

## Expressão de *Cyr61* em glândulas mamárias normais e neoplásicas de cadelas

### *Cyr61* expression in normal and neoplastic mammary glands of bitches

Marina Pacheco Miguel<sup>I</sup> Tatyane Penha Sales<sup>II</sup> Liliana Borges de Menezes<sup>III</sup>  
Júlia Miranda Moraes<sup>II</sup> Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura<sup>IV</sup>  
Luiz Augusto Batista Brito<sup>IV</sup> Eugênio Gonçalves de Araújo<sup>IV</sup>

#### RESUMO

As neoplasias mamárias são as mais frequentes em cadelas, representando 25 a 30% do total das afecções neoplásicas das fêmeas caninas. Durante a carcinogênese ocorrem várias modificações na expressão de proteínas, como a *Cyr61*, envolvida na proliferação celular e na angiogênese. Assim, este estudo teve por objetivo determinar o perfil de expressão dessa proteína, por meio da técnica de imunistoquímica, em glândulas mamárias normais e neoplásicas de cadelas. Para tal, foram selecionados 10 casos de cada um dos diagnósticos: adenoma simples, carcinoma complexo e carcinoma simples sólido, além de 10 fragmentos de glândulas mamárias normais, perfazendo o total de 40 fragmentos. O anticorpo policlonal anti-*Cyr61* apresentou marcação em células epiteliais mamárias normais, evidenciando seu papel nos mecanismos de apoptose e proliferação celular. Houve ainda acentuada imunomarcação em tecidos mamários normais e com adenomas, e marcação discreta em carcinomas, diferente do padrão de expressão observado no tecido mamário de mulheres. A expressão constitutiva da proteína *Cyr61* foi demonstrada no tecido mamário canino, constituindo uma alternativa de investigação neoplásica para as alterações mamárias de cadelas.

**Palavras-chave:** canino, neoplasias mamárias, imunistoquímica, CCNI.

#### ABSTRACT

Mammary glands are the most usual sites of tumors in bitches, representing 25 to 30% of all types of cancer. During cancer genesis, several genetic changes alter the expression of different proteins like *Cyr61*, a peptide involved in cell

proliferation and angiogenesis. This work aimed to determine through immunohistochemistry the expression profile of *Cyr61* in normal and neoplastic mammary glands from bitches. So, 10 cases of each diagnose were selected: simple adenoma, complex carcinoma, simple solid carcinoma and fragments of normal mammary glands, in a total of 40 cases. Sections were subjected to immunohistochemistry, employing primary antibodies directed *Cyr61*. *Cyr61* labeling of normal mammary epithelial cells is probably linked to its role in apoptosis and cellular proliferation. The labeling was more intense in normal and adenoma fragments and was discrete in the labeling malignant tumor sections, a different feature of expression from previously reports in human breast cancer. Immunohistochemical analysis with polyclonal antibody *Cyr61* demonstrated the constitutive expression of the protein and contributed to neoplastic research alternative for tumors in bitches.

**Key words:** canine, mammary neoplasias, immunohistochemical, CCNI.

#### INTRODUÇÃO

A *Cyr61* é uma proteína rica em cisteína ligante de heparina que se liga a múltiplos receptores de integrinas, podendo estar presente no citosol e/ou associada à membrana celular e à matriz extracelular de células mesenquimais e epiteliais. Atua na adesão celular, no estímulo à migração celular e angiogênese, e no realce da síntese de DNA, operando como fator

<sup>I</sup>Curso de Biomedicina, Campus Jataí, Universidade Federal de Goiás (UFG), Rodovia Br-364, Km 192, CP 03, 75800-970, Jataí, GO, Brasil. E-mail: marinavet2005@yahoo.com.br. Autor para correspondência

<sup>II</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária (EV), UFG, Goiânia, GO, Brasil.

<sup>III</sup>Departamento de Patologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Goiânia, GO, Brasil.

