

AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO GENE P53 NAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS*

*(IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF P53 GENE
IN THE CANINE MAMMARY NEOPLASIAS)*

*(EVALUACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DEL GEN P53 EN
LAS NEOPLASIAS MAMARIAS CANINAS)*

**D.A.P.C. ZUCCARI¹, A.C.B. TERZIAN², R.S. PEREIRA², M. V. PAVAM², C. M. RUIZ²,
F. A. R. SUEIRO¹, J. C. A. ANDRADE², J. A. CORDEIRO¹**

SUMÁRIO

O estudo dos tumores mamários em cadelas revela-se como um excelente modelo para a investigação clínico-patológica, diagnóstica e prognóstica de neoplasias mamárias que acometem a espécie humana. A Síndrome de Li Fraumeni é descrita como uma condição hereditária responsável pela mutação do gene p53 levando indivíduos jovens ao desenvolvimento do câncer. A expressão do gene supressor de tumor p53 em cortes histológicos tem demonstrado valor prognóstico para tumores mamários caninos e se relaciona com malignidade e baixa taxa de sobrevivência. O presente trabalho pesquisou a expressão celular do gene p53 na determinação do prognóstico para o paciente com câncer e sua associação com fatores prognósticos relacionados à evolução clínica do paciente. Foram analisados 73 tumores e a expressão do anticorpo policlonal P53 foi classificada pelo sistema de cruces, tendo sido considerada alta (acima de 50% das células marcadas) em tumores malignos. Pela Regressão Logística Nominal não houve correlação estatística de sua expressão com morte por neoplasia, pequeno tempo de sobrevida e tempo livre da doença. Entretanto, sua expressão mostrou associação com a idade jovem das cadelas acometidas, evidenciando o seu acúmulo na célula e deixando a fêmea susceptível ao crescimento neoplásico, numa idade onde existiria, em tese, a proteção por este gene. Esta síndrome foi descrita na literatura para a espécie humana e estudos moleculares são necessários para confirmação da ocorrência em cadelas.

PALAVRAS-CHAVES: P53. Cadelas. Neoplasia mamária. Imuno-histoquímica. Síndrome Li Fraumeni.

SUMMARY

Canine mammary tumors are challenging for clinicians and pathologists because of complex histologic classification, low specificity of cytologic diagnosis, and unpredictable biological behavior. The Li Fraumeni syndrome is described as a hereditary condition that shows cancer development in young people as a loss of protection caused by a p53 mutation. In histologic specimens, expression of tumor suppressor gene p53 has been shown to have prognostic value for canine mammary tumors and to correlate with malignancy and low survival rates. The objective of this study was to study the immunoexpression of p53 protein in canine mammary tumors and to determine its relationship to clinical and pathologic variables and patient outcome. Spontaneous mammary tumors from 73 female dogs were surgically excised. Histologic specimens were prepared routinely. Immunostaining was performed with the polyclonal antibody against P53; proliferation

* Projeto financiado pela Fapesp nº. 02/05336-2.

¹ Professor Doutor - FAMERP.

² Médicos Veterinários.

³ Professor Doutor - UNIRP.

index was scored from negative to +++. Multivariate logistic regression analysis was used to determine correlations between immunohistochemical results, tumor histology, clinical variables, and patient outcome. P53 indice were significantly lower for nonmalignant tumors than for malignant tumors. High index values of P53 were not positively correlated with metastasis, death from neoplasia, low disease-free survival rates, and low overall survival. However its accumulation was associated with life time, since young dogs that developed mammary neoplasia had the biggest expression of this marker, showing the results of its mutation, leaving the female susceptible to the neoplastic growth. This syndrome is described in literature for humans as Li-Fraumeni Syndrome and molecular studies are necessary for confirmation of this occurrence in female dogs.

KEY-WORDS: P53. Canine. Mammary tumors. Immunohistochemical. Li-Fraumeni syndrome.

