..... | 48 |
| FIGURA 2 - Carcinoma em tumor misto; cadela. Área carcinomatosa com ausência de imunoreatividade para p63..... | 48 |
| FIGURA 3 - Carcinoma em tumor misto; cadela. Células mioepiteliais imunoreativas para p63..... | 48 |
| FIGURA 4 - Carcinoma em tumor misto; cadela. Imuno-histoquímica para ASMA na mesma área apresentada na da Figura 3..... | 48 |
| FIGURA 5 – Reatividade para p63 nos diferentes tipos tumorais | 49 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 13 |
| 2.1 Células mioepiteliais da mama | 13 |
| 2.1.1. Distribuição, morfologia e função das células mioepiteliais mamárias..... | 13 |
| 2.1.2. As células mioepiteliais e as neoplasias..... | 14 |
| 2.1.3. Células mioepiteliais e o diagnóstico das neoplasias..... | 15 |
| 2.2. Tumores mistos benignos e carcinomas em tumores mistos | 17 |
| 2.2.1. Tumores mistos benignos..... | 17 |
| 2.2.2. Carcinomas em tumores mistos..... | 18 |
| 2.3. Proteína p53 | 19 |
| 2.3.1. Estrutura e função..... | 19 |
| 2.3.2. A proteína p53 e neoplasias..... | 20 |
| 2.4. Proteína p63 | 22 |
| 2.4.1. Estrutura..... | 22 |
| 2.4.2. Papel de p63 no bloqueio de ciclo celular e apoptose..... | 23 |
| 2.4.3. Papel de p63 nos tecidos..... | 24 |
| 2.4.4. Papel de p63 nas neoplasias..... | 25 |
| 2.4.5. p63 e o tecido mamário..... | 26 |
| 2.4.6. Interação entre p53 e p63..... | 27 |
| 3. CAPÍTULO 1 - EXPRESSÃO DE P63 E P53 EM TUMORES MAMÁRIOS MISTOS DE CADELAS | 29 |
| 4. 1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 49 |
| 5. GLOSSÁRIO | 60 |

1. INTRODUÇÃO

Os tumores mamários são as neoplasias mais freqüentes na cadela e representam um problema de grande impacto em medicina veterinária, visto que implicam em um alto índice de mortalidade. Estima-se que aproximadamente 48% das cadelas morrem ou são eutanasiadas um ano após a intervenção cirúrgica, devido à recorrência tumoral ou aparecimento de metástases (GRAHAMM et al., 1999). Diante desse contexto, muitos esforços estão sendo direcionados para adoção de critérios que permitam a padronização do diagnóstico, o entendimento do comportamento e evolução tumoral e avaliação de fatores prognósticos como: morfologia, expressão de oncogenes e alterações gênicas. O conhecimento e adoção desses parâmetros são de fundamental importância para a escolha e sucesso de terapias que promovam diminuição da recorrência tumoral e aumento da sobrevida. Adicionalmente, os tumores mamários da cadela apresentam similaridades epidemiológicas (HÉLLMEN et al., 1993), clínicas (MILER, 1991; LAS MULAS et al., 2005), biológicas (MOULTON 1990; GERALDES et al., 2000) e genéticas (LEE et al., 2004) com as neoplasias mamárias da mulher sendo por isso, considerados ótimos modelos em estudos comparativos. Portanto, a aplicação do conhecimento obtido nos tumores mamários da cadela, pode muitas vezes ser estendida para a espécie humana.

Aproximadamente 50% dos tumores mamários que acometem a cadela são benignos e dentre eles, os tumores mistos benignos são os mais freqüentes (MISDORP., 1999). Os tumores mistos benignos são raros na mama humana, mas são os mais freqüentes na glândula salivar onde são também denominados adenomas pleomórficos (VOZ et al., 2000). Esses tumores são caracterizados por uma complexa heterogeneidade fenotípica e biológica e possuem capacidade de malignizar. Em ambas as espécies, tanto a origem histogênica dos elementos heterólogos que os compõem, quanto às características que determinam a sua evolução maligna não são completamente conhecidos.

O papel da proteína p63 tem sido muito investigado em neoplasias mamárias da espécie humana. Devido a sua expressão específica no mioepitélio mamário, p63 tem sido incluída no grupo dos marcadores de células miopiteliais, constituindo uma importante ferramenta para acessar a histogênese tumoral (BARBARESCHI et al., 2001). Adicionalmente, a avaliação da expressão de p63 pode trazer importantes informações sobre a biologia tumoral, visto que p63 apresenta ações sinérgicas e/ou antagonistas com a proteína de supressão tumoral, p53 (YANG et al., 1998). P53 atua como um fator de transcrição regulando a expressão de genes envolvidos na inibição do ciclo celular e indução apoptose. O bloqueio do ciclo ou a morte

celular impedem proliferação desordenada das células que sofreram algum tipo de dano (EL DEIRY, et al., 1993). Alterações no gene p53 e/ou na expressão proteica de p53 são alterações moleculares frequentes em tumores e geralmente estão envolvidas com a carcinogênese (KRAGGERUD et al., 1997).

Este trabalho foi delineado com o objetivo de investigar a expressão imuno-histoquímica de p63 e p53 em tumores mamários mistos da cadela visando acrescentar informações sobre a histogênese e evolução desses tumores. Além disso, pretende-se contribuir com informações que possam ser estendidas para a espécie humana, uma vez que os tumores mistos compartilham similaridades com os adenomas pleomórficos da espécie humana.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Células mioepiteliais da mama

2.1.1. Distribuição, morfologia e função das células mioepiteliais mamárias

A mama é formada por ductos ramificados, os quais são subdivididos em lóbulos que se estendem para um estroma intersticial. Os sistemas ductal e lobular são constituídos basicamente por dois tipos epiteliais: um epitélio luminal e um mioepitélio (AHMED, 1974). Além dessas células, sugere-se a presença de uma população progenitora, visto que o desenvolvimento mamário é acompanhado por eventos cíclicos de proliferação e apoptose. Diversas células indiferenciadas como as células claras da camada basal têm sido apontadas como candidatas a progenitoras (SMITH & MEDINA, 1988). Estudos recentes propõem a existência de células tronco ou “*stem cells*” pluripotentes, com capacidade para originar tanto células progenitoras do mioepitélio quanto células progenitoras do epitélio luminal (STINGEL et al., 2005).

O epitélio luminal compõe a superfície interna dos ductos e lóbulos e é constituído por camadas de células colunares. As células luminais participam da produção e secreção do leite e apresentam um fenótipo citoesquelético puramente epitelial constituído por filamentos intermediários como citoqueratinas 8, 14, 18 e 19 (CHU & WEISS, 2002). Além disso, expressam proteínas epiteliais específicas como a MUC-1 (GORDON et al., 2003) e moléculas de adesão como ESA e o receptor trans-membrana ERb2 (MONBURG et al., 1987).

O mioepitélio da mama normal é constituído por células contráteis, com formato cuboíde ou fusiforme, posicionadas entre o epitélio luminal e a membrana basal. Essas células são ligadas ao epitélio luminal por desmossomas e à membrana basal por hemidesmossomas formando camadas contínuas ao redor dos ductos e descontínuas ao redor dos lóbulos (BATSAKIS et al., 1983). Juntamente com a membrana basal, as células mioepiteliais formam a base dos ductos e lóbulos, separando fisicamente o epitélio luminal do estroma intersticial (LAKHANI & O’HARE, 2000). As células mioepiteliais apresentam um duplo fenótipo, visto que, são constituídas tanto por microfilamentos citoesqueléticos característicos de músculo liso como: alfa-actina de músculo liso (ASMA), miosina de músculo liso de

cadeia pesada (SMMHC) e calponina, (DABBS & GOWN, 1999; FOSCHINI et al., 2000), quanto por elementos intermediários característicos de células epiteliais como citoqueratinas 5, 6 e 14 (CHU & WEISS, 2002).

Devido a sua morfologia, constituição e localização o mioepitélio mamário participa de uma série de mecanismos. A capacidade contrátil confere-lhes um importante papel no processo de ejeção do leite mediado pela ocitocina (LAKHANI & O'HARE, 2000). A localização facilita a troca de componentes e informações entre o epitélio luminal e o estroma e mantém a polaridade das células luminais (GUDJONSON et al., 2002). O papel na regulação do desenvolvimento normal da mama é refletido pela expressão de fatores de crescimento e/ou seus receptores (GOMM et al., 1997), pela síntese de componentes da membrana basal como: colágeno, laminina e tenascina (GUTERSON et al., 1986) e pela expressão de proteínas envolvidas como o ciclo celular como p63 e WT-1 (YANG et al., 1998; MANN et al., 2003).

2.1.2. As células mioepiteliais e as neoplasias

A ausência de células mioepiteliais ou perda na integridade da camada basal/mioepitelial é considerada um dos pré-requisitos para invasão tumoral e metástase. A manutenção de camadas de células mioepiteliais intactas na maioria lesões benignas e *in situ*, contrastando com a ausência ou perda de integridade nas lesões invasoras evidenciam a participação do mioepitélio no mecanismo de supressão tumoral (STERNLICHT et al., 1997). Apesar do mecanismo pelo qual o mioepitélio atua não estar bem esclarecido, a expressão de uma série de proteínas envolvidas com o mecanismo de supressão tumoral supõe que um dos caminhos seja via atuação parácrina sobre as células luminais. Uma das proteínas presentes com essa função é maspin. Maspin pertence à família dos inibidores serina protease e experimentos *in vivo* e *in vitro* verificaram sua participação na inibição da motilidade celular e invasão. Adicionalmente, observou-se perda da expressão dessa proteína em lesões invasivas de humanos (ZHANG et al., 1997). Maspin também é expresso nas células mioepiteliais mamárias de cadelas, demonstrando ser um bom marcador desse tipo celular, mas seu papel na invasão não foi abordado (LOS MONTEROS et al., 2005). Outras proteínas envolvidas com a regulação do ciclo celular como: WT-1 (MAN et al., 2003), p63 (BARBARESCHI et al., 2001), p73 (YAMAMOTO et al., 2001), 14,3-3 sigma (MAN & SANG, 2004) também são consistentemente expressas no mioepitélio, e os níveis de

expressão dessas proteínas são inversamente correlacionados com a progressão de tumores mamários.

O impacto da perda de integridade do mioepitélio sobre a progressão tumoral, invasão e fenótipo biológico das células epiteliais luminais, bem como a identificação de sinais iniciais de destruição da camada mioepitelial tem ganhado importância. Nesse contexto, MAN & SANG (2004) verificaram que as células epiteliais luminais adjacentes a focos de quebra da camada mioepitelial apresentam padrão morfológico, imuno-histoquímico e genético diferentes daquelas adjacentes às áreas em que a camada está íntegra. Os mesmos autores observaram uma correlação positiva entre a quebra da camada e a infiltração leucocitária e índices proliferativos das células mioepiteliais adjacentes aos focos de lesão, sugerindo que a alteração focal seja resultante da morte celular.

Um evento paradoxal ao efeito supressor tumoral atribuído ao mioepitélio, consiste no fato de que uma série de neoplasias é constituída pela proliferação de células mioepiteliais. Na mama humana, lesões desse tipo são raras e são categorizadas em mioepitelioses, adenomioepitelioses e carcinomas mioepiteliais (MAN & SANG, 2004). Nos tumores mamários de cadelas a proliferação de células mioepiteliais é muito comum principalmente nos tumores complexos e mistos, os quais apresentam tanto células mioepiteliais adjacentes à membrana basal, que podem estar em repouso ou proliferação, quanto células fusiformes ou células estreladas, dispersas no estroma (MOULTON et al., 1986). Diversas investigações têm apontado as células mioepiteliais como progenitores dos elementos heterólogos que constituem os tumores mistos da mama da cadela (DEXTEXHE et al., 1993), da glândula parótida humana (DARDICK et al., 1982) e dos carcinomas metaplásicos da mama humana (REIS FILHO et al., 2003). É possível que em tumores desse tipo haja alterações na expressão dos genes, refletindo-se em um desequilíbrio e proliferação celular .

2.1.3. Células mioepiteliais e o diagnóstico das neoplasias

Na medicina humana, o acesso à integridade da camada de células mioepiteliais/basais muitas vezes é uma importante ferramenta no diagnóstico diferencial entre as lesões malignas *in situ* e invasoras, auxiliando principalmente na detecção de focos de microinvasão (STERNLICHT et al., 1997; YAZIJI et al., 2000). A precisão na determinação de focos de invasão dos tumores mamários permite prever o comportamento biológico, já que focos de invasão podem ser associados com metástase e com prognóstico inferior ao das lesões *in situ*

(HODA et al., 1999). Além disso, a presença de invasão determina a necessidade de realização de esvaziamento linfático e quimioterapia (BONDENSON & LINDHOLM, 1997).