<sup>IV</sup>Setor de Patologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária, EV, UFG, Goiânia, GO, Brasil.

de crescimento promotor da proliferação fibroblástica e de células endoteliais, bem como no estímulo da condrogênese em células mesenquimais (XIE et al., 2001b; BRIGSTOCK, 2002; TSAI et al., 2002). Nas células em repouso, apresenta-se em baixa quantidade, mas é rapidamente induzida em resposta a fatores de crescimento, divisão celular (O'BRIEN et al., 1990), ao estrógeno no tecido uterino (RIVERA-GONZALEZ et al., 1998), à vitamina D3 nos osteoblastos fetais (SCHUTZE et al., 2001) e ao fator VII-a e à trombina nos fibroblastos humanos (PENDURTHI, 2000).

Em humanos, o aumento da expressão da *Cyr61* foi verificado em diversas enfermidades, como arteriosclerose (HILFIKER et al., 2002; SCHOBER et al., 2002), trombose (PENDURTHI et al., 2000) e, especialmente, neoplasias mamárias (XIE et al., 2001b; SAMPATH et al., 2001; MENENDEZ et al., 2003). Estudos demonstraram o aumento da expressão da *Cyr61* em adenocarcinomas mamários de mulheres e seu possível envolvimento em tumores mediados por estrógenos (TSAY et al., 2000; SAMPATH et al., 2001; XIE et al., 2001a e b).

A avaliação da expressão da *Cyr61* em neoplasias mamárias de mulheres apresenta valor prognóstico, pois essa proteína é um fator pró-angiogênico e regulador do crescimento, e o aumento da sua expressão indica maior grau de malignidade, permitindo que a evolução clínica da neoplasia seja prevista, como a possibilidade de recidivas ou a sobrevida da paciente não tratada (SAMPATH et al., 2001).

As neoplasias mamárias de cadelas apresentam etiologia e fatores predisponentes semelhantes aos das mulheres, como a ação de estrógeno e progesterona exógenos. Porém, a incidência de neoplasia mamária canina, quando comparada à humana, mostra-se três vezes mais alta, mesmo considerando que ambas as espécies apresentam aumento da incidência dessas neoplasias na mesma magnitude. Ainda, ressalta-se que a classificação histológica das neoplasias mamárias em cadelas difere da humana, especialmente no que diz respeito às malignas. Apesar disso, sugere-se que os estudos com neoplasias mamárias de cadelas possam ser utilizados como modelos para melhor entendimento da doença na espécie humana (MISDORP et al., 1999; MISDORP, 2002).

Assim, este trabalho teve o objetivo de determinar o perfil de expressão da *Cyr61* em glândulas mamárias normais e neoplásicas de cadelas, verificando a expressão constitutiva e a intensidade de marcação desta nos casos propostos. A utilização desse anticorpo em estudos com neoplasias mamárias de

cadela ainda não havia sido realizada, sendo este o primeiro relato da marcação de células da glândula mamária canina por *Cyr61*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 40 fragmentos de glândula mamária de cadela, sendo 10 normais e 30 neoplásicas. As amostras de neoplasia mamária foram adquiridas do arquivo do Setor de Patologia Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO (EV/UFG). As amostras de glândula mamária normal, avaliadas macro e microscopicamente, foram obtidas de 10 cadelas encaminhadas ao Setor de Patologia Animal da EV/UFG para exame anatomopatológico. O material foi fixado em formol tamponado a 10%, processado e incluído em parafina. As amostras foram inicialmente avaliadas em hematoxilina e eosina (HE) e agrupadas de acordo com a classificação histológica, considerando glândula mamária normal (n=10), adenoma simples (n=10), carcinoma complexo (n=10) e carcinoma simples sólido (n=10). As neoplasias mamárias foram diagnosticadas segundo critérios da AFIP (Armed Forces Institute of Pathology) (MISDORP et al., 1999).