RESUMEN

El estudio de los tumores mamarios en perras es un excelente modelo para la investigación clinicopatológica, diagnóstica y pronóstica de neoplasias mamarias que afectan a la especie humana. El síndrome de Li Fraumeni es descrito como una condición hereditaria responsable por la mutación del gen p53, que lleva al desarrollo de cáncer en individuos jóvenes. La expresión del gen supresor del tumor p53 en cortes histológicos ha demostrado valor pronóstico en casos de tumores mamarios caninos y se relaciona con malignidad y baja tasa de supervivencia. En este trabajo se investigó la expresión celular del gen p53 en la determinación del pronóstico para el paciente con cáncer y su asociación con factores pronósticos relacionados a la evolución clínica. Fueron analizados 73 tumores y la expresión del anticuerpo policlonal P53 fue clasificada por el sistema de cruces, habiendo sido considerada alta (más de 50% de las células marcadas) en tumores malignos. En la Regresión Logística Nominal no hubo correlación estadística de su expresión con muerte por neoplasia, pequeño tiempo de sobrevida y tiempo libre de la enfermedad. Sin embargo, su expresión mostró asociación con la edad joven de las perras afectadas, evidenciando su acumulación en la célula, dejando la hembra susceptible al crecimiento neoplásico en una edad donde existiría, en teoría, la protección por este gen. Este síndrome fue descrito en la literatura para la especie humana y son necesarios estudios moleculares para confirmar su ocurrencia en perras.

PALABRAS-CLAVE: P53, perras, neoplasia mamaria, inmunohistoquímica, Síndrome de Li Fraumeni.

INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias são os tumores mais comuns na fêmea canina e responsáveis por aproximadamente 52% de todas as neoplasias nesta população animal (MacEWEN, 1990, SORENMO, 1998). A espécie canina, de fato, é a que apresenta espontaneamente, a maior incidência de neoplasias mamárias dentre todos os mamíferos e, quando comparada à espécie humana, apresenta três vezes mais tumores mamários que a mulher (BRODEY et al., 1983). Considerando-se ainda que a cadela possui cinco pares de mamas, a possibilidade de ocorrência de neoplasias é maior. O intervalo livre da doença também é menor, pois, após a retirada cirúrgica do tumor, a recidiva e/ou metástase pode ocorrer em até um ano, tempo verdadeiramente menor se comparado ao intervalo de cinco anos estabelecido na mulher.

Os tumores mamários em cães servem como modelos apropriados, e válidos, ao estudo da biologia do câncer (SCHNEIDER et al., 1970, MOTTOLESE et al., 1994), assim como para testes de agentes terapêuticos, já que animais de estimação têm tumores com apresentação histopatológica e comportamento biológico similares àqueles que acometem os seres humanos (MacEWEN, 1990, PELETEIRO, 1994). Além disso, os tumores de mama

em cadelas constituem um desafio para clínicos e, principalmente, para patologistas, pois a nomenclatura e classificação desses tumores têm se revelado muito difíceis e controversas impossibilitando, há muito tempo, estudos comparativos entre os resultados de investigação reportados por diferentes pesquisadores (BRODEY et al., 1983, WHO by AFIP).

Um importante desafio à pesquisa do câncer é entender como alterações genéticas associadas à oncogênese contribuem para as alterações celulares e biológicas que podem ser reconhecidas como malignas. Genes intimamente envolvidos na regulação da proliferação celular são conhecidos por se alterarem em todos os casos, incluindo tumores embrionários. Esses genes tipicamente pertencem a uma família de genes relacionados ao câncer, conhecidos como genes supressores de tumor (ISRAEL et al., 1999).

Os genes supressores de tumor, também chamados anti-oncogenes, estão envolvidos na regulação do crescimento celular, mas podem se tornar causadores de cânceres quando danificados. Esses genes codificam a biossíntese de proteínas que estão envolvidas na inibição da proliferação celular e que são cruciais para o desenvolvimento e diferenciação celulares (LEWIN, 1997).

Inicialmente acreditava-se que o gene p53 codificava um antígeno tumoral endógeno e inclusive,

acreditava-se ser um oncogene. Porém, sabe-se que o p53 é um gene supressor de tumor. O gene p53 está localizado no cromossomo humano na região 17p13.1 (LEVINE et al., 1991) e codifica uma fosfoproteína nuclear de 53kD com atividade supressora de tumor. O tipo selvagem da proteína P53, o qual é considerado um regulador de transcrição, presente no núcleo das células de todos os mamíferos, parece estar envolvido na regulação da proliferação celular e apoptose (SCHMITT et al., 1998).