No entanto, a identificação das células mioepiteliais na rotina de coloração pela hematoxilina–eosina (HE) nem sempre é fácil, pois carcinomas *in situ* de alto grau freqüentemente são associados com infiltração linfocitária e/ou de miofibroblastos, imitando invasão. Como ferramentas adicionais para o diagnóstico de rotina, diversos anticorpos que reconhecem as proteínas que compõem o fenótipo das células mioepiteliais são empregados em estudos imuno-histoquímicos. Anticorpos contra as proteínas alfa-actina de músculo liso, alfa-actina de músculo liso de cadeia pesada, CD10, calponina, h-caldesmon, S-100 ou citoqueratina 14 (DABBS & GOWN, 1999; YAZIJI et al., 2000; CHU & WEISS, 2001) são classicamente utilizados. Novos marcadores como maspin, p63 e CD10 também têm sido incluídos nos ensaios imuno-histoquímicos (REIS FILHO et al., 2001; BARBARESCHI et al., 2001; KALOF et al., 2004). Todos os marcadores acima descritos são citoplasmáticos com exceção da proteína p63. O uso dos marcadores citoplasmáticos em amostras provenientes de biópsias de aspiração por agulha fina (PAAF) é limitante, pois em alguns casos o citoplasma acaba sendo danificado (REIS-FILHO et al., 2002). Outra limitação encontrada na maioria dos marcadores mioepiteliais citados anteriormente, com exceção de p63, é que apresentam reação cruzada com outros elementos como miofibroblastos e fibroblastos estromais (DABBS & GOWN, 1999; YAZIJI et al., 2000) ou expressam também em uma pequena proporção de células luminiais (YAZIJI et al., 2000).

Em medicina veterinária, os marcadores mioepiteliais têm sido empregados principalmente em pesquisa direcionadas para a determinação da histogênese tumoral. Marcadores mioepiteliais como alfa-actina de músculo liso, S-100 (DESTEXHE et al., 1993), calponina (LOS MONTEROS et al., 2002), p63 (GAMA et al., 2003) e maspin (LOS MONTEROS et al., 2005) têm sido empregados com essa finalidade. Entretanto, o uso como ferramenta auxiliar na determinação de invasão ainda é limitado e poucos estudos abordaram esse aspecto.

2.2. Tumores mistos benignos e carcinomas em tumores mistos

2.2.1. Tumores mistos benignos

A incidência de tumores mamários na cadela é duas a três vezes superiores a na mulher. Embora haja algumas disparidades nos dados referentes à proporção de tumores benignos e malignos que acometem a mama da cadela, a maioria dos estudos verificaram que aproximadamente 50% dos tumores são benignos (LAGADIC et al., 1990; CASSALI, 2000). Dentre as neoplasias benignas, os tumores mistos benignos e os complexos são geralmente os mais freqüentes (MOULTON, 1990).

Os tumores mistos benignos são neoplasias que apresentam um complexo padrão histológico, visto que, são caracterizados pela proliferação de epiteliais luminais e/ou mioepiteliais benignas, elementos mesenquimais como cartilagem, osso além de gordura ou tecido fibroso (MISDORP et al., 1999). Na espécie humana os tumores mistos ou adenomas pleomórficos são lesões incomuns na mama, no entanto, são as neoplasias mais freqüentes nas glândulas salivares (VOZ et al., 2000). Os tumores mistos mamários da cadela e adenomas pleomórficos das glândulas salivares se assemelham em vários aspectos. Além de similaridades morfológicas (ELLIS & AUCLAIR, 1996; MISDORP et al., 1999), em ambos há uma relação inversamente proporcional entre o tamanho da glândula e a propensão para desenvolvimento de tumores malignos (COTRAN et al., 1999; GERALDES et al., 2000).

A origem histogênica dos elementos mesenquimais que compõem os tumores mistos é um dos aspectos que tem chamado atenção dos pesquisadores. Algumas contradições têm sido geradas ao longo do tempo. Estudos iniciais sugeriram que as células formadoras de tecidos mesenquimais como cartilagem e osso tinham origem epitelial (ALLEN, 1940). Posteriormente, HUGGINS & MOULDER (1944) sugeriram que os componentes mixóides, condróides e ósseos dos tumores mistos eram originados por metaplasia de componentes estromais. Atualmente, a hipótese inicialmente levantada por PULLEY (1973), o qual sugeriu uma origem mioepitelial para os componentes mesenquimais é a mais abordada e vem sendo amparada por diversas evidências. Modificações progressivas na composição das fibras do citoesqueleto haviam sido previamente descritas em estudo usando microscopia eletrônica (TATEYAMA & COTCHIN, 1978). Estudos empregando marcadores para componentes do citoesqueleto celular têm revelado que as células mioepiteliais em repouso mantêm suas características protéicas, no entanto, as células em proliferação começam a perder a expressão

de constituintes mioepiteliais como: alfa-actina de músculo liso, citoqueratinas, calponina e maspin (DEXTEXHE et al., 1993; GÄRTNER et al., 1999; LOS MONTEROS et al., 2002; LOS MONTEROS et al., 2005) e apresentam aumento paralelo de proteínas característica de fenótipo mesenquimal como vimentina, e uma proteína envolvida com diferenciação condrocitária denominada, tubulina tipo II (DEXTEXHE et al., 1993; GARTNER et al., 1999; ARAI et al., 2003). As modificações protéicas acompanham a transição fenotípica das células em proliferação, que se diferenciam para fusiformes e estreladas e provavelmente condroblastos. Corroborando com esses achados TATEYAMA et al. (2001), observaram a expressão de BMP-6 (proteína morfogênica óssea do tipo 6) nas células fusiformes e estreladas presentes no estroma passando por diferenciação condróide ou hialina.

2.2.2. Carcinomas em tumores mistos

Os adenomas pleomórficos da glândula salivar podem sofrer transformação maligna originando carcinomas ex-adenomas pleomórficos, também denominados carcinomas em tumores mistos ou tumores mistos malignos, cuja evolução está intimamente relacionada com o tempo de evolução do tumor e o número de recorrências (FOOTE & FRAZELL, 1953). De maneira similar ao que ocorre com os tumores mistos da espécie humana, os tumores mistos benignos da cadela também podem sofrer evolução temporal originando carcinomas em tumores mistos (MOULTON, 1990).

Os carcinomas em tumores mistos são caracterizados pelo desenvolvimento focal ou nodular de malignidade em associação com um tumor misto benigno primário (MISDORP et al., 1999). No entanto, em alguns casos a distinção entre o tumor benigno e sua contraparte maligna é difícil, pois o componente maligno pode ter substituído completamente o componente benigno (MISDORP, 2002). A mesma problemática é relatada no diagnóstico dos carcinomas ex-adenomas pleomórficos da glândula salivar humana. Muitas vezes é difícil saber se o tumor primário era benigno ou se o carcinoma já existia e não havia sido detectado, visto que, a malignidade pode se desenvolver a partir de tumores benignos clinicamente indetectáveis. Portanto, para o estabelecimento do diagnóstico de carcinoma ex-adenoma pleomórfico é preconizado que haja a evidência histológica de um tumor misto benigno em associação com um carcinoma (LEWIS et al., 2001).

Apesar da incidência em cadelas ser mais alta que em humanos, muito pouco se sabe sobre os aspectos relacionados à evolução e prognóstico dos carcinomas em tumores mistos

(MISDORP, 2002). É possível que isso decorra da ausência de critérios adequados e divergências no diagnóstico.

Na espécie humana a ocorrência de carcinomas ex-adenomas pleomórficos na glândula salivar é rara, mas os aspectos referentes ao seu comportamento são bastante abordados, pois os tumores apresentam um grande impacto já que são geralmente agressivos. Há muita inconsistência nos dados a respeito dos fatores preditivos e prognósticos e sobre o comportamento biológico que culmina com a malignidade dos carcinomas ex-adenomas pleomórficos. Isso provavelmente decorre de sua baixa incidência, e das divergências no diagnóstico em função das variedades histogênicas. Sabe-se que a malignidade parece estar relacionada com a extensão da invasão, a infiltração de estruturas subjacentes e o subtipo histológico (TORTOLEDO et al., 1984). Além disso, múltiplas recidivas locais associadas à incompleta excisão cirúrgica e/ou longo tempo de evolução do tumor estão diretamente relacionados à transformação maligna (LEONETTI et al., 2005). Alguns achados como mutações e ampliações em genes envolvidos com o controle do ciclo celular como o p53 (YAMAMOTO et al., 1996), p21 e c-myc (DEGUSHI et al., 1993) e aumento da expressão de receptores de fatores de crescimento e diminuição de proteínas de adesão e proteínas constituintes da membrana basal têm sido relacionados com a evolução dos carcinomas ex-adenomas pleomórficos.

2.3. Proteína p53

2.3.1. Estrutura e função

O gene p53 localiza-se no braço menor do cromossomo 17 e codifica uma fosfoproteína nuclear de 393 aminoácidos e 53 KD. O gene é composto por 11 exons. A região compreendida entre os exons 5 a 8 codifica a porção central da proteína, que contém o sítio para ligação a seqüências específicas de DNA. Outros exons codificam a região amino-terminal que contém o domínio de ativação da transcrição e a região carboxi-terminal responsável pela oligomerização (LANE, 1992). A região correspondente aos exons 3 a 8 foi seqüenciada em cadelas e apresenta 83% de homologia com a da espécie humana (KRAEGEL et al., 1995).

P53 é considerada uma proteína de supressão tumoral que exerce suas funções principalmente via regulação inibitória sobre do ciclo celular e via indução de apoptose. Em situações de estresse celular como hipóxia, diminuição de DNTPs e defeitos na telomerase, p53 promove bloqueio no ciclo celular, permitindo a reparação do DNA ou promove a morte celular, impedindo a multiplicação desordenada das células (EL-DEIRY et al., 1993; LEVINE, 1997). Essas ações são mediadas principalmente pela ligação de p53 a seqüências específicas localizadas nos sítios iniciadores de genes envolvidos no controle do crescimento e diferenciação celular como p21^{WAF1}, ou envolvidos na apoptose, como BAX. Existem evidências de que ações apoptóticas de p53 possam ocorrer também independentemente de sua ação na transcrição gênica. Uma das evidências interessantes foi a observação de que a alterações no domínio rico em prolina, localizado na região amino-terminal impediu a ação apoptótica de p53, mesmo com a capacidade de trans-ativar genes alvo da apoptose como BAX ter sido preservada (SAKAMURO et al., 1997).

A proteína p53 é constantemente expressa nas células, mas apresenta uma meia vida curta e com baixos níveis de expressão nas células normais (EL-DEIRY et al., 1993). Sua estabilidade é regulada principalmente pela proteína mdm2, a qual se liga a p53 sinalizando-a para degradação proteossomal (HAUPT et al., 1997). Outros reguladores atuantes tanto nos níveis transcricionais, traducionais ou pós-traducionais, bem como mutações que acarretam em alterações conformacionais também interferem com a estabilidade de p53 (LU, 2005).

2.3.2. A proteína p53 e neoplasias

A inativação da proteína p53 é considerada um dos principais eventos relacionados com o processo tumorigênico. A demonstração de que camundongos com deleção no gene p53 são altamente susceptíveis ao desenvolvimento de neoplasias, evidenciou o seu importante papel na supressão tumoral (DONEHOVER et al., 1992). Uma das causas mais freqüentes de inativação é a ocorrência de mutações que acarretam em modificações conformacionais na proteína, levando a um aumento de sua meia vida, e acúmulo nas células (LEVINE, 1997). As formas mutantes geram proteínas que perdem a capacidade de se ligar ao DNA e regular a transcrição dos genes alvo. Além disso, muitas formas mutantes impedem a ação da proteína normal, devido à formação de heteroligômeros (MILNER & MEDCALF, 1991). Portanto, a inativação abre uma porta para a proliferação descontrolada

das células, as quais se proliferam como clones p53 negativos, caso apresentem vantagem seletiva sobre as células normais (LEVINE, 1997).

O aumento da expressão da proteína p53 nos tecidos geralmente reflete alterações no gene ou no seu produto, e a avaliação da expressão imuno-histoquímica de p53 como ferramenta para predição de mutações tem sido foco de vários estudos. KRAGGERUD et al. (1997) e SCHMITT et al. (1998) observaram uma boa correlação entre aumento da expressão de p53 e mutações em neoplasias mamárias humanas. No entanto, em outros estudos não foi observada correlação entre ambas as alterações (GREENBLAT et al., 1994; SOONG et al., 1996). As divergências obtidas provavelmente resultam do fato de que nem toda a mutação acarreta em acúmulo protéico e nem todo acúmulo é decorrente de mutação. Outros fatores como estresse persistente (GRAEBER et al., 1994), instabilidade genética e interação com outras proteínas (HSIEH et al., 1999) também podem ocasionar aumento da estabilidade protéica. O emprego de critérios pouco precisos para avaliação da imuno-expressão de p53 também podem contribuir para a inconsistência obtida (SCHMITT et al., 1998).