Para a técnica de imunistoquímica, cortes de 5µm foram distendidos sobre lâminas silanizadas (3, aminopropyl-triethoxysilane, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), sendo incubados em estufa a 36°C, desparafinizados e hidratados. Foram realizados o bloqueio da peroxidase endógena (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, 15 minutos), a recuperação antigênica (tampão citrato pH 6,0, panela de pressão, três minutos) e o bloqueio de reações inespecíficas (BSA a 3%, 1h30min, temperatura ambiente, câmara úmida). Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo policlonal anti-*Cyr61* (H-78; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), na diluição de 1:1000, durante 18 horas, a 4°C e em câmara úmida. Como controle negativo utilizou-se BSA 1,5%. Na sequência, empregou-se o complexo streptoavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako, K0690), em duas etapas de 20 minutos, em câmara úmida e à temperatura ambiente. A reação foi revelada com solução de diaminobenzidina (DAB, Dako, K3468), por um minuto. Solução de PBS foi utilizada para as lavagens entre as etapas. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Mayer, por 30 segundos, e montados com resina sintética (Sigma) e lâminulas histológicas.

As lâminas submetidas à imunistoquímica com anti-*Cyr61* foram analisadas em microscópio óptico de campo claro quanto à localização e tonalidade da marcação. A intensidade de marcação das células

epiteliais normais e neoplásicas foi mensurada por avaliação semiquantitativa após a avaliação de todas as lâminas e posterior definição de tonalidades em escores de gradação de cor, considerando as tonalidades ausente (0), discreta (1), moderada (2) e acentuada (3), sendo todos os fragmentos avaliados em aumento de 100x. Na análise estatística, foram aplicados os testes de Mann-Whitney e análise de variância de postos de Kruskal-Wallis (SAMPAIO, 2007).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve marcação do anticorpo anti-*Cyr61* no citoplasma de células epiteliais e estromais do tecido mamário canino normal e neoplásico, incluindo as tubuloalveolares, os fibroblastos, as endoteliais e as musculares lisas de artérias e arteríolas. De forma semelhante, porém em tecido humano, MOUSSAD & BRIGSTOCK (2000) e BRIGSTOCK (2002) descrevem que a *Cyr61*, bem como as demais proteínas da mesma família, são expressas em fibroblastos, células epiteliais, endoteliais, do músculo liso e células neuronais.

Neste estudo, houve variação na intensidade de marcação da *Cyr61* nas células epiteliais normais e neoplásicas dos diferentes grupos (Tabela 1). Em 80% das amostras de tecido normal, a marcação foi moderada, e em 20%, acentuada. No diagnóstico de adenoma simples, foi constatada marcação acentuada na maioria dos casos (80%) e moderada em 20% (Figura 1A). Já nos carcinomas complexos, a marcação foi discreta em 20% das amostras e moderada em 80%, semelhante ao observado em tecidos normais. Nos casos de carcinoma simples sólido, 50% apresentaram marcação moderada e 50% discreta (Figura 1B). Em todas as amostras, mais de 70% das células apresentaram a intensidade de marcação referida.

Houve diferença ( $P < 0,05$ ) entre todos os diagnósticos, exceto entre glândula mamária normal e com carcinoma complexo ( $P > 0,05$ ) (Tabela 1). A

intensidade de marcação foi maior na glândula mamária normal quando comparada ao carcinoma simples sólido, e menor quando comparada ao adenoma simples, que também apresentou marcação mais acentuada quando comparado ao carcinoma complexo e ao carcinoma simples sólido.

Considerando apenas as neoplasias malignas, o carcinoma complexo apresentou maior escore de marcação quando comparado ao carcinoma simples sólido. Acerca disso, XIE et al. (2001b), em estudo comparativo da expressão de *Cyr61* em glândulas mamárias humanas normais e neoplásicas, verificaram aumento da expressão dessa proteína em 39% dos adenocarcinomas mamários primários invasivos, menor expressão em adenocarcinomas de baixo grau e ausência de expressão no tecido mamário normal. Em estudos similares, JIANG et al. (2004) e O'KELLY et al. (2008) encontraram expressão aumentada de *Cyr61* em células de adenocarcinomas mamários de mulheres quando comparada com células normais e, entre os adenocarcinomas, observaram maior expressão nos tipos mais invasivos em comparação aos de baixo grau de malignidade. Também, SAMPATH et al. (2001) encontraram aumento da expressão da *Cyr61* em 70% dos adenocarcinomas ductais invasivos. Diante disso, é possível que a diferença de intensidade de marcação observada entre as neoplasias malignas neste estudo esteja relacionada ao grau de malignidade, já que, segundo MISDORP et al. (1999), estudos sobre prognóstico de neoplasias mamárias malignas em cadelas mostram que o carcinoma complexo apresenta menor grau de malignidade quando comparado ao carcinoma simples sólido. Contudo, ressalta-se que no tecido mamário canino a expressão diminui conforme aumenta a malignidade tumoral, ao contrário do que se observa no tecido mamário da mulher, em que quanto maior o grau de malignidade, maior a expressão da *Cyr61*.