Se um indivíduo herda só uma cópia funcional do gene p53 de seus pais, tem maior predisposição ao câncer e usualmente desenvolve muitos tumores independentes em diferentes tecidos e órgãos na vida adulta (por volta dos 50 anos). Essa condição é rara sendo conhecida como Síndrome de Li Fraumeni. A Síndrome de Li Fraumeni (LFS) tem sido a terminologia utilizada para designar esta herança familiar dominante caracterizada por uma grande incidência de neoplasias que ocorrem em crianças e adultos jovens. A identificação das mutações no p53 em famílias propensas ao câncer tem aumentado o estudo médico, psicológico e ético e o aconselhamento de pacientes com esta síndrome (CHOMPRET, 2002). As mutações do gene p53, assim como a perda de seus alelos, são defeitos genéticos encontrados em 50% dos cânceres humanos que ocorrem nos pulmões, mama, cólon, esôfago, fígado, bexiga, ovários e cérebro (COTRAN et al., 1994).

Por agir de tal forma a proteína P53 é chamada de “Guardiã do Genoma”. Em condições normais possui uma vida muito curta, 15 a 45 minutos em células de ratos; 2 horas em melanócitos humanos e 4 a 5 horas em queratinócitos humanos, sendo degradada imediatamente após ter cumprido a sua função. Uma mutação do gene p53 causa a perda dessa proteção celular, desestabiliza o genoma e permite a produção de uma proteína P53 defeituosa, não funcionante, que se acumula na célula sendo eliminada mais vagarosamente, o que permite a sua detecção pela técnica da imuno-histoquímica (DELFINI FILHO, 2001). Já ao contrário dessa proteína está abaixo do limiar de detecção por métodos de imuno-histoquímica, a expressão exacerbada tem sido observada em grande número de tumores, incluindo carcinomas mamários e está associada à agressividade tumoral (SCHMITT et al., 1998).

Considera-se que o gene p53 seja a chave reguladora de grande parte dos processos celulares inclusive do ciclo celular, reparo do DNA, estabilização do genoma, morte celular programada, diferenciação, senescência e angiogênese. Além disso, o p53 é o maior componente da resposta celular ao dano do DNA nas células dos mamíferos (MAY e MAY, 1999, MONTENARH, 1992, BARNES et al., 1993).

Presente nas células normais na forma “wild” ou não-mutante, tem a função de bloquear a divisão celular através de uma proteína por ele produzida, atuando como mediador da apoptose quando da ocorrência de alterações no genoma (MONTENARH, 1992). Quando esse gene

torna-se mutante, ocorre perda do controle do ciclo celular (LOWE et al., 1994) e, como consequência, podem sobreviver células com alto grau de mutações (VAN KALKEN et al., 1991). Entretanto, os tumores com formas mutantes do gene p53 expressam altos níveis da proteína, de maior vida-média e, portanto passíveis de detecção imuno-histoquímica (LANE, 1992, BARNES et al., 1993). Um estudo realizado por Bosari e colaboradores (1993) sugeriram que a imunoreatividade expressada por esse gene pode preceder o desenvolvimento de neoplasias com características malignas e invasivas (BERNSTEIN et al., 1999). A proteína P53 controla a divisão celular de duas formas: (i) se a agressão ao DNA ocorre precocemente, no início do ciclo celular, antes que o DNA inicie a sua replicação, a proteína P53 desencadeia uma série de eventos que bloqueia a progressão da divisão celular na fase G1, permitindo a reparação do DNA e a volta ao funcionamento normal do ciclo, sem causar dano à célula e; (ii) se a agressão ao DNA ocorre em fase mais tardia, na qual a proteína P53 não consiga mais bloquear a replicação celular, essa mesma proteína ativa genes que causam a apoptose, ou seja, a morte celular programada (COTRAN et al., 1994, MERLO et al., 1995).