Em neoplasias mamárias de cadelas, LEE et al. (2004), encontraram uma boa correlação entre o aumento da expressão e mutações. Os autores observaram mutação em seis dos sete tumores que haviam apresentado aumento da expressão de p53, mas estudos avaliando um maior número de casos são necessários para obtenção de conclusões mais sólidas.

Alterações em p53 (aumento da expressão nuclear e mutações) são freqüentes em tumores mamários de mulheres e cadelas. Os percentuais de mutações em tumores mamários de mulheres e cadelas variam de 20% a 40% e 15 a 35%, respectivamente. Em ambas as espécies os domínios mais conservados, referentes ao sítio de ligação ao DNA, são os maiores alvos de mutação (CARON & SOUSSI, 1992; MUTO et al., 2000; LEE et al., 2004). Embora as alterações em p53 sejam mais acentuadas nas lesões invasivas da mama humana, alguns autores observaram alterações em lesões pré-malignas como hiperplasias atípicas, carcinomas *in situ* e tumores benignos (KEOVHAVONG et al., 2004). A detecção de alterações de p53 em lesões pré-malignas juntamente com a observação do mesmo tipo de mutação tanto nos componentes invasores quanto nos componentes *in situ* (KANG et al., 2001), sugere que a inativação de p53 exerça um importante papel na progressão tumoral. O papel de p53 no processo de transformação maligna também parece ser importante para neoplasias da glândula salivar. YAMAMOTO et al. (1996) observaram que áreas benignas,

transicionais e carcinomatosas de carcinomas ex-adenoma pleomórficos apresentavam o mesmo tipo de alteração genética para p53 (perda da heterozigosidade e microssatélites). Porém, nas áreas carcinomatosas a alteração é mais acentuada. Algumas abordagens não verificaram mutações em lesões benignas da mama de cadelas (CHU et al., 1998). Porém, outros estudos observaram alterações em p53 tanto em lesões benignas quanto malignas da mama de cadelas, similar ao encontrado na espécie humana (MUTO et al., 2000; LEE et al., 2004).

Há controvérsias quanto ao valor prognóstico de p53 em neoplasias mamárias. Existem evidências de que o aumento da expressão imuno-histoquímica e/ou mutações de p53 são associados com negatividade para receptores esteroidais, alto grau histológico, alto índice de proliferação (ISOLA et al., 1992), aumento do risco de recorrência e prognóstico desfavorável (ANDERESSEN et al., 1993). Contraditoriamente, outros autores não observaram correlação entre o aumento de expressão de p53 e indicadores prognóstico desfavorável (OSTROWSKI et al., 1991).

A procura de marcadores tumorais para quimiosensibilidade é de grande interesse na medicina humana. Devido ao fato de grande parte das neoplasias mamárias apresentarem mutações em p53, diversos estudos têm abordado a relação entre alterações de p53 e resistência a tratamentos. Apesar de alguns estudos observarem uma correlação positiva entre o aumento de expressão ou mutação de p53 e ausência de resposta ao tratamento (BERNS et al., 2000; GEISLER et al., 2001), o papel de p53 como marcador é questionável. Muitas vezes a ausência de resposta se deve ao fenótipo mais maligno que p53 reflete e não a uma resistência mediada por p53 (FEKI & FINGER, 2004).

2.4. Proteína p63

2.4.1. Estrutura

A proteína p63 compreende um grupo de aproximadamente seis proteínas que são produzidas de um único gene, devido à utilização de dois promotores e *splicings* alternativos. O gene p63 também denominado de KET, p40, p73L e p51 (Gen Bank, acesso N AF091627), mapeado no cromossomo 3q27-29, é um dos membros mais recentes da família do gene de supressão tumoral p53. De maneira similar a p53, p63 codifica um domínio amino-terminal

de trans-ativação, um domínio central de ligação ao DNA e um domínio carboxi-terminal de oligomerização. No entanto, diferente de seu homólogo, o gene p63 possui dois sítios de iniciação transcripcionais, os quais podem gerar transcritos codificantes de proteínas com e sem o domínio de trans - ativação. O mRNA transcrito do promotor mais próximo região 5' codifica isoformas, apresentando o domínio de ativação da transcrição (TAp63). Contudo, a transcrição a partir do promotor mais próximo da região 3' codifica proteínas sem o domínio TA (Δ Np63). Além disso, ambos podem sofrer *splicings* alternativos resultando em diferentes formas do domínio carboxi-terminal. Conseqüentemente as isoformas TAp63 e Δ Np63 podem apresentar três variações do domínio carboxi-terminal denominados α , β , γ (YANG *et al.* 1998). As proteínas que contém o domínio do tipo alfa apresentam ainda uma região adicional denominada de SAM (*sterile alfa motif*). Há descrições de que esse domínio esteja envolvido na ativação da proteína, trans-ativação de outras moléculas importantes como as quinases e aumento da estabilidade da molécula (SERBER *et al.*, 2002).

2.4.2. Papel de p63 no bloqueio do ciclo celular e apoptose

A homologia entre o domínio central das proteínas p63 e p53 sugeriu que ambas compartilhavam similaridades na regulação da transcrição de genes alvo. Para confirmação da suspeita, YANG *et al.* (1998) avaliaram a capacidade de p63 em trans-ativar genes repórter controlados por elementos responsivos a p53. A isoforma TA-p63 γ demonstrou uma alta capacidade de ativar os genes repórter, mas a isoforma TA-p63 α não apresentou a mesma capacidade. A incapacidade das isoformas TA-p63 α em ativar os genes repórter provavelmente decorre da presença de um domínio inibitório na região carboxi-terminal identificado nos isotipos α em um estudo subsequente (SERBER *et al.*, 2002). As isoformas Δ Np63, que não continham o domínio amino-terminal requerido para trans-ativação gênica, não foram capazes de induzir a transcrição de genes responsivos à p53. Porém, elas exerceram um efeito negativo sobre a ativação de p53 e sobre as formas ativadoras de p63 como TA-p63 γ , tornando-as inativas (YANG *et al.*, 1998).

YANG *et al.* (1998) comprovaram que p63 também participa da apoptose mediada por p53. Vetores expressando diferentes isoformas de p63 foram transfectados em células de murinos. As células transfectadas com as isoformas TA-p63 γ foram altamente susceptíveis a morte celular, diferente das células que foram transfectadas com as isoformas TA-p63 α , as

quais não sofreram apoptose. No mesmo estudo, a isoforma $\Delta Np63\gamma$ mantinha uma pequena capacidade de ocasionar apoptose, este fato foi comprovado em estudos subseqüentes, os quais ressaltaram a função anti-apoptótica das variantes ΔN (LIEFER et al., 2000).

2.4.3. Papel de p63 nos tecidos

A primeira evidência do papel de p63 nos tecidos foi dada quando YANG et al. (1998) observaram a expressão de p63 nas camadas basais de diversos tecidos como epiderme, cérvix, vagina, bexiga, próstata de murinos e humanos. Esse achado foi interessante, pois todos esses tecidos apresentavam mesmo tipo de epitélio (estratificado ou de transição), e pelo fato de p63 ter sido expresso nas células basais, as quais são consideradas progenitoras das demais células nesses tecidos. Posteriormente, dois estudos avaliando o papel de p63 na embriogênese, verificaram que camundongos com deleção no gene p63 apresentavam ausência de epiderme e seus derivados e não desenvolviam diversos tecidos derivados das mesmas células que a epiderme como glândula mamária, glândula salivar, glândulas sebácea e lacrimal (YANG et al., 1999). A deleção de p63 também acarretou em deformidades e/ou ausência dos membros e deformidades crânio-faciais (YANG et al., 1999; MILLS et al., 1999). Os resultados dos dois estudos foram muito similares diferindo apenas na conclusão. MILLS et al. (1999) concluíram que p63 foi essencial tanto para o desenvolvimento inicial quanto para a diferenciação do epitélio, enquanto YANG et al. (1999) concluíram que p63 foi necessário apenas para o desenvolvimento inicial e manutenção do epitélio, já que a expressão de marcadores de diferenciação celular foi mantida.

O papel de p63 também é amparado por evidências clínicas. Diversas síndromes humanas, cujos sinais incluem alterações no desenvolvimento da glândula mamária, bem como de outros tecidos com origem ectodérmica, além de defeitos nas mãos e pés são associadas a mutações germinais no gene p63 (CELLI et al., 1999; FOMENKOV et al., 2003).

Após os resultados obtidos em camundongos, diversos estudos foram direcionados para determinar a expressão de p63 nos diferentes tecidos humanos. A expressão de p63 foi confirmada nas células progenitoras da pele, tonsilas, esôfago, cérvix, cálices renais, ureteres, bexiga, uretra mucosa oral e tecidos epiteliais simples como ácinos e ductos das glândulas salivar e próstata (DI COMO et al., 2002; NYLANDER et al., 2002; BILAL et al., 2003). A isoforma expressa na camada basal da maioria dos tecidos abordados foi $\Delta Np63\alpha$ (YANG et

al, 1998). NYLANDER et al. (2002) observaram que em tecidos com epitélio estratificado as camadas basais expressam a isoforma $\Delta Np63\alpha$ e as camadas mais superficiais expressam a TAp63. Esses achados corroboram com descrições posteriores que sugerem que as isoformas TAp63 são requeridas para a diferenciação celular, e que as isoformas $\Delta Np63$ estão envolvidas no processo de renovação mantendo a população de reserva, via inibição da transcrição de genes alvo de p53 (KOSTER et al., 2004).

2.4.4. Papel de p63 nas neoplasias

Com base nas evidências da participação de p63 ciclo normal de diversos epitélios e de que as isoformas TAp63 atuam de maneira similar a proteína p53, enquanto as isoformas $\Delta Np63$ apresentam funções opostas, diversas abordagens têm sido feitas com objetivo de avaliar o papel de p63 nas neoplasias.

Inicialmente, considerava-se que diferente do seu homólogo, mutações no gene p63 não estavam relacionadas com a ocorrência de neoplasias (HAGIWARA et al., 1999). Porém, em um estudo recente verificou-se que camundongos com deleção heterozigótica para p63, desenvolveram uma série de tumores malignos acompanhadas por um aumento de lesões benignas e pré-malignas, reforçando a participação de p63 no processo neoplásico (FLORES et al., 2005). Foi demonstrado também que p63 pode cooperar com p53, pois a presença concomitante de mutações heterozigóticas em p63 e p53 resultou em tumores com fenótipo mais agressivo, quando comparado com os tumores decorrentes de animais que dispunham alteração em um único gene.

Paralelamente, em estudos com neoplasias da espécie humana, neoplasias como adenocarcinoma da mama (DI COMO et al., 2002) e carcinoma da bexiga (PARK et al., 2000), carcinomas ex-adenoma pleomórfico da parótida (GENELHU et al., 2006) haviam sido associadas com a perda da expressão de p63. FLORES et al. (2005) também observaram que vários adenocarcinomas mamários e carcinomas da bexiga perderam a expressão de p63 como decorrência de perda da heterozigozidade no gene. Adicionalmente, alguns tumores mantiveram a expressão das isoformas $\Delta Np63$, mas perderam das isoformas TAp63, indicando que a perda das isoformas TAp63 pode ser importante para a progressão desse tipo de neoplasia também na espécie humana. Previamente, PARK et al. (2000) já haviam

observado perda da isoforma TA em carcinomas de células de transição na bexiga humana, confirmando a função supressora de p63.

Adicionando mais complexidade às informações, outros tumores como carcinomas de células escamosas da cavidade oral (LO MUZIO et al., 2005) e carcinomas da pele (MOLL et al., 2001), são associados com aumento da expressão das isoformas Δ Np63, indicando possível papel como oncogene. Os dados obtidos até o momento refletem a complexidade do papel e regulação de cada isoforma, cujas ações são provavelmente tecido-específicas.

2.4.5. p63 e o tecido mamário

No tecido mamário humano e de cadelas a proteína p63 é expressa nas células mioepiteliais dos ductos e lóbulos (BARBARESCHI et al., 2001; GAMA et al., 2003). Na maioria das investigações a isoforma Δ Np63 α foi a mais expressa na camada basal e baixos níveis de mRNA de TAp63 foram detectados nessas células (BARBARESCHI et al., 2001). NYLANDER et al. (2002) utilizando anticorpos específicos para as isoformas detectaram que algumas células epiteliais luminais também expressaram a isoforma TAp63. Considerando que a isoforma Δ Np63 mantém a capacidade proliferativa das células, seu predomínio nas células mioepiteliais reforça a hipótese de que o mioepitélio hospeda as células progenitoras da mama (SMITH & MEDINA, 1988).