De acordo com MEUTEN (2002), tumores de mama em cadelas possuem receptores para

Tabela 1 - Médias de postos e frequência dos diferentes escores de intensidade para o anticorpo anti-*Cyr61* em glândulas mamárias normais e neoplásicas de cadelas.

Grupos	Médias de postos	-----Escore-----			
		0	1	2	3
Normal	3,2 <sup>a</sup>	0	0	8 (80%)	2 (20%)
Adenoma Simples	3,8 <sup>b</sup>	0	0	2 (20%)	8 (80%)
Carcinoma Complexo	2,8 <sup>ac</sup>	0	2 (20%)	8 (80%)	0
Carcinoma Simples Sólido	2,5 <sup>d</sup>	0	5 (50%)	5 (50%)	0

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença entre grupos ( $P < 0,05$ ).

Escore: 0-ausência de marcação; 1-marcação discreta; 2-marcação moderada e 3-marcação acentuada.

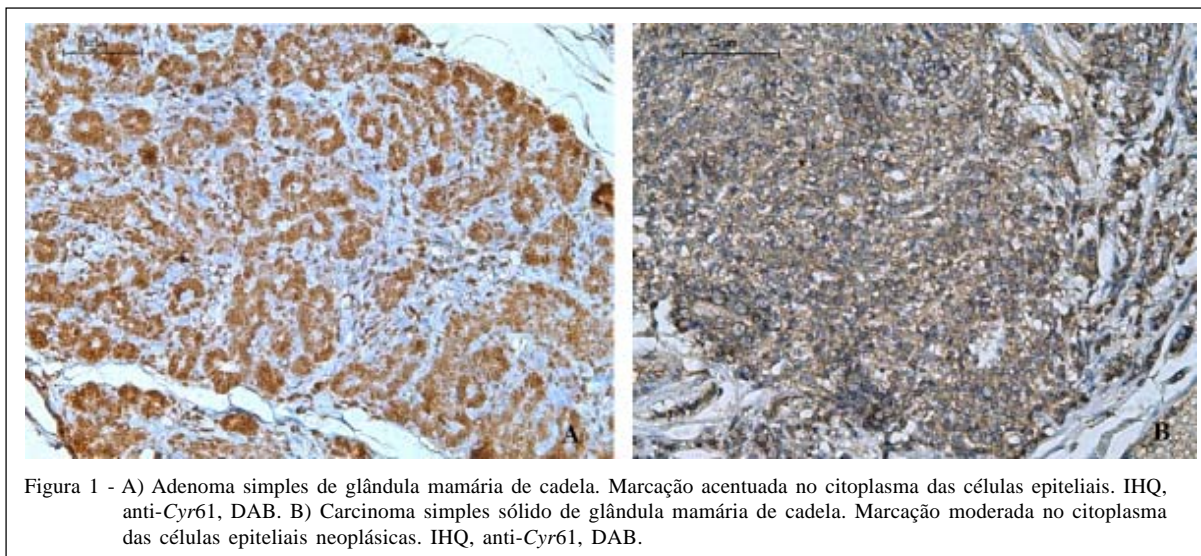


Figura 1 - A) Adenoma simples de glândula mamária de cadela. Marcação acentuada no citoplasma das células epiteliais. IHQ, anti-*Cyr61*, DAB. B) Carcinoma simples sólido de glândula mamária de cadela. Marcação moderada no citoplasma das células epiteliais neoplásicas. IHQ, anti-*Cyr61*, DAB.