Sob a ação de agentes mutagênicos, principalmente a radiação UV e carcinógenos, assim como na hipóxia celular, a P53 se estabiliza e se acumula no núcleo da célula, o que propicia sua ligação com o DNA e a transcrição de importantes genes alvos. A ativação do gene p21 produz a proteína P21 que interage com a proteína estimuladora de divisão celular cdk2, impedindo que o ciclo celular passe para o outro estágio, até que o reparo seja concluído e o ciclo possa continuar. A ativação do GADD45 promove o reparo do DNA. Se o reparo falhar, o GADD45 leva a célula à apoptose. Da mesma forma, a ativação do bax, considerado o gene da apoptose, leva a célula à morte programada (COTRAN et al., 1994).

Naquelas células em que há perda ou mutação do gene p53, os genes alvo não serão ativados e com isso não haverá parada do ciclo celular. Não havendo reparo do DNA, as mutações tendem a se expandir e outras mutações podem ocorrer levando à formação de tumores malignos (MAY e MAY, 1999).

Na célula normal o gene p53 controla sua regulação através da ativação do gene mdm-2 que codifica a proteína MDM-2. A MDM 2 se liga ao domínio de ativação inibindo a habilidade do p53 de estimular a transcrição. Isso demonstra mais uma vez porque na célula normal o p53 dura apenas alguns minutos, o que não acontece com o gene p53 mutante que não mais vai ativar o mdm-2, promovendo o seu próprio acúmulo na célula alterada (MAY e MAY, 1999).

O valor prognóstico das alterações no gene p53, no câncer mamário, é controversa na literatura. Sjogren et al. citados por Schmitt et al. (1998) mostraram que os dados obtidos pelos métodos de biologia molecular para detectar

mutações fornecem melhores informações prognósticas do que a imuno-histoquímica que utiliza o anticorpo monoclonal Pab 1801. Recentemente Aas et al., citado por Schmitt et al. (1998) mostraram que a ocorrência de mutações específicas no gene p53 estão associadas com resistência primária à quimioterapia e recidiva precoce em pacientes com câncer de mama. Essas observações confirmam aquelas referidas por Borrensen et al., citados por Schmitt et al. (1998), segundo os quais as mutações no p53 estão associadas à baixa sobrevivência de pacientes portadores de câncer e o seu estudo como marcador prognóstico, pode prever o comportamento clínico e a resposta à terapia no câncer de mama. Allred et al. (1993) consideraram que a expressão do mutante da proteína P53 está associada com taxa de proliferação tumoral alta, recorrência precoce da doença e menor sobrevida nas neoplasias mamárias linfonodo-negativas.

Quando é procedida a análise da imuno-expressão da P53, tal análise reveste-se de importância na avaliação da porcentagem de células marcadas, assim como da intensidade da marcação (SCHMITT et al., 1998). A imunomarcação da P53 é exclusivamente nuclear (CROSIER et al., 1999). Ainda que estudos *in vitro* sugiram que o p53 mutante pode estar associado com a resistência à quimioterapia e à radiação, em certos tipos de linhagens celulares, os resultados são ambíguos na prática clínica do câncer de mama (ALLRED et al., 1998).

Assim, para uma correta avaliação da eficiência da P53 como um marcador prognóstico de neoplasias mamárias, devemos levar em consideração as muitas questões de ordem técnica relacionadas com os diferentes reagentes, a preparação do material citoquímico e/ou histoquímico e a interpretação dos resultados da imunomarcação (ALLRED et al., 1998).

O presente estudo propõe pesquisar a expressão do gene p53 na determinação de um prognóstico reservado para o paciente com câncer e sua associação com fatores prognósticos relacionados à evolução clínica do paciente.

MATERIAIS E MÉTODOS

No presente protocolo experimental foram utilizadas 73 (setenta e três) fêmeas caninas, portadoras de neoplasias mamárias, atendidas junto ao Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique”, da UNIRP – São José do Rio Preto, no período de Dezembro de 2002 a Dezembro de 2003.

O procedimento imuno-histoquímico iniciou-se com a desparafinização dos cortes em xilol, à temperatura ambiente. Em seguida foi feita a hidratação dos cortes com álcoois em concentrações decrescentes, seguida de lavagem em água corrente e em água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada

(10 V), durante 15 minutos e consecutiva lavagem com água destilada (3 banhos). Em panela a vapor, entre 95 e 98°C, foi feita a recuperação antigênica com uma solução de tampão citrato (pH 6,0), durante 35 minutos. Após a estabilização da temperatura das lâminas foram realizados banhos em água corrente, destilada e com solução de PBS, sucessivamente. A seguir foi feita a incubação com o anticorpo primário p53 (Novocastra, clone em 1), em câmara úmida (“overnight”, por 18 horas), a -4°C.