Os tumores benignos de mulheres e de cadelas tendem a manter a expressão de p63 no núcleo das células mioepiteliais ductais e alveolares (BARBARESCHI et al., 2001; REIS-FILHO et al., 2002; REIS-FILHO et al., 2003; RIBEIRO-SILVA et al., 2003; GAMA et al., 2003). Similar ao tecido normal, algumas células luminais expressam p63 (REIS FILHO et al., 2003) e essa expressão é atribuída a uma possível diferenciação ligada ao mioepitélio. Conforme descrito no tópico anterior, em lesões malignas como adenocarcinomas (DI COMO et al., 2002) e demais carcinomas invasores (BARBARESCHI et al., 2001; REIS FILHO et al., 2003), observa-se diminuição ou perda da expressão de p63. É importante lembrar que nos carcinomas invasivos muitas vezes a diminuição da expressão está relacionada com a perda da camada mioepitelial que acompanha a invasão. Nos tumores que mantêm a expressão de p63 apenas a isoforma Δ Np63 α é identificada na camada basal (BARBARESCHI et al., 2001; NYLANDER et al., 2002) reforçando a hipótese apontada por FLORES et al. (2005), os quais sugerem que a perda da isoforma TAp63 possa ser um importante passo para a progressão

tumoral. Em neoplasias com diferenciação escamosa e com diferenciação mesenquimal, p63 apresenta uma alta expressão, refletindo uma histogênese mioepitelial.

P63 tem demonstrado maior especificidade e similar sensibilidade para marcação do mioepitélio, quando comparado com os biomarcadores tradicionais (BARBARESCHI et al., 2001; NYLANDER et al., 2002; REIS FILHO et al., 2003; WERLING et al., 2003). Mas, seu uso como marcador confiável na determinação de invasão não foi confirmado (RIBEIRO SILVA et al., 2003).

Por outro lado, p63 tem sido empregado como ferramenta no acesso da histogênese de alguns tumores com diferenciação mioepitelial como carcinomas metaplásicos. Os carcinomas metaplásicos da mulher são tumores malignos em que o epitélio carcinomatoso é parcial ou totalmente transformado em elementos aglandulares como: células escamosas, células fusiformes, cartilagem e osso, os quais possivelmente possuem origem mioepitelial. A observação da expressão de p63 nos vários componentes dos carcinomas metaplásicos (REIS FILHO et al., 2003) reforçou a possibilidade de histogênese mioepitelial. Posteriormente, foi proposto que p63 pode ser usado como ferramenta na diferenciação de carcinomas metaplásicos de outros tumores mesenquimais (KOKER & KLEER, 2004). A confirmação da expressão de p63 no mioepitélio canino também sugere o uso de p63 como marcador na definição da histogênese dos tumores mistos e complexos (GAMA et al., 2003) e adenomas pleomórficos da glândula salivar humana (GENELHU et al., 2006).

2.4.6. Interação entre p53 e p63

A homologia entre os domínios de p53 e p63 sugeriu que ambas poderiam interagir fisicamente através da formação de heterooligômeros. A comprovação da interação foi descrita por vários estudos *in vitro*, mas só as formas mutantes de p53 foram capazes de se associarem e inibirem a ativação transcripcional tanto de p63 como p73 (DI COMO et al., 1999; GAIDDON et al., 2001, STRANO et al., 2002). Esse pode ser um mecanismo tumorigênico adicional pelo qual, formas mutantes de p53 interferem negativamente sobre a capacidade transcripcional de p63 sobre genes alvo envolvidos com a diferenciação, apoptose e controle do crescimento celular. Essa via também pode estar envolvida com o controle sobre a estabilidade de p63 e conseqüentemente, com alterações na expressão observadas nos tumores. Um estudo *in vitro* evidenciou que formas mutantes de p53 se associaram e promoveram a degradação de isoformas $\Delta Np63$ (RATOVTSKI et al., 2001). A capacidade de

interação, bem como a ação resultante parece depender do tipo de mutação (RATOVTSKI et al., 2001; GAIDDON et al., 2001).

3. CAPÍTULO 1

TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

EXPRESSÃO DE P63 E P53 EM TUMORES MAMÁRIOS MISTOS DE CADELAS

A.C. BERTAGNOLLI, G.D.CASSALI, F. A.COSTA, J. F. C. OLIVEIRA,
P.B.D.GONÇALVES

Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal, Universidade
Federal de Santa Maria, Rs, Brasil (ACB, JFCO, PBDG,) e Laboratório de Patologia
Comparada, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brasil (GDC, FAC)

VETERINARY PATHOLOGY, 2006

EXPRESSÃO DE P63 E P53 EM TUMORES MAMÁRIOS MISTOS DE CADELAS

A.C.BERTAGNOLLI, G.D.CASSALI, F.A. COSTA, J. F. C. OLIVEIRA,
P.B.D.GONÇALVES

Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal, Universidade Federal de Santa Maria,
RS, Brasil (ACB, JFCO, PBDG) e Laboratório de Patologia Comparada, Universidade
Federal de Minas Gerais, MG, Brasil (GDC, FAC)

Resumo

A proteína p63 é expressa no núcleo das células mioepiteliais da mama e apresenta funções sinérgicas ou antagonistas com a proteína de supressão tumoral p53. A expressão imuno-histoquímica de p63 foi estudada para acessar o papel das células mioepiteliais na histogênese dos tumores mistos. Adicionalmente, avaliou-se a possível relação entre expressão imuno-histoquímica de p63 e p53 com a finalidade de obter informações sobre a biologia desses tumores. Quatro amostras de mama normais, 20 tumores mistos benignos, 35 carcinomas em tumores mistos e 11 carcinomas tubulopapilares foram avaliados. Células mioepiteliais, formando camadas periductais/periacinares contínuas, foram imunoreativas para p63 na mama normal e nos tumores mistos benignos. Todos os carcinomas em tumores mistos e 72,7% (8/11) dos carcinomas tubulopapilares foram reativos para p63. A reatividade para p63 foi superior nos tumores mistos benignos quando comparada com os carcinomas.

Nos tumores mistos células mioepiteliais com formato fusiforme e estrelado presentes no estroma mucinoso foram reativas para p63. A proteína p53 foi expressa em 20,0% (4/20), 28,6% (10/35) e 36,4% (4/11) dos tumores mistos benignos, carcinomas em tumores mistos e carcinomas tubulopapilares, respectivamente. Não houve relação entre a expressão de p53 e p63 nos diferentes tipos tumorais. O presente estudo evidenciou a participação das células mioepiteliais na histogênese dos tumores mistos. A diminuição da expressão de p63 nas células mioepiteliais que compõem a camada basal dos carcinomas pode ser um evento importante para a progressão tumoral.

Palavras-chave: p63; p53; célula mioepitelial; mama; cão.

Abstract

The p63 protein is expressed in the nuclei of the mammary myoepithelial cells and has synergisms or antagonisms with p53 tumor suppressor protein. The immunohistochemistry expression of p63 was studied for access the role of myoepithelial cells in histogenesis of the mixed tumors. Additionally, the possible association between p63 and p53 for access the biological aspects of this tumors was evaluated. Four specimens of the normal gland, 20 benign mixed tumors, 35 carcinomas in mixed tumors and 11 tubulopapillary carcinomas were evaluated. Myoepithelial cells forming layers periductals/periacinars continuous were reactive for protein p63 in normal gland and in benign mixed tumor. The carcinomas in mixed tumors and 72.7% (8/11) tubulopapillary carcinomas were reactive for p63. In the mixed tumors star and spindle –shaped cells were reactivity for p63. The p53 protein was expressed in 20.0% (4/20), 28.6% (10/35) and 36.7% (4/11), benign mixed tumors, carcinoma in mixed tumors and tubulopapillary carcinomas, respectively. There was not relation between p63 and p53 expression in none type of tumor. The present study point the participation of the myoepithelial cells in the histogenesis of the mixed tumors. The decrease in p63 expression in the basal myoepithelial cells of the carcinomas may be important for tumoral progression.

Keywords: p63; p53; myoepithelial cell; breast; dog.

Os tumores mistos são neoplasias freqüentes na mama da cadela e na glândula salivar humana, onde são também denominados adenomas pleomórficos.^{26,38} Os tumores mistos são caracterizados pela proliferação de células luminiais e mioepiteliais dispersas em um estroma mixóide, condróide, osteóide ou lipídico.^{8,24} De maneira similar aos adenomas pleomórficos da glândula salivar humana, os tumores mistos da cadela podem desenvolver focos carcinomatosos originando carcinomas em tumores mistos.²⁵ Dois aspectos referentes aos

tumores mistos permanecem sem esclarecimento: a origem histogênica dos constituintes heterólogos que os compõem e o mecanismo que acompanha e determina a evolução maligna de alguns tumores. Várias evidências em tumores mistos e adenomas pleomórficos apontam para uma histogênese mioepitelial.^{5, 13, 14, 18, 19}

Diversos eventos moleculares têm sido associados com a transformação maligna dos adenomas pleomórficos humanos.^{7,9} Dentre eles destacam-se mutações e aumento da expressão de p53.^{1, 11, 39} P53 é uma proteína de supressão tumoral que atua promovendo bloqueio do ciclo celular e apoptose em resposta a danos no DNA. Portanto, sua inativação exerce papel fundamental na proliferação desordenada de células.^{6, 17} Recentemente, alterações em p63, membro da família p53, também têm sido descritas em tumores salivares.^{14, 22} P63 participa do desenvolvimento e diferenciação normal dos epitélios e pode apresentar ações sinérgicas e/ou antagonistas à proteína p53.^{23, 40} No tecido mamário humano e canino, p63 é expressa no núcleo das células mioepiteliais, sendo considerada um marcador com boa especificidade e sensibilidade para esse tipo celular, uma vez que não reage com miofibroblastos estromais.^{3, 12} Estudos *in vitro* sugerem que formas mutantes de p53 podem interagir com p63 modificando a sua estabilidade.²⁹ No presente estudo, avaliou-se a expressão imuno-histoquímica de p63 e p53 em tumores mamários da cadela. Objetivou-se acessar o papel das células mioepiteliais na histogênese dos tumores mistos. Adicionalmente, avaliou-se a possível relação entre expressão imuno-histoquímica de p63 e p53 com a finalidade de obter informações sobre a biologia desses tumores.

Material e Métodos

Amostras de tecidos

Amostras de neoplasias mamárias e de tecido mamário normal foram obtidas de cadelas de várias raças, seguindo-se extirpações cirúrgicas realizadas no Hospital da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais e em uma clínica veterinária localizada

em Belo Horizonte–MG. As amostras de tecido mamário normal foram obtidas em necropsias realizadas no Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte. As amostras foram fixadas por 24 horas em formol a 10% tamponado, incluídas em parafina, seccionadas a 4 micrometros e coradas com hematoxilina – eosina (HE). O diagnóstico histológico foi realizado sob secções coradas com HE de acordo com os critérios diagnósticos para tumores mamários de cadelas propostos por Misdorp et al. (1999). Após a revisão dos casos, 4 amostras de mama normal e 66 amostras tumorais incluindo: 20 tumores mistos benignos, 35 carcinomas em tumores mistos e 11 carcinomas tubulopapilares foram selecionadas para os estudos imuno-histoquímicos.

Imuno-histoquímica

Os anticorpos primários usados para os estudos imuno-histoquímicos incluíram anticorpo monoclonal de rato (clone 4A4, Neomarkers, Freemont, CA, USA), que reconhece tanto as isoformas TA quanto as isoformas Δ N, da proteína p63 humana, diluído em buffer fosfato salina (PBS) na diluição 1:100 em pH 7,4. Para reconhecimento da proteína p53, utilizou-se um anticorpo policlonal de camundongo (clone CM1, Novocastra, Reino Unido) na diluição 1:150. Vinte e dois tumores foram selecionados para realização de um estudo imuno-histoquímico adicional, utilizando-se um anticorpo contra a alfa-actina de músculo liso (ASMA, clone 1A4, Dako, Denmark), um marcador tradicional de células mioepiteliais, empregando-se a diluição de 1:100.

Para os estudos imuno-histoquímicos secções de 4 micrometros foram cortadas de cada caso e coletadas sobre lâminas gelatinizadas. As lâminas foram desparafinizadas, re-hidratadas em uma série de álcoois progressivamente diluídos, e submetidas a recuperação antigênica pelo calor (banho maria a 95° por 20 minutos) com Target Retrieval Solution, pH 6.0. Posteriormente as lâminas foram incubadas em peróxido de hidrogênio 3% em metanol

para o bloqueio da atividade da peroxidase endógena por 15 minutos. Após o resfriamento, as lâminas foram cobertas com soro normal de coelho a 10% em PBS por 15 minutos.

Posteriormente, foram incubadas com o anticorpo primário por 1 hora a 25° e na seqüência foi aplicado o método do complexo estreptavidina-biotina peroxidase (ABC; Ultra vision large volume detection system anti-polyvalent, HRP – ready to use- Lab Vision; DAKO K0690).

Finalmente as secções foram expostas ao cromógeno 3,3 – diaminobenzidina 4 HCL e contra-coradas com hematosilina de Mayer's.