estrógeno, progesterona, andrógenos, prolactina e fator de crescimento epidermal. Nas fêmeas dessa espécie, grande parte dos tumores benignos mamários é positiva para receptores de estrógeno e progesterona, enquanto poucas neoplasias malignas expressam os mesmos receptores e em concentrações menores (CASSALI, 2000; GERALDES et al., 2000). Assim, com a progressão do tumor e o aumento da malignidade das neoplasias mamárias em cadelas, ocorre redução da dependência hormonal e maior autonomia das células neoplásicas (GERALDES et al., 2000). Diante disso, é possível que a expressão moderada a acentuada de *Cyr61* nos adenomas simples de glândula mamária de cadelas relacione-se à maior concentração de receptores de estrógeno nesses tumores enquanto que a expressão discreta a moderada nos carcinomas mamários relacione-se à diminuição desses receptores, o que também pode explicar a diferença de marcação entre os carcinomas, já que XIE et al. (2001b) relataram que a hiperexpressão de *Cyr61* está diretamente relacionada à positividade de receptores de estrógeno em células epiteliais mamárias neoplásicas malignas em humanos.

A intensidade de marcação verificada na glândula mamária normal variou de moderada a acentuada e, neste grupo, além da marcação citoplasmática, também foi observada marcação nuclear nas células epiteliais ductais. Considerando que a glândula mamária é o único órgão em que o desenvolvimento de ductos ocorre após a fase embrionária (WISEMAN & WERB, 2002), é possível a participação da *Cyr61* na promoção da proliferação e adesão das células epiteliais dos ductos mamários, já que essa proteína está envolvida nos processos de

mediação da migração e adesão celular, operando como fator de crescimento em diversas situações (XIE et al., 2001b; BRIGSTOCK, 2002; TSAI et al., 2002).

Em humanos, vários estudos têm procurado caracterizar o padrão de expressão da *Cyr61* em diferentes tipos de processos patológicos, principalmente os neoplásicos (BRIGSTOCK, 2002; HILFIKER et al., 2002; SAKAMOTO et al., 2004). Pesquisas evidenciando a importância dessa proteína na carcinogênese mamária de mulheres têm ampliado as perspectivas de terapêutica e a prevenção da progressão desses tumores (TSAI et al., 2000; SAMPATH et al., 2001; MENENDEZ et al., 2003). Embora a expressão da *Cyr61* no tecido mamário normal e neoplásico das cadelas tenha sido diferente da que se observa na mama da mulher, a avaliação tecidual dessa proteína pode representar uma ferramenta na determinação do prognóstico das neoplasias mamárias das fêmeas da espécie canina. Ainda, a possível relação entre hormônios, como estrógeno e progesterona, e a ativação e a expressão da *Cyr61* suscita a necessidade da investigação da expressão desses receptores hormonais e dessa proteína no tecido mamário canino, especialmente naquele com proliferações malignas.

## CONCLUSÕES

A marcação de *Cyr61* no tecido mamário canino é mais acentuada nas glândulas normais e com neoplasia benigna em comparação àquele com proliferações malignas. Entre os tipos neoplásicos, o adenoma simples apresenta maior intensidade de marcação para *Cyr61*. Já quando consideradas as neoplasias malignas, há maior intensidade de marcação

no carcinoma complexo. A utilização do anticorpo policlonal anti-*Cyr61*, por meio de imunistoquímica, em fragmentos de glândulas mamárias normais e neoplásicas de cadelas, permite demonstrar a expressão constitutiva da proteína, e mostra potencial para indicar o grau de malignidade entre os diferentes tipos histológicos.

## AGRADECIMENTOS

À Prof.a Dr.a Renée Laufer Amorim (FMVZ, UNESP, Botucatu, SP) e ao Prof. Msc. Helder Esteves Thomé (UNIFEOB, São João da Boa Vista, São Paulo), pela colaboração na obtenção das neoplasias mamárias.