Após a estabilização das lâminas e banhos com solução de PBS, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário (Solução A -kit Dako LSAB+, Peroxidase-Universal) e após uma hora, seguido de um banho com solução de PBS, incubou-se os cortes com o complexo Strepto-avidina/Peroxidase (Solução B-kit Dako LSAB+, Peroxidase-Universal), por 30 minutos. Após banhos em solução de PBS, foi feita a revelação com substrato cromogênico DAB (20ml de cromogen + 1ml de Buffered, Dako®), contracoloração com Hematoxilina de Harris, banhos em série crescente de concentração de álcoois e xilol e finalizando com montagem em meio Permount.

Todas as baterias de lâminas foram sempre acompanhadas de um controle positivo para o anticorpo testado e um controle negativo (sem anticorpo primário). A expressão do marcador foi pesquisada de acordo com a graduação de expressão proposta por Allred et al. (1998) no sistema de cruzes, através do exame em microscópio de luz.

RESULTADOS

O exame histopatológico dos 73 tumores mamários demonstrou que os de maior ocorrência foram os Carcinomas, com 65% dos casos. Destes, 41% foram classificados em Tubulopapilíferos, 36% Complexos, 17% Sólidos e 6% Anaplásicos, Esquirrosos ou Escamosos. Os Tumores Mistos Malignos somaram 21% do total e foram agrupados conforme o tipo de metaplasia. Assim, 54% apresentavam metaplasia cartilaginosa, 13% metaplasia óssea e 33% apresentavam ambos os tipos de metaplasia, tanto óssea quanto cartilaginosa. As neoplasias benignas totalizaram 14% dos casos, e foram representadas pelas Hiperplasias Ductais (60%) e pelos Tumores Mistos Benignos (40%).

Com relação à marcação imuno-histoquímica do P53 observamos que a marcação é nuclear e foi intensa na maioria das lâminas. A marcação citoplasmática deste anticorpo apesar de não ser específica é considerada verdadeira por alguns autores (Figura 1). Observaram-se 22 % de casos com marcação ++ (de 25 a 50% de células positivas); 33% +++ (50 a 75% de células positivas); 45% ++++ (> de 75% de células positivas) sendo que nenhum fragmento foi considerado negativo ao marcador utilizado (Figura 2).

A avaliação estatística do p53 demonstrou que não houve correlação significativa de sua expressão com metástase, sobrevida ou tempo livre da doença nem com o diagnóstico tumoral. Entretanto, pelo Teste de Fisher foi observada uma associação da expressão de P53 com a idade das cadelas com neoplasia mamária (Figura 3). A expressão intensa (acima de 50% das células marcadas) estava presente em cadelas jovens (abaixo de 10 anos de idade) (57,5%).

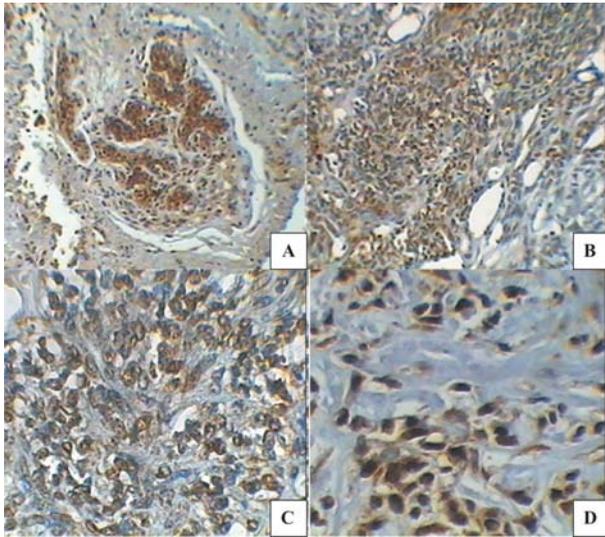


Figura 1 - Fotomicrografia mostrando a imunoposição do P53 nas neoplasias mamárias em cadelas. Observar coloração marrom-dourado dos núcleos (A e B no aumento de 10X, C e D no aumento de 40X).