Controles negativos foram obtidos pela substituição do anticorpo primário por PBS. O tecido mamário normal adjacente aos tumores serviu como controle interno em cada teste.

Amostras de mama normal foram utilizadas como controle positivo para p63 e ASMA.

Tumores positividade previamente confirmada foram usados como controles positivos para p53.

Avaliação imuno-histoquímica

Reatividade para p63 e p53 foi indicada pela presença de distinta marcação nuclear.

Imuno-marcação citoplasmática indicou reatividade para ASMA. Preconizou-se a avaliação da imunoexpressão de p63 e ASMA em quatro tipos de células mioepiteliais, que foram classificadas segundo a sua morfologia em células mioepiteliais constituintes da camada basal periductal e periacinar (em repouso ou em proliferação) e células com formato fusiforme e estrelado presentes no estroma. O número de células positivas para p63 e ASMA foi avaliado semi-quantitativamente, utilizando o escore proposto por Reis Filho et al. (2002)a: -, ausência de marcação; +, <5% das células marcadas; ++, 5-50% das células marcadas; +++, >50% das células marcadas. O número de células reativas para p53 foi determinado como a percentagem de células positivas sobre o total de células contadas em 10 campos. Posteriormente, os casos foram categorizados obedecendo aos mesmos escores usados para p63, mas somente os tumores com escore ++ a +++ foram considerados

positivos.³⁵ Para avaliação da relação entre p63 e p53, o número total de células positivas para p63 foi acessado pela contagem do total de células positivas em 10 campos do tumor, selecionando-se as áreas com maior concentração de marcação.

Análise estatística

As comparações entre os diferentes tumores e a expressão de p63 e p53 foram analisadas pelo teste de ANOVA em um modelo estatístico para dados categóricos, utilizando o PROC CATMOD (CATEGORICAL DATA ANALYSIS PROCEDURES) no programa estatístico SAS (1998). Quando foram detectadas diferenças estatísticas, as variáveis independentes foram comparadas pelo teste de contraste. Para determinar a relação entre a variável independente (número de células reativas para p63) e a variável dependente (p53) os dados foram transformados pelo PROC RANK e analisados por regressão polinomial no PROC GLM.^{4, 36}

RESULTADOS

Tecido mamário normal

Na glândula mamária normal (Fig.1) e tecido mamário normal adjacente aos tumores (Fig.2), as células mioepiteliais da camada basal foram intensamente reativas para p63 (+++). As células reativas formaram camadas contínuas ao redor de ductos e ácinos. Não houve imunoreatividade em células epiteliais luminiais ou componentes estromais. Nos casos em que a alfa-actina de músculo liso foi avaliada, as mesmas células que marcaram para p63 também apresentaram reatividade citoplasmática para ASMA. Não houve imunoreatividade para p53.

Tumores mistos benignos (n=20)

Esses tumores foram constituídos pela proliferação de células benignas, morfológicamente caracterizadas como epiteliais luminiais e/ou mioepiteliais, acompanhadas de matriz mixóide e/ou condróide. Além das células mioepiteliais constituintes da camada

basal (repouso ou proliferação), células mioepiteliais com formato fusiformes e estrelado também foram observadas dispersas no estroma.

Todos os tumores foram reativos para p63. A maior imunoreatividade para p63 foi observada no núcleo das células mioepiteliais que compunham a camada basal. Dezesesseis tumores apresentaram uma intensa reatividade (+++) e outros 4 tumores apresentaram reatividade moderada (++) (Tabela 1). Nas áreas apresentando componentes mesenquimais, células mioepiteliais com formato fusiforme ou estrelado foram pouco reativas para p63 (+).

Um estudo imuno-histoquímico adicional, utilizando a ASMA foi realizado em cinco tumores, para confirmar a o fenótipo mioepitelial das células marcadas para p63. As mesmas células que marcaram para p63 também apresentaram imunoreatividade citoplasmática para ASMA (Tabela 2). Quatro dos 20 tumores mistos benignos foram positivos para p53 (Tabela 3).

Carcinomas em tumores mistos (n=35)

Esses tumores apresentaram as mesmas características histológicas que os tumores mistos benignos, porém com a presença de componentes epiteliais carcinomatosos. Todos os carcinomas associados a tumores mistos apresentaram células imunoreativas para p63. As células mioepiteliais da camada basal apresentaram intensa reatividade em 3 tumores (+++), moderada (++) em 15 e baixa (+) em 17 (Tabela 1). Em 7 de 10 casos submetidos ao estudo adicional com ASMA, as células mioepiteliais da camada basal que apresentaram ausência de reatividade p63 também foram negativas para ASMA. Em três casos a imunoreatividade para ASMA foi preservada em muitas células que não haviam marcado para p63 (Tabela 2, Figuras 3 e 4). As células mioepiteliais com formato fusiforme e estrelado apresentaram baixa reatividade (+) para p63, conforme observado nos tumores mistos benignos. Em sete tumores, células com aparência epitelial foram reativas para p63 e ASMA, em três casos a positividade

foi observada em células com metaplasia escamosa (Tabela 2). Dez dos 35 tumores foram positivos para p53 (Tabela 3).

Carcinomas Tubulopapilares (n=11)

Os carcinomas tubulopapilares foram caracterizados pela proliferação de células epiteliais malignas apresentando um padrão tubular ou formando múltiplas papilas nos ductos. Três carcinomas invasores de alto grau foram negativos para p63 (-). Oito dos onze carcinomas tubulopapilares apresentaram células reativas para p63. Em três casos as células mioepiteliais da camada basal apresentaram baixa reatividade (+) para p63, dois casos apresentaram moderada reatividade (++) e um caso apresentou intensa reatividade (+++). Em outros dois casos somente células com aparência epitelial foram reativas para p63 (+++) (Tabela 1).

Sete casos foram submetidos ao estudo adicional com ASMA (Tabela 2). Em cinco deles as células que não reagiram para p63 também foram imunonegativas para ASMA. Em dois casos células imunonegativas para p63 foram reativas para ASMA. Quatro dos 11 carcinomas tubulopapilares foram positivos para p53 (Tabela 3).

Expressão de p63 e p53 nos diferentes tumores

A reatividade para p63 foi significativamente superior nos tumores mistos benignos quando comparada com os carcinomas em tumores mistos e carcinomas tubulopapilares ($p < 0,001$, Fig.5). O número de tumores positivos para p53 não diferiu estatisticamente entre os diferentes tipos tumorais. Não houve relação entre o número de células positivas para p63 e a expressão de p53 nos diferentes tumores.

DISCUSSÃO

No presente estudo, observou-se uma diminuição na imunoreatividade para p63 nas células mioepiteliais que compunham a camada periductal/periacinar de 91.4% dos carcinomas em tumores mistos. O estudo imuno-histoquímico adicional utilizando a ASMA evidenciou que a redução da imunoreatividade para p63 foi associada com a perda das células mioepiteliais em 70% dos casos submetidos à dupla investigação. Portanto, a diminuição de reatividade observada nos tumores avaliados provavelmente esteja associada com a capacidade invasiva desses tumores. Complementando essa observação, três carcinomas tubulopapilares invasores de alto grau foram destituídos de imunoreatividade p63. O acesso à integridade da camada mioepitelial é uma importante ferramenta para o diagnóstico diferencial entre lesões *in situ* e lesões invasoras, visto que a degradação células mioepiteliais e da membrana basal são pré-requisitos para invasão.⁴¹ Além disso, recentes estudos têm observado que a perda na integridade da camada periductal é associada com características preditivas de fenótipo mais agressivo em carcinomas humanos.^{20,21} Por outro lado, em 30% dos tumores observou-se que a diminuição da proteína p63 não coincidiu com a diminuição de ASMA. Este achado sugere a ocorrência de uma diminuição gradual na expressão da proteína p63, precedendo a perda das células mioepiteliais nesses tumores. Resultados similares já haviam sido observados em carcinomas ductais humanos.³³ A transcrição do gene p63 pode originar tanto isoformas que ativam os mesmos genes alvo de p53, compartilhando a função de supressão tumoral (TAp63), quanto isoformas que atuam como oncogenes impedindo a ativação transcricional tanto de p53 como das isoformas TA (Δ Np63).⁴⁰ Com base nesse conhecimento, é possível que a diminuição da expressão de p63 observada nesses tumores esteja relacionada com a perda da isoforma que apresenta função na supressão tumoral. Corroborando com esta hipótese, um recente estudo observou diminuição da expressão da isoforma TA em carcinomas ex - adenomas pleomórficos humanos.²²

A diminuição de reatividade para p63 observada nas células mioepiteliais à medida que se proliferaram no estroma mucinoso (mioepiteliais fusiformes e mioepiteliais estreladas) dos tumores mistos, evidenciou a participação das células mioepiteliais no processo metaplásico desses tumores. Tem sido demonstrado que durante a transformação metaplásica dos tumores mistos, as células da camada basal mantêm seu perfil protéico, enquanto as células mioepiteliais estromais apresentam diminuição progressiva de seus componentes citoesqueléticos com paralelo aumento de proteínas envolvidas com diferenciação mesenquimal.^{2, 5, 11, 13, 18, 19, 37} A presença de reatividade para p63 nas células epiteliais com metaplasia escamosa em 5.7% dos tumores é esperada uma vez que p63 é considerado um marcador sensível e específico para células com diferenciação escamosa.^{16, 32} A presença de reatividade para p63 em células sem diferenciação escamosa observada em nosso estudo já havia sido descrita em tumores humanos e de cadelas e provavelmente reflete a ocorrência de diferenciação mioepitelial.^{11, 31} Adicionalmente, um tumor diagnosticado pelo HE como carcinoma tubulopapilar foi totalmente constituído por células com aparência epitelióide, imunoreativas tanto para p63, quanto para asma. Tumores malignos humanos com imunofenótipo mioepitelial e ausência de características imunofenotípicas glandulares são classificados como carcinomas mioepiteliais.¹⁵ Os achados sugerem a realização de estudos imuno-histoquímicos adicionais, principalmente com marcadores epiteliais, com a finalidade melhor caracterizar este tumor.

No presente estudo não foi observada associação entre a expressão imuno-histoquímica de p53 e p63. Estudos empregando a análise mutacional de p53 e a distinção das isoformas de p63 devem ser dirigidos para melhor investigar este aspecto, pois a capacidade regulatória das formas mutantes de p53 parece estar relacionada com o tipo de isoforma de p63 e depende do tipo de mutação de p53.¹⁰ Aumentos da expressão de p53 em tumores benignos, conforme observado no presente estudo têm sido descrito em tumores mamários

caninos e humanos e provavelmente reflete a participação da proteína p53 nos processos iniciais de tumorigênese.^{27, 34} A associação entre o aumento da expressão de p53 e maior índice proliferativo em adenomas pleomórficos humanos, bem como a observação de que tanto as áreas benignas quanto carcinomatosas dos carcinomas em tumores mistos compartilham o mesmo tipo de mutação de p53 fortalecem a hipótese.^{28, 39} Em conclusão, p63 evidenciou a participação das células mioepiteliais na origem dos elementos heterólogos que compõem os tumores mistos. A diminuição da expressão de p63 nas células mioepiteliais que compõem o compartimento basal nos carcinomas pode ser um evento relacionado com a progressão tumoral.

Agradecimentos

A Clínica Veterinária São Francisco e equipe cirúrgica da Escola de Veterinária da UFMG pela doação dos tumores. A FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro. Ao colega Enio Ferreira pelo apoio técnico.