## REFERÊNCIAS

- BRIGSTOCK, D.R. Regulation of angiogenesis and endothelial cell function by connective tissue growth factor (CTGF) and cysteine-rich 61 (*Cyr61*). **Angiogenesis**, v.5, n.3, p.153-165, 2002. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/1643481710204456/fulltext.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2010. doi: 10.1023/A:1023823803510.
- CASSALI, G.D. **Estudos morfológicos, imunohistoquímicos e citométrico de tumores mamários da cadela – aspectos comparativos com neoplasias da mama humana**. 2000. 73f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Patologia, Escola de Veterinária, UFMG, MG.
- GERALDES, M. et al. A immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. **Veterinary Record**, v.146, p.1140-1148, 2000.
- HILFIKER, A. et al. Expression of *Cyr61*, an angiogenic immediate early gene, in arteriosclerosis and its regulation by angiotensin II. **Circulation**, v.106, p.254-260, 2002. Disponível em: <<http://circ.ahajournals.org/cgi/reprint/106/2/254>>. Acesso em: 15 abr. 2010. doi: 10.1161/01.CIR.0000021426.87274.62.
- JIANG, W.G. et al. Differential expression of the CCN family members *Cyr61*, CTGF and *Nov* in human breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v.11, p.781-791, 2004. Disponível em: <<http://erc.endocrinology-journals.org/cgi/reprint/11/4/781>>. Acesso em: 15 abr. 2010. doi: 10.1677/erc.1.00825.
- MENÉNDEZ, J.A. et al. The angiogenic factor CYR61 in breast cancer: molecular pathology and therapeutic perspectives. **Endocrine-Related Cancer**, v.10, p.141-152, 2003. Disponível em: <<http://erc.endocrinology-journals.org/cgi/reprint/10/2/141.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2010. doi: 10.1677/erc.0.0100141.
- MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. 4.ed. California: Iowa State University, 2002. 788p.
- MISDORP, W. et al. **Histological classification of mammary tumors of the dog and cat**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1999. V.7, 59p.
- MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. Iowa: Blackwell Publishing, 2002. Cap.12, p.575-606.
- MOUSSAD, E.E.; BRIGSTOCK, D.R. Connective tissue growth factor: what's in a name? **Molecular Genetics and Metabolism**, v.71, n.1-2, p.276-92, 2000. Disponível em: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6WNG-45C0R18-15-1&\\_cdi=6962&\\_user=686368&\\_pii=S1096719200930592&\\_orig=search&\\_coverDate=09%2F30%2F2000&\\_sk=999289998&view=c&wchp=dGLbVzb-zSkzS&md5=77e8694042a2deeb13cdd3b045081265&ie=/sdatarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6WNG-45C0R18-15-1&_cdi=6962&_user=686368&_pii=S1096719200930592&_orig=search&_coverDate=09%2F30%2F2000&_sk=999289998&view=c&wchp=dGLbVzb-zSkzS&md5=77e8694042a2deeb13cdd3b045081265&ie=/sdatarticle.pdf)>. Acesso em: 15 abr. 2010. doi: 10.1006/mgme.2000.3059.
- O'BRIEN, T.P. et al. Expression of *Cyr61*, a growth factor-inducible immediate-early gene. **Molecular and Cellular Biology**, v.10, p.3569-3577, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC360792/pdf/molcellb00043-0293.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2010.
- O'KELLY, J. et al. Functional domains of CCN1 (*Cyr61*) regulate breast cancer progression. **International Journal of Oncology**, v.33, p.59-67, 2008. Disponível em: <[http://www.spandidos-publications.com/ijo/article.jsp?article\\_id=ijo\\_33\\_1\\_59](http://www.spandidos-publications.com/ijo/article.jsp?article_id=ijo_33_1_59)>. Acesso em: 15 abr. 2010.
- OLIVEIRA, C.M. Conhecendo um pouco sobre o tumor mamário. **Informativo da Associação Brasileira de Oncologia Veterinária**, n.1, p.1-5, 2008. Disponível em: <[http://www.abrovet.org.br/arquivos/85923Boletim\\_n1.pdf](http://www.abrovet.org.br/arquivos/85923Boletim_n1.pdf)>. Acesso em: 15 abr. 2010.
- PENDURTHI, U.R. et al. Factor VIIa and thrombin induce the expression of *Cyr61* and connective tissue growth factor, extracellular matrix signaling proteins that could act as possible downstream mediators in factor VIIa x tissue factor-induced signal transduction. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.19, p.14632-14641, 2000. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/275/19/14632.full.pdf+html>>. Acesso em: 15 abr. 2010. doi: 10.1074/jbc.275.19.14632.
- RIVERA-GONZALEZ, R. et al. Estrogen-induced genes in the uterus of ovariectomized rats and their regulation by droloxifen and tamoxifen. **Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v.64, n.1-2, p.13-24, 1998. Disponível em: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6T8X-3SRJ27X-2-1&\\_cdi=5098&\\_user=686368&\\_pii=S0960076097001428&\\_orig=search&\\_coverDate=01%2F31%2F1998&\\_sk=999359998&view=c&wchp=dGLVz-zSkWb&md5=9e57213ebc2f8bc05802640463742456&ie=/sdatarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6T8X-3SRJ27X-2-1&_cdi=5098&_user=686368&_pii=S0960076097001428&_orig=search&_coverDate=01%2F31%2F1998&_sk=999359998&view=c&wchp=dGLVz-zSkWb&md5=9e57213ebc2f8bc05802640463742456&ie=/sdatarticle.pdf)>. Acesso em: 15 abr. 2010. doi:10.1016/S0960-0760(97)00142-8.
- SAKAMOTO, S. et al. Increased expression of *Cyr61*, an extracellular matrix signaling protein, in human benign prostatic hyperplasia and its regulation by lysophosphatidic acid. **Endocrinology**, v.145, n.6, p.2929-2940, 2004. Disponível em: <<http://endo.endojournals.org/cgi/reprint/145/6/2929>>. Acesso em: 15 abr. 2010. doi: 10.1210/en.2003-1350.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 3.ed. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 2007. 264p.
- SAMPATH, D. et al. *Cyr61*, a member of the ccn family, is required for mcf-7 cell proliferation: regulation by 17 $\beta$ -estradiol