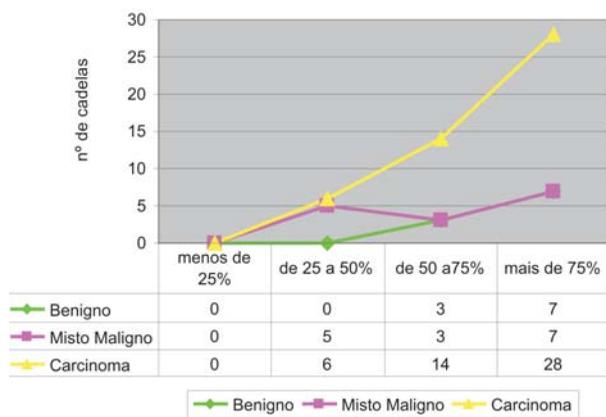


Figura 2 - Imunoposição do P53 em relação ao diagnóstico nas neoplasias de cadelas atendidas no H.V. “Dr. Halim Atique” – UNIRP, no período de Dezembro de 2002 a Dezembro de 2003.

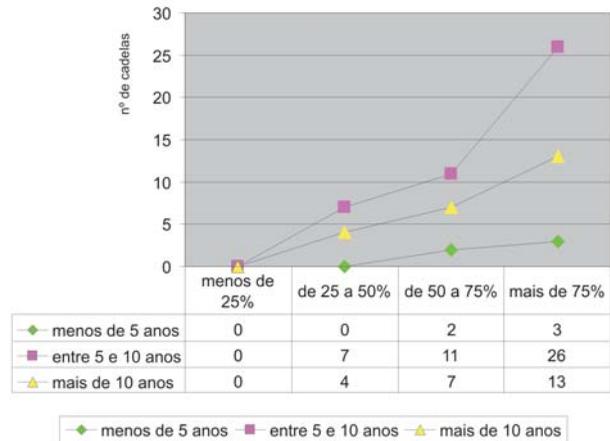


Figura 3 – Imunoposição do P53 em relação à idade nas neoplasias mamárias em cadelas atendidas no H.V. “Dr. Halim Atique” – UNIRP, no período de Dezembro de 2002 a Dezembro de 2003.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A imunomarcagem com o anticorpo P53 demonstrou ser predominantemente nuclear, porém algumas vezes foi observada a marcação citoplasmática do anticorpo. Esta marcação apesar de não ser específica é considerada na avaliação da expressão desse marcador. Observou-se ainda expressão positiva do P53 em todo o grupo, porém, com intensidades diferentes. Como o anticorpo P53 utilizado é policlonal, isto lhe confere uma maior expressão e menor especificidade, justificando a marcação em todo o grupo estudado.

Observou-se que houve uma tendência de associação de sua expressão com o mais maligno dos tumores, os carcinomas, mas esta tendência não foi estatisticamente significativa ($p > 0,005$), pois o grupo é essencialmente de caráter maligno (86% dos casos), com poucos casos de neoplasias benignas, inviabilizando a interpretação estatística dos dados.

Observou-se também a associação da alta expressão do P53 com a idade jovem das cadelas acometidas, diferente do observado com a expressão de p53 em linfomas caninos (SUEIRO et al., 2004). Se um indivíduo herda só uma cópia funcional do gene p53 de seus pais, ela tem maior predisposição ao câncer e usualmente desenvolve muitos tumores independentes em diferentes tecidos e órgãos na vida adulta (por volta dos 50 anos). Essa condição rara e conhecida como Síndrome de Li Fraumeni predispõe ao câncer com caráter autossômico dominante com alta penetrância. Na literatura médica, estima-se que pacientes com esta síndrome apresentem 50% de chance de desenvolver tumores antes dos 30 anos de idade, comparados a 1% na população geral e que 90% dos portadores desenvolvam câncer até 70 anos de idade. Portadores que desenvolveram tumor

na infância são mais susceptíveis ao desenvolvimento de tumores secundários. O risco aparenta ser maior em mulheres, em parte devido ao alto risco de desenvolvimento de câncer de mama (ACHATZ, 2005). Diversos tipos de tumores malignos estão diretamente relacionados a LFS, tais como sarcoma, leucemia, tumores do sistema nervoso central, tumores adeno-corticais, e câncer de mama de início em idade jovem. Famílias que não apresentam a expressão completa do fenótipo clássico da síndrome são denominadas Li-Fraumeni like (LFL) ou Li-Fraumeni variante.