Referências

- 1 Alves FA, Pires FR, Almeida OP, Lopes MA, Kowaski LP: PCNA, Ki-67 and p53 expression in submandibular salivary gland tumours. *Int J Oral Maxillofac Surg* **33**: 593-597, 2004
- 2 Arai K, Nakano H, Shibutani M, Naoi M, Matsuda H: Expression of class II tubulin by proliferative myoepithelial cells in canine mammary mixed tumors *Vet Pathol* **40**: 670-676, 2003
- 3 Barbareschi M, Pecciarini L, Cangi GM, Macri E, Rizzo A, Viale G, Doglioni C: P63, a p53 Homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast. *Am J Surg Pathol* **25**:1054-1060, 2001
- 4 Conover WJ, Iman RL: Rank transformation as bridge between parametric and

nonparametric statistics. *American Statistician* **35**:124-129, 1981

5 Destexhe E, Lespagnard, M, Degeyter M, Heyman R, Coignoul F: Immunohistochemical identification of myoepithelial, epithelial, and connective tissue cells in canine mammary tumors. *Vet Pathol* **30**: 146-154, 1993

6 Donehower LA, Harvey M, Slagle B L, McArthur MJ, Montgomery CA, Allanbradley JS: Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**: 215-221, 1992

7 El-Naggar AK, Callender D, Coombes MM, Hurr K, Luna MA, Batsakis JG: Molecular alterations in carcinoma ex-adenoma pleomorphic adenoma: a putative progression model? *Genes* **27**:162-168, 2002

8 Ellis GL, Auclair PL: Tumors of the salivary glands: In: *Atlas of Tumor Pathology*, 3rd series, fascicle 17, p.39. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 1996

9 Foote FWJR, Frazell EL: Tumors of the major salivary glands. *Cancer* **6**:1065-133, 1953

10 Gaiddon C, Lokshin M, Ahn j, Zhang T, Prives CA. A subset of tumor – derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol Cell Biol* **21**: 874-1887, 2001

11 Gallo O, Franchi A, Biabchi S, Boddi V, Giannelli E, Alajmo E: P53 Oncoprotein expression in parotid gland carcinoma is associated with clinical outcome. *Cancer* **75**:2011-2037, 1995

12 Gama A, Alves A, Gartner F, Schmitt FC: P63: A novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues *Vet Pathol* **40**: 412-240, 2003

13 Gärtner F, Geraldés M, Cassali G, Rema A, Schmitt FC: DNA measurement and immunohistochemical characterization of epithelial and mesenchymal cells in canine mixed mammary tumours:putative evidence for a common histogenesis *Vet Pathol* **158**:39-47, 1999

14 Genelhu MCL, Gobbi H, Soares FA, Campos AHJFM, Ribeiro CA, Cassali GD:

Immunohistochemical expression of p63 in pleomorphic adenomas and carcinomas ex-pleomorphic adenomas of salivary glands *Oral* **42**: 154-160, 2006

15 Jones C, Foschini MP, Chaggar R, Lu YJ, Wells D, Shipley JM, Eusebi V, Lakhani SR. Comparative genomic hybridization analysis of myoepithelial carcinoma of the breast *Lab Invest* **80**:831-836, 2000

16 Koker MM, Kleer CG. P63 expression in breast cancer. *Am J Surg Pathol* **28**: 1506-1512, 2004

17 Levine AJ: P53 the cellular gatekeeper of growth and division *Cell* **88**: 323-331, 1997

18 Los Monteros AE, Millán MY, Ordás J, Carrasco L, Reymundo C, Las Mulas JM: Immunolocalization of smooth muscle-specific protein calponin in complex and mixed tumors of the mammary gland of the dog: assessment of the morphogenetic role of the myoepithelium *Vet Pathol* **39**: 247-256, 2002

19 Los Monteros AE, Millán MY, Ramírez GA, Ordás J, Reymundo C, Las Mulas JM: Expression of Maspin in mammary gland tumours of the dog *Vet Pathol* **42**:250-257, 2005

20 Man YG, Tai L, Barner R, Vang R, Saenger JS, Shekittka KM, Bratthauer GL, Wheeler DT, Liang CL, Vinh TN, Strauss BL: Cell clusters overlying focally disrupted mammary myoepithelial cell layers and adjacent cells within the same duct display different immunohistochemical and genetic features: implications for tumor progression and invasion. *Breast Cancer Research* **5**:231-241, 2003

21 Man YG, Zhang Y, Shen T, Zeng X, Tauler J, Mulshine JL, Strauss BL: cDNA expression profiling reveals elevated gene expression in cell clusters overlying focally disrupted myoepithelial cell layers: implications for breast tumor invasion *Breast Cancer Research and Treatment* **89**:199-208, 2005

22 Maruya SI, Kies MS, Williams M, Myers JN, Weber RS, Batsakis JG, El-Naggar AK: Differential expression of p63 isotypes (N and TA) in salivary gland neoplasms: biological

- and diagnostic implications *Hum Pathol* **36**:821-827, 2005
- 23 Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DN, Bradley A: P63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis *Nature* **398**:708-713, 1999
- 24 Misdorp W, Else W, Hellmén, E, Lipscomb, TP: Histological Classification of the Mammary tumors of the Dog and the Cat. Second Series. Volume VII. WHO International Histological Classification Tumors of Domestic Animals. AFIP, Washington, DC, 1999
- 25 Misdorp W: Tumors of the mammary gland: In: *Tumor in Domestic Animals*, ed Meuten DJ, 4th ed., pp.589-606. Iowa State Press, Ames, IA, 2002
- 26 Moulton, J.E. Tumors of the mammary gland. In: *Mammary Tumors in Domestic Animals*, ed Moulton. JE, 3th ed., pp.518-522. University of California Press, Berkeley, CA, 1990
- 27 Muto T, Wakui S, Tanakahashi H, Maekawa S, Masaoka T, Ushigome S, Furusato M: P53 gene mutations occurring in spontaneous benign and malignant mammary tumors of the dog *Vet Pathol* **37**:248-253, 2000
- 28 Ohtaké S, Cheng J, Ida H, Suzuki M, Ohshiro K, Zhang W, Saku T: Precancerous foci in pleomorphic adenoma of the salivary gland: recognition of focal carcinoma and atypical tumor cells by p53 immunohistochemistry *J Oral Pathol Med* **31**:590-597, 2002
- 29 Ratovitski EA, Patturajan M, Hibi K, Barry T, Yamaguchi K, Sidransky. P53 associates with and targets $\Delta Np63$ into a protein degradation pathway *PNAS* **98**:1817-1722, 2001
- 30 Reis-Filho JS, Milanezi F, Albergaria A, Schmitt, FC: P63 staining of myoepithelial cells in breast fine needle aspirates: a ductal carcinomas of the breast *J Clin Pathol* **55**:936-939, 2002
- 31 Reis-Filho J.S, Torio B, Albergaria A, Schmitt, FC: P63 expression in normal skin and usual cutaneous carcinomas *J Cutan Pathol* **29**: 517-523, 2002. b
- 32 Reis-filho JS, Milanezi, F, Paredes J, Silva P, Pereira EM, Maeda AS, Carvalho LV, Schmitt FC: Novel and Classic Myoepithelial/Stem Cell Markers in Metaplastic Carcinomas of the Breast. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* **11**: 1-8, 2003.

- 33 Ribeiro-Silva A, Ramalho LZ, Garcia SB, Zucoloto S: The relationship between p63 and p53 expression in normal and neoplastic breast tissue Arch Pathol Lab Med **127**: 336-340, 2003
- 34 Rungsipipat A, Tateyama S, Yamaguchi R, Uchida K, Miyoshi, Hayashi T: Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors J Vet Med Sci **61**:2732, 1999
- 35 Sagartz JE, Bodley WL, Gamblin RM, Couto CG, Tierney LA, Capen CC: P53 tumor suppressor protein overexpression in osteogenic tumors of dogs Vet Pathol **33**:213-221, 1995
- 36 SAS: User's guide: statistics version 6.1. Cary: Sas institute, 1988
- 37 Tateyama S, Uchida K, Hidaka T, Hirao M, Yamaguchi R: Expression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in myoepithelial cells in canine mammary gland tumors Vet Pathol **38**: 703-709, 2001
- 38 Voz, M. L, Van de Ven, W.J, Kas K. First insight into the molecular basis of pleomorphic adenomas of the salivary glands Adv Dental Res **14**:81-3, 2000
- 39 Yamamoto Y, Kishimoto Y, Arvind K, Smith A, Vuitch F, Albores-Saavedra J, Gazdar F: Mutations associated with carcinomas arising of pleomorphic adenomas of the salivary glands. Human Pathol **27**:782-786, 1996
- 40 Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Döstsh V, Andrews NC, Caput D, Mckeon F: p
- P63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating death-inducing, and dominant – negative activities Mol Cell **2**: 305-316, 1998
- 41 Yaziji H, Grow AM, Sneige, N: Detection of stromal invasion in breast cancer: the myoepithelial markers Adv Anat Pathol **7**:100-109, 2000

Tabela1. Caracterização da imunoreatividade para p63 nos diferentes tipos celulares presentes nos diferentes tumores e glândula mamária normal de cadelas.

| Tipo tumoral | Tumores | | Tipo celular | | | | | |
|--------------------------|---------|-----|--------------|-----|-----|-----|----|----|
| | n | p63 | MER | MEP | MEF | MEE | CB | CE |
| Mama normal | 4 | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | ++ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | +++ | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tumor misto benigno | 20 | - | 0 | 0 | 3 | 4 | 20 | 16 |
| | | + | 0 | 0 | 8 | 5 | 0 | 3 |
| | | ++ | 4 | 4 | 9 | 11 | 0 | 1 |
| | | +++ | 16 | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Carcinoma em tumor misto | 35 | - | 0 | 0 | 10 | 15 | 0 | 26 |
| | | + | 17 | 17 | 22 | 17 | 0 | 7 |
| | | ++ | 15 | 15 | 3 | 13 | 0 | 2‡ |
| | | +++ | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Carcinoma tubulopapilar | 11 | - | 5 | 5 | 7 | 0 | - | 9 |
| | | + | 3 | 3 | 3 | 0 | - | 0 |
| | | ++ | 2 | 2 | 0 | 0 | - | 0 |
| | | +++ | 1 | 1 | 1 | 0 | - | 2 |

MER=células mioepiteliais em repouso; MEP=células mioepiteliais em proliferação; MEF=células mioepiteliais fusiforme; MEE=células mioepiteliais estreladas; CB=condroblastos; CE=células epiteliais luminais.

- = nenhuma célula marcada; + = menos do que 5% das células marcadas; ++=5-50% células marcadas; +++= mais do que 50% das células marcadas

‡ = Tumores com células epiteliais com diferenciação escamosa

Tabela 2. Expressão imuno-histoquímica de p63 e ASMA nas células mioepiteliais de tumores mamários de cadelas.

| Tipo tumoral | Tumores n | ASMA* | p63* | | | |
|--------------------------|--------------|-------|------|---|----|-----|
| | | | - | + | ++ | +++ |
| Tumor misto benigno | 5/20 | - | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | + | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | ++ | 1 | 0 | 2 | 1 |
| | | +++ | 0 | 1 | 0 | 1 |
| Carcinoma em tumor misto | 10/35 | - | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | + | 0 | 2 | 0 | 0 |
| | | ++ | 0 | 1 | 5 | 0 |
| | | +++ | 0 | 2 | 0 | 0 |
| Carcinoma tubulopapilar | 7/11 | - | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | | + | 0 | 2 | 0 | 0 |
| | | ++ | 1 | 1 | 1 | 0 |
| | | +++ | 0 | 0 | 0 | 1 |

* - = nenhuma célula marcada; + = menos do que 5% das células marcadas; ++ = 5-50% marcadas marcadas; +++ = mais do que 50% das células marcadas.

Tabela 3. Expressão imuno-histoquímica de p53 e p63 em tumores mamários de cadelas.

| Tipo Tumoral | Tumores n | p53* | p63 * | | | |
|--------------------------|--------------|------|-------|----|----|-----|
| | | | - | + | ++ | +++ |
| Tumor misto benigno | 20 | - | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | | + | 0 | 0 | 3 | 11 |
| | | ++ | 0 | 0 | 2 | 2 |
| | | +++ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Carcinoma em tumor misto | 35 | - | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | | + | 0 | 12 | 9 | 3 |
| | | ++ | 0 | 5 | 4 | 1 |
| | | +++ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Carcinoma tubulopapilar | 11 | - | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | | + | 3 | 0 | 1 | 2 |
| | | ++ | 2 | 2 | 0 | 2 |
| | | +++ | 0 | 0 | 0 | 0 |

* - = nenhuma célula marcada; + = menos do que 5% das células marcadas; ++ = 5-50% células positivas; +++ = mais do que 50% das células positivas.