and overexpression in human breast cancer. **Endocrinology**, v.142, n.6, p.2540-2548, 2001. Disponível em: <<http://endo.endojournals.org/cgi/reprint/142/6/2540>>. Acesso em: 15 abr. 210. doi: 10.1210/en.142.6.2540.

SCHÖBER, J.M. et al. Identification of integrin alpha(M)beta(2) as an adhesion receptor on peripheral blood monocytes for *Cyr61* (CCN1) and connective tissue growth factor (CCN2): Immediate-early gene products expressed in atherosclerotic lesions. **Blood: The Journal of Hematology**, v.99, p.4457-4465, 2002. Disponível em: <<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/reprint/99/12/4457>>. Acesso em: 15 abr. 2010.

SCHÜTZE, N. et al. 5' flanking sequence of the human immediate early responsive gene *ccn1\** (*cyr61*) and mapping of polymorphic CA repeat sequence motifs in the human *ccn1* (*cyr61*) locus. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology**, v.54, p.170-175, 2001. Disponível em: <<http://mp.bmj.com/content/54/3/170.long>>. Acesso em: 15 abr. 2010. doi:10.1136/mp.54.3.170.

TSAI, M.S. et al. Expression and function of *Cyr61*, an angiogenic factor, in breast cancer cell lines and tumor biopsies. **Cancer Research**, v.60, p.5603-5607, 2000. Disponível em:

<<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/reprint/60/20/5603>>. Acesso em: 15 abr. 2010.

TSAI, M.S. et al. *Cyr61* promotes breast tumorigenesis and cancer progression. **Oncogene**, v.21, p.8178-8185, 2002. Disponível em: <<http://www.nature.com/onc/journal/v21/n53/pdf/1205682a.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2010. doi: 10.1038/sj.onc.1205682.

XIE, D. et al. Breast cancer: *Cyr61* is over-expressed, estrogen inducible and associated with more advanced disease. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.14187-14194, 2001a. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/276/17/14187.full.pdf+html>>. Acesso em: 15 abr. 2010. doi: 10.1074/jbc.M009755200.

XIE, D. et al. Elevated levels of connective tissue growth factor, WISP-1, and CYR61 in primary breast cancers associated with more advanced features. **Cancer Research**, v.61, p.8917-8923, 2001b. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/reprint/61/24/8917>>. Acesso em: 15 abr. 2010.

WISEMAN, B.S; WERB, Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. **Science**, v.296, p.1046-1049, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/296/5570/1046>>. Acesso em: 15 abr. 2010. doi: 10.1126/science.1067431.