A LFL é definida pelo diagnóstico no probando de qualquer câncer infantil ou sarcoma, tumor cerebral ou carcinoma adeno-cortical em idade jovem (antes dos 45 anos), associado a um parente de primeiro ou segundo grau com câncer típico da síndrome de Li-Fraumeni (sarcoma, câncer de mama, câncer do sistema nervoso central, carcinoma adeno-cortical ou leucemia) em qualquer idade e um parente de primeiro ou segundo grau com qualquer câncer antes dos 60 anos (ACHATZ, 2005). As mutações do gene p53, assim como a perda de seus alelos, são defeitos genéticos encontrados em 50% dos cânceres humanos que ocorrem nos pulmões, mama, cólon, esôfago, fígado, bexiga, ovários e cérebro. Pelo menos dois dos papiloma vírus humano (HPVs) que estão associados à transformação maligna, HPV16 e HPV18, produzem uma proteína chamada E6 que inativa a proteína P53 (COTRAN et al., 1994). O teste genético, feito através do seqüenciamento do gene TP53, é indicado para pacientes que preencham os critérios diagnósticos clínicos da LFS e LFL. No entanto, até o presente, o seqüenciamento do gene TP53 não é feito rotineiramente, sendo o seu estudo oferecido apenas em alguns centros de pesquisa. Em trabalho de pesquisa atualmente em desenvolvimento no Hospital do Câncer AC Camargo notou-se uma incidência aumentada desta síndrome na população brasileira, se comparada a sua frequência na população geral. Notou-se ainda a predisposição a um espectro tumoral mais amplo que o apresentado previamente, sendo verificados tumores de tireóide e renais.

Não há citações da possível manifestação desta síndrome na literatura veterinária. Sendo assim, com estes resultados podemos inferir uma possível alteração genética similar à síndrome que acomete o homem, já reportada pela literatura, que predisporia cadelas jovens a crescimentos neoplásicos, por perda de proteção às células, responsabilidade do gene P53. Estudos moleculares são necessários para a confirmação desta hipótese.

ARTIGO RECEBIDO: Junho/2005
APROVADO: Maio/2006

REFERÊNCIAS

- ACHATZ, M.I.W. Síndrome de Li-Fraumeni. Oncogenética e Aconselhamento Genético. Hospital do Câncer AC Camargo. São Paulo (SP). <http://www.hcanc.org.br/dmeds/genet/ongenet4.html> > acesso em 02/02/2006.
- ALLRED, D.C., CLARK, G.M., ELLEDGE, R., FUQUA, S.A.W., BROWN, R.W., CHAMNESS, G.C., OSBORNE, C.K. McQUIRE, W.L. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n.3, p. 200-205, 1993.
- ALLRED, C.D., HARVEY, J.M., BERARDO, M., CLARK, G.M. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. **Modern Pathology**, v.11, n.2, p.155-168, 1998.
- BARNES, D.M., DUBLIN, E.A, FISHER, C.J, LEVISON, D.A., MILLIS, R.A. Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma: an important new independent indicator of prognosis? **Hum Pathol**, n. 24, p.469-79, 1993.
- BERNSTEIN, J.L., LOPEZ-CARRILLO, L., WANG, L. The epidemiology of Her-2/neu and p53 in breast cancer. **Salud Publica Mex**, v. 41, spl 2:S114-S123, 1999.
- BOSARI, S., RONCALLI, M., VIALE, G., BOSSI, P., COGGI, G. P53 immunoreactivity in inflammatory and neoplastic diseases of the uterine cervix. **Journal of Pathology**, v.169, p.425-30, 1993.
- BRODEY, R.S., GOLDSCHMIDT, M.H., ROSZEL, J.R. Canine mammary gland neoplasms. **Journal of Am An Hosp Ass**, v.19, p.61-89, 1983.
- CHOMPRET, A. The Li Fraumeni syndrome. **Biochimie**, v.84, n.1, p.75-82, 2002.
- COTRAN, R.S., RAMZI, S.C., ROBBINS, S.L. **Robbins pathologic basis of disease**. 5th ed. USA. W.B. Saunders, v.7, p.259-279, 1994.
- CROSIER, M., SCOTT, D., WILSON, R.G., GRIFFITHS, C.D.M., MAY, F.E.B., WESTLEY, B.R., Differences in Ki-67 and c-erb B2 expression between screen-detected and true interval breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v.5, n. 10, p. 2682-2688, 1999.
- DELFINI FILHO., O. **P53: gene e proteína**. Disponível em <<http://www.altavista.com>> Acesso em 5 jan. 2001.