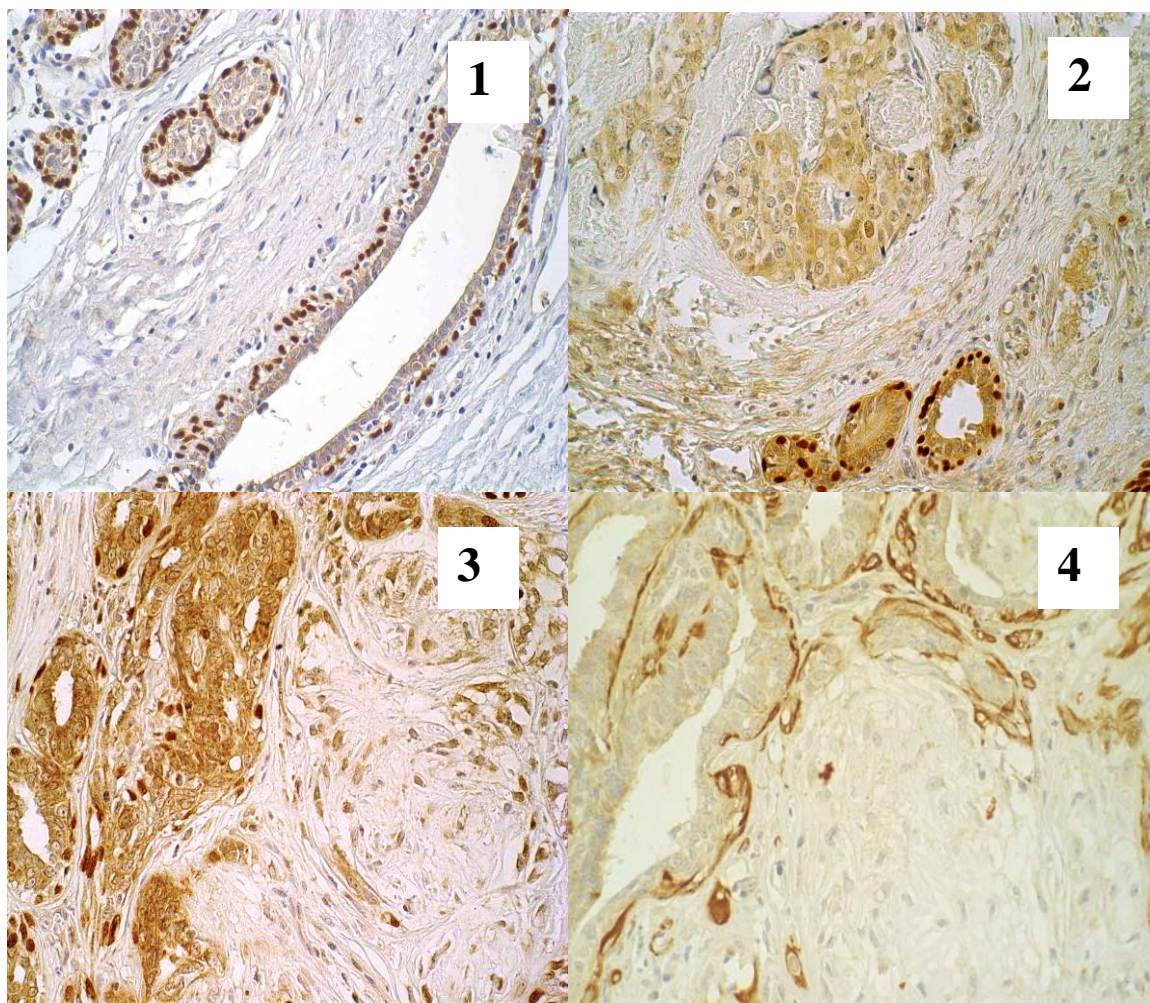


Fig. 1. Glândula mamária normal; cadela. Camada de células mioepiteliais em repouso imunoreativas para p63, grau (+++) e células luminais não imunoreativas. Método do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase. Contra coloração com hematoxilina de Mayer's

Fig.2. Carcinoma em tumor misto; cadela. Foco carcinomatoso com ausência de imunoreatividade para p63. Observar a reatividade do tecido mamário normal adjacente, usado como controle interno. Contra coloração com hematoxilina de Mayer's.

Fig.3. Carcinoma em tumor misto; cadela. Células mioepiteliais imunoreativas para p63. Observar diminuição da reatividade da camada de células periacinar, formando uma camada descontínua, escore (+). Contra coloração com hematoxilina de Mayer's.

Fig.4. Carcinoma em tumor misto; cadela. Imunoreatividade para ASMA na mesma área da figura 3. Citoplasma das células mioepiteliais imunoreativas formando camada contínua, escore, (+++).

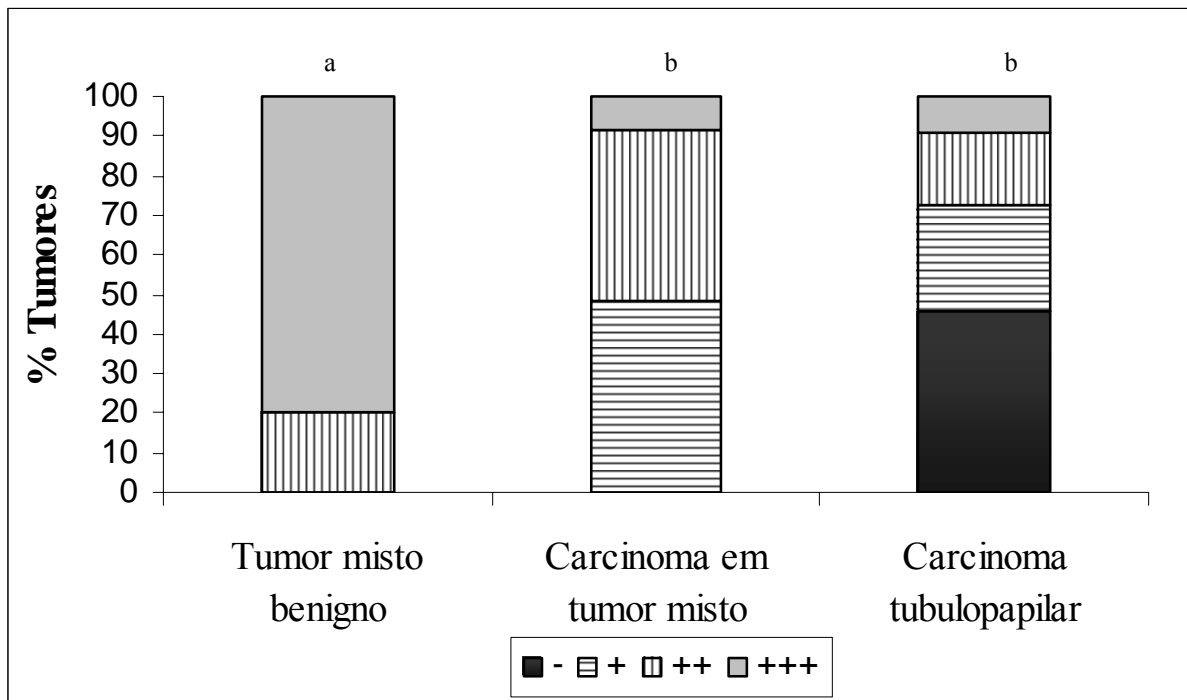


Fig. 5. Reatividade para p63 nos diferentes tipos tumorais. Letras diferentes indicam diferença estatística. ($p < 0,001$).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, A. The myoepithelium in human breast carcinoma. **Journal Pathology**, v.35, p.113-129, 1974.

ALLEN, A.C. So-called mixed tumors of the mammary gland of dog and man. **Archives of Pathology**, v.29, p.589-624, 1940.

ANDERSEN, T.I. et al. Prognostic significance of p53 alterations in breast carcinoma. **British Journal of Cancer**, 68, p.540-548, 1993.

ARAI, K. et al. Expression of class II tubulin by proliferative myoepithelial cells in canine mammary mixed tumors. **Veterinary Pathology**, v.40, p.670-676, 2003.

BARBARESCHI, M.B. et al. P63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast. **The American Journal of Surgical Pathology**, v.25, n.8, p.1054-1060, 2001.

BATSAKIS, J.G. et al. The pathology of head and neck tumors: the myoepithelial cell and its participation in salivary gland neoplasia, part 17. **Head & Neck Surgery**, v.5, p.222-233, 1983.

BERNS, E.M. et al. Complete sequencing of p53 predicts poor response to systemic therapy of advanced breast cancer. **Cancer Research**, v.60, p.2155-2162, 2000.

BILAL, H. et al. P63 is expressed in basal and myoepithelial cells of the normal and tumor salivary gland tissues. **Journal of Histochemistry and Citochemistry**, v.51, p.133-139, 2003.

BONDENSON, L & LINDLOM, K. Prediction of invasiveness by aspiration cytology applied to nonpalpable mammography abnormalities? **Diagnostic Cytopatology**, v. 17, p.315-320, 1997.

CARON, F.C & SOUSSI, T. P53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. **Genes Chromosomes Cancer**, v.4, p.1-15, 1992.

CASSALI, G.D. Aspectos morfológicos, imuno-histoquímicos e citométricos de tumores mamários da cadela - aspectos comparativos com neoplasias da mama humana, 2000. 73p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Curso de Pós Graduação em Patologia, Universidade Federal de Minas Gerais.

CELLI, J. et al. Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. **Cell**, v.99, p.143-153, 1999.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **The breast**. In: .Robbins-Pathologic basis of disease. 5ed. Philadelphia: Saunder Company, 1999. p.1089-1111.

CHU et al. Genomic organization of the canine p53 gene and its mutational status in canine mammary neoplasia. **Breast cancer research and treatment**, v, 50, p.11-25, 1998.

CHU, P.G & WEISS, L. M. Cytoqueratin 14 immunoreativity distinguishes oncocytic from the renal mimics: an immunohistochemical study of 36 cases. **Histopathology**, v.39, p.455-462, 2001.

CHU, P.G & WEISS, L.M. Keratin expression in human tissues and neoplasm. **Histopathology**, 49, p.403-439, 2002.

DABBS, D.J & GOWN, A.M. Distribution of calponin and smooth muscle myosin heavy chain in fine-needle aspiration biopsies of the breast. **Diagnostic Citopathology**, v.20, p.203-207, 1999.

DARDICK, I. et al. Histogenesis of salivary gland pleomorphic adenoma (mixed tumor) with an evaluation of the role of the myoepithelial cell. **Human Pathology**, v.13, n.1, p.62-75, 1982.

DEGUSHI, H. et al. C-myc, ras p21 and p53 expression in pleomorphic adenoma and its malignant form of the human salivary glands. **Acta Pathologica Japonica**, v.43, n.7-8, p.413-22, 1993.

DESTEXHE, E. et al. Immunohistochemical identification of myoepithelial, epithelial, and connective tissue cells in canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.30, p.146-154, 1993.

DI COMO, C.J. et al. P63 expression profiles in human normal and tumor tissues. **Clinical Cancer Research**, v.8, p.494-501, 2002.

DONEHOWER, L.A. et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. **Nature**, v.356, p.215-221, 1992.

ELLIS, G.L & AUCLAIR, P.L: **Tumors of the salivary glands**: In: Atlas of Tumor Pathology, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 1996. 3rd series, 17, p.39.

EL-DEIRY, W.S. et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppressor. **Cell**, v.75, p.817-825, 1993.

ENEROTH, C.M & ZETTERBERG, A. Malignancy in pleomorphic adenoma. A clinical and microspectrophotometric study. **Acta Otolaryngology**, v.77, n.6, p.426-32, 1974.

EKI, A.; FINGER, I.I. Mutational spectrum of p53 mutations in primary breast and ovarian tumors. **Critical Reviews in Oncology / Hematology**, v.52, p.103-116, 2004.

FLORES, E.R. et al. Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: Evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. **Cancer Cell**, v.7, p.363-373, 2005.

FOMENKOV, A. et al. P63 Mutations lead to aberrant splicing of keratinocyte growth factor receptor in the Hay-Wells Syndrome. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.26, p.23906-23914, 2003.

FOOTE, F.W.J & FRAZELL, E.L. Tumors of the major salivary glands. **Cancer**, v.6, n.6, p.1065-133, 1953.

FOSCHINI, M.P. et al. Differential expression of myoepithelial markers in salivary, sweet and mammary glands. **International Journal of Surgical Pathology**, v.8, p.29-37, 2000.

GAMA, A. et al. P63: A novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues. **Veterinary Pathology**, v.40, p.412-240, 2003.

GAIDDON, C. et al. A subset of tumor – derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. **Molecular of Cell Biology**, v.21, p.1874-1887, 2001.

GÄRTNER F. et al. DNA measurement and immunohistochemical characterization of epithelial and mesenchymal cells in canine mixed mammary tumors: putative evidence for a common histogenesis. **Veterinary Pathology**, v. 158, p.39-47, 1999.

GEISLER, S. et al. Influence of P53 gene alterations and c-erB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. **Cancer Research**, v.61, p.2505-2512, 2001.

GENELHU M.C.L. et al: Immunohistochemical expression of p63 in pleomorphic adenomas and carcinomas ex-pleomorphic adenomas of salivary glands. **Oral Oncology**, v.42, n.2, p.154-160, 2006.

GERALDES, M.; GÄRTNER, F.; SCHMITT, F. Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumors. **Veterinary Record**, v.146, p.403- 406, 2000.

GOMM, J.J, et al. A paracrine role for myoepithelial cell-derived FGF2 in the normal human breast. **Experimental Cell Research**, v.243, p.165-173, 1997.

GORDON, L.A. et al. Breast cell invasive potential relates to the myoepithelial phenotype. **International Journal of Cancer**, v.106, p.8-16, 2003.

GRAEBER, T.G. et al. Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. **Molecular of Cell Biology**, v.14, p.6264-6277, 1994.

GRAHAM, J.C.; O'KEEFE.; D.A.; GELBERG, H.B. Immunohistoquimical assay for detecting estrogen receptors in canine mammary tumours. **American Journal of Veterinary Research**, v.60, p.627-630, 1999.

GREENBLATT, M.S. et al. Mutations in the p53 tumor suppressor gene. Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. **Cancer Research**, v.54, p.4855-4878, 1994.

GUDJONSON, L. et al. Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. **Journal of Cell Science**, v.115, p.39-50, 2002.

GUTERSON, B.A. et al. Identification of myoepithelial cells in human and rat breasts by anti-common acute lymphoblastic-leukemia antigen antibody A12. **Journal National of the Cancer Institute**, v.77, p.342-349, 1986.

HAGIWARA, K. et al. Mutational analysis of the p63/p73L/p51/p40/CUSP/KET gene in human cancer cell lines using intronic primers. **Cancer Research**, v.59, p.4165-4169, 1999.

HAUPT, Y. et al. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. **Nature**, v. 387, p.296-299, 1997.

HELLMÉN, R. et al. Prognostic factors in canine mammary tumors: A multivariate study of 202 consecutives cases. **Veterinary Pathology**, v.30, p.20-27, 1993.

HODA, S.A. et al. Microinvasive carcinoma of the breast: can it be diagnosed reliably and it's clinically significant? **Histopathology**, v.35, p.468-472, 1999.

HSIEH, J.K. et al. Rb regulates the stability and apoptotic function of p53 via mdm2. **Molecular Cell**, v.2, p.181-193, 1999.

HUGGINS, C & MOULDER, P.V. Studies on the mammary tumours of dog.I. Lactation and influence of ovariectomy and suprarenalectomy thereon. *Journal of Experimental Medicine*, v.80, p.441-454, 1944.

ISOLA, J. et al. Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients. **Journal National of the Cancer Institute**, v.84, p.1109-1114, 1992.

KANG, J.H. et al. The timing and characterization of p53 mutations in progression from atypical ductal hyperplasia to invasive lesions in the breast cancer. **Journal of Molecular Medicine**, v.79, p.648-655, 2001.

KALOF, A.N. et al. Immunostaining of myoepithelial cells in breast lesions: a comparison of CD10 and smooth muscle myosin heavy chain. **Journal of Clinical Pathology**, v.57, p.625-29, 2004.

KEOVHAVONG, P. et al. Analysis of p53 mutation in cells taken from paraffin-embedded tissue sections of ductal carcinoma in situ and atypical ductal hyperplasia of the breast. **Cancer Letters**, v.212, p.121-130, 2004.

KOKER, M.M & KLEER, C.G. P63 expression in breast cancer. **American Journal of Surgical Pathology**, v.28, p.1506-1512, 2004.

KOSTER, V.J. et al. P63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. **Genes Development**, v.18, p.126-131, 2004.

KRAGGERUD, S.M. et al. A comparison of different modes for detection of p53 accumulation. A study of bladder cancer. **Pathology Research Practice**, v.193, p.471-478, 1997.

KRAEGEL, S.A.; PAZZI, K.A.; MADEWELL, B.R. Sequence analysis of canine p53 in the region of exons 3-8. **Cancer Letters**, v.92, p.181-186, 1995.

LAGADIC, M. et al. Tumeurs mammaires de la chienne: critères du pronostic histologique et intérêt d'un grading. **Recueil de Médecine Veterinaire**, v.166, p.1035-1042, 1990.

LAKHANI, S.R & O'HARE, M.J. The mammary myoepithelial cell-cinderela or ugly sister? **Breast Cancer Research**, v.3:1-4, 2000.

LANE, D.P. P53, guardian of the genome. **Nature**, v.358, p.15-16, 1992.

LAS MULAS, J.; MILLÁN, Y.; DIOS, R. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. **Veterinary Pathology**, v.42, p.200-212, 2005.

LEE, C.H. et al. Mutation and overexpression of p53 as prognostic factor in canine mammary tumors. **Journal of Veterinary Science**, v.5, n.1, p.63-69, 2004.

LEONETTI, J.P. et al. Recurrent pleomorphic adenoma of the parotid gland. **Otolaryngology Head and Neck Surgical**, v.133, n.3, p.319-22, 2005.

LEVINE, A.J. P53 the cellular gatekeeper of growth and division. **Cell**. v.88, p.323-331, 1997.

LEWIS, J.E. et al. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: pathologic analysis of 73 cases. **Human Pathology**, v.32, n.6, p.596-604, 2001.

LIEFER, K.M. et al. Down-regulation of p63 is required for epidermal UV-B-induced apoptosis. **Cancer Research**, v.60, p.4016-4020, 2000.

LOS MONTEROS, A.E. et al. Immunolocalization of smooth muscle-specific protein calponin in complex and mixed tumors of the mammary gland of the dog: assessment of the morphogenetic role of the myoepithelium. **Veterinary Pathology**, v. 39, p.247-256, 2002.

LOS MONTEROS, A.E. et al. Expression of Maspin in mammary gland tumours of the dog. **Veterinary Pathology**, v. 42, p. 250-257, 2005.

LO MUZIO, L. et al. P63 overexpression associates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. **Human Pathology**, v.36, p.187-194, 2005.

LU, X. P53: a heavily dictated dictator of life and death. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.15, p.27-33, 2005.

MAN, Y.G. et al. Cell clusters overlying focally disrupted mammary myoepithelial cell layers and adjacent cells within the same duct display different immunohistochemical and genetic features: implications for tumor progression and invasion. **Breast Cancer Research**, v.5, p.231-241, 2003.

MAN, Y.G & SANG, Q.X.A. The significance of focal myoepithelial cell layer disruptions in human breast tumor invasion: a paradigm shift from the “protease-centered” hypothesis. **Experimental Cell Research**, v.301, p.103-118, 2004.

MILNER, J & MEDCALF, E. Cotranslation of activated mutant p53 with type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. **Cell**, v.65, p.765-774, 1991.

MILLER, W.R. Oestrogens and breast cancer:biological considerations. **Brazilian Medical Bulletin**, v.47, p.470-483, 1991,

MILLS, A.A. et al. P63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. **Nature**, v.398, n.22, p.708-713, 1999.

MISDORP, W. et al. Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat. In: **World Health Organization International Histological Classification tumors of Domestic animals**, v.2, p.23, 1999.

MISDORP, W. Malignant Mammary tumors in the dog and cat. In: MOUTON, D.J. **Tumors in Domestic Animals**.4.ed. Iowa State press, 2002, p.589-606.

MOLL, U.M.; ERSTER, S.; ZAIKA, A. P53, p63 and p73-solos, alliances and feuds among family members. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1552, p.47-59, 2001.

MOMBURG, F. et al. Immunohistochemical study of the expression of a M, 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. **Cancer Research**, v.47, p.2883-2891, 1987.

MOULTON, J.E. Tumors of the mammary gland. In: **Mammary tumors in domestic animals**, e 3 ed. Universidade da California 1990, p.518-522,

MOULTON, J.E.; ROSENBLATT, L.S.; GOLDMAN, M. Mammary tumors in a colony of beagles. **Veterinary Pathology**, v.23, p.741-749, 1986.

MUTO, T. et al. P53 gene mutations occurring in spontaneous benign and malignant mammary tumors of the dog. **Veterinary Pathology**, v.37, p.248-253, 2000.

NYLANDER, K. et al. Differential expression of p63 isoforms in normal tissues and neoplastic cells. **Journal of Pathology**, v.198, p.417-427, 2002.

OSTROWSKI, J.L. et al. expression in human breast cancer related to survival and prognostic factors: an immunohistochemical study. **Journal of Pathology**, v,164, p.75-81, 1991.

PARK, H.R. et al. Frequent alteration of p63 expression in human primary bladder carcinomas. **Cancer Research**, v.60, p.3370-3374, 2000.

PULLEY, L.T. Ultrastructural and histochemical demonstration of myoepithelium in mixed tumors of the canine mammary gland. **American Journal of Veterinary Research**, v.34, p.1513-1522, 1973.

RATOVITSKI, E. A. et al. P53 associates with and targets Δ Np63 into a protein degradation pathway. **Proceedings of the National academy of sciences of the United States of America**, v.98, p.1817-1722, 2001.

REIS FILHO, J.S. et al. Maspin expression in myoepithelial tumors of the breast. **Pathology Research practice**, v.197, p.817-821, 2001.

REIS-FILHO, J.S. et al. P63 staining of myoepithelial cells in breast fine needle aspirates: a study of its role in differentiating in situ from invasive ductal carcinomas of the breast. **Journal of Clinical Pathology**, n.55, p.936-939, 2002.

REIS-FILHO, J. S. et al. Novel and Classic Myoepithelial/Stem Cell Markers in Metaplastic Carcinomas of the Breast. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v.11, n.1, p.1-8, 2003,ba.

RIBEIRO-SILVA, A.; RAMALHO, L.Z.; GARCIA, S.B. The relationship between p63 and p53 expression in normal and neoplastic breast tissue. **Archive of Pathology Laboratory Medical**, v.127, p.336-340, 2003, b.

SAKAMURO, D. et al. The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. **Oncogene**, v.15, p. 887-898, 1997.

SERBER, Z. et al. C -terminal domain controls the activity of p63 by an intermolecular mechanism. **Molecular Cell Biology**, v.22, n.24, p.8601-8611, 2002.

SCHIMITT, F. C. et al. P53 in breast carcinomas: association between presence of mutation and immunohistochemical expression using semiquantitative approach. **Pathology research and practice**, 194, p.815-819, 1998.

SMITH, G. H & MEDINA, D.A. A morphologically distinct candidate for an epithelial stem cell in the mouse mammary gland. **Journal of Cell Science**, v.89, p. 173-183, 1988.

SOONG, R. et al. Concordance between p53 protein expressions and gene mutations in breast carcinoma. **Human Pathology**, v.27, p.1050-1055, 1996.

STERNLICHT, M.D. et al. The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor. **Clinical Cancer Research**, v.3, p.1949-1958, 1997.

STINGEL, J. et al. Epithelial progenitors in the normal human mammary gland. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.10, n.1, 2005.

STRANO, S. et al. Physical interaction with human tumor- derived p53 mutants inhibits p63 activities. **Journal of Biology Chemical**, v.277, p.18817-18826, 2002.

TATEYAMA, S & COTCHIN, E. Eletron microscopic observations on canine mixed mammary tumors, with special reference for cytoplasmic filamentous components. **American Journal of Veterinary Research**, v.39, p.1494-1501, 1978.

TATEYAMA, S. et al. Expression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in myoepithelial cells in canine mammary gland tumors. **Veterinary Pathology**, v.38, p.703-709, 2001.

TORTOLEDO, M.E.; LUNA, M.A.; BATSAKIS, J.G. Carcinomas ex pleomorphic adenoma and malignant mixed tumors. **Archive of Otolaryngology**, v.110, p.172-6, 1984.

VOZ, M. L. et al. First insight into the molecular basis of pleomorphic adenomas of the salivary glands. **Advances Dental Research**, v.14, p.81-3, 2000.

WERLING, R.W. et al. Immunohistochemical distribution of invasive from noninvasive breast lesions. A comparative study of p63 versus calponin and smooth muscle myosin heavy chain. **The American Journal of Surgical Pathology**, v.27, n.1, p.82-90, 2003

YANG, A. et al. P63, a p53 Homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating death-inducing, and dominant – negative activities. **Molecular Cell**, v.2, p.305-316, 1998.

YANG, A. et al. P63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. **Nature**, v.398, v.22, p.714-718, 1999.

YAZIJI, H.; GROW, A.M.; SNEIGE, N. Detection of stromal invasion in breast cancer: the myoepithelial markers. **Advanced in Anatomy Pathological**, v.7, p.100-109, 2000.

YAMAMOTO, Y. et al. Mutations associated with carcinomas arising of pleomorfic adenomas pleomorfics of the salivary glands. **Human Pathology**, v.27, n.8, p.782-786, 1996.

YAMAMOTO, T. et al. P73 is highly expressed in myoepithelial cells in carcinomas with metaplasia. *International Journal of Oncology*, v.19, p.271-276, 2001.

ZHANG, M. et al. Maspin: the mouse homolog of a human tumor suppressor gene inhibits mammary tumor invasion and mobility. ***Molecular Medicine***, v.3, p.49-59, 1997.

5. GLOSSÁRIO

ASMA - Alfa-actina de músculo liso de cadeia pesada

BAX – Proteína membro da família Bcl2 , presente na mitocôndria, membrana nuclear, retículo endoplasmático rugoso. Participa do processo de apoptose

CD10 - Antígeno comum leucêmico de fase aguda , antígeno associado a leucemia

CM1 - Anticorpo policlonal anti p53 humano

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DNTPs - Dinucleotídeos

ESA- Antígeno epiteliaiil específico

ERB2 - Receptor para o fator de crescimento epidermal

MUC-1 - Proteína glicosilada componente da membrana plasmática apical

mRNA- RNA (ácido ribonucléico) mensageiro

Mdm2 - *proteína mouse double minute 2*- possui capacidade de degradar e limitar a atividade de p53

S-100 - Proteína expressa principalmente nas células mioepiteliais – participa do ciclo celular

P21^{Waf1} - Proteína codificada pelo gene *WAF 1* – inibe a transição da fase G1 para G2 do ciclo celular

WT-1 - Fator de transcrição similar a p53, também denominado Wilms' tumor 1