ISRAEL, M.A., HERNANDEZ, M.C., FLORIO, M., ANDRES-BARQUIN, P.J., MANTANI, A., CARTER, J.H., JULIN, C.M. Gene expression as a key mediator of tumor cell biology. **Cancer Research**, v.59, p.1726s-1730s, 1999. Supplement.

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

LEVINE, A.J., MOMAND, J., FINLAY, C.A. The p53 tumor suppressor gene. **Nature**, n. 351, p. 453-6, 1991.

LEWIN, B. **Cell cycle and growth regulation**. In: _____ Genes VI. United States of America: Oxford university press, p. 1089 – 129, 1997.

LEWIN, B. **Oncogenes and cancer**. In: _____ Genes VI. United States of America: Oxford university press, p. 1131 – 72, 1997.

LOWE S.W., BODIS. S, MACCLATCHEY. A. P53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. **Science**, n.266, p.807-810, 1994.

MacEWEN, E.G. Spontaneous tumors in dogs and cats: Models for the study of cancer biology and treatment. **Cancer and Metastases Review**, v.9, n.1, p.125-136, 1990.

MacEWEN, E.G., WITHROW, S.J. **Tumors of the mammary gland**. In: WITHROW, S. J.; MacEWEN, E.G. Small animal clinical oncology. 2nd ed. United States of America: Saunders company, p.356 – 72, 1996.

MAY, P., MAY, E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. **Oncogene**, v.8, p.7621-7636, 1999.

MERLO, G.R., BASOLO, F., FIORE, L., DUBOC, L., INÉS, N.E. P53- dependent and p53-independent activation of apoptosis in mammary epithelial cells reveals a survival function of EGF and insulin. **The Journal of Cell Biology**, v.28, p.1185-1196, 1995.

MONTENARH, M. Functional implications of the growth-suppressor/oncoprotein p53. **Int J Oncol**, n.1, p.37-45, 1992.

MOTTOLLESE, M., MORELLI, L., AGRIMI, U., BENEVOLO, M., SCIARRETTA, F., ANTONUCCI, G., NATALI, G.N. Spontaneous canine mammary tumors – a model for monoclonal antibody diagnosis and treatment of human breast cancer. **Laboratory Investigation**, v.71, n.2, p. 182, 1994.

PELETEIRO, M. C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. LXXXIX, n. 509, p.10 – 29, 1994.

SCHMITT, F.C.; SOARES, R.; CIRNES, L.; SERUCA, R. P53 in breast carcinomas: association between presence of mutation and immunohistochemical expression using a semiquantitative approach. **Pathology Research and Practice**, v.194, p.815-819, 1998.

SCHNEIDER, R. Comparison of age, sex and incidence rates in human and canine breast cancer. **Cancer**, v.26, n.2, p. 419-426, 1970.

SORENMO, K. An update on canine mammary gland tumors. **Proceedings of the 16th Acvim Forum**, p.387-8, 1998.

SUEIRO, F. A. R.; ALESSI, A. C.; VASSALLO, J. Canine Lymphomas: a Morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations on p53 immunoexpression. **J Comp Path**, n. 2-3, vol. 131, p.207-213, 2004.

VAN KALKEN, C.K., PINEDO, H.M., GIACCONE, G. Multidrug resistance from the clinical point of view. **Eur J Cancer**, n.27, p.1481-1486, 1991.

WHO by Armed Forces Institute of Pathology (AFIP) Department of Veterinary Pathology Washington, D.C. 20306-6000 <http://www.afip.org/vetpath/who/whocc.htm> acesso em 01/02/2006.