

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

DETECÇÃO DE GLICOCONJUGADOS DE LECITINAS EM
NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS

Juliana Evangelista Bezerril

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Janeiro de 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

DETECÇÃO DE GLICOCONJUGADOS DE LECITINAS EM
NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS

Juliana Evangelista Bezerril

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi

Trabalho de tese apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Janeiro de 2013

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JULIANA EVANGELISTA BEZERRIL- nascida no dia 07 de junho de 1984, natural da cidade do Gama, Distrito Federal. Iniciou sua graduação, no curso de Medicina Veterinária no Centro Universitário de Desenvolvimento do Centro-Oeste (UNIDESC) no ano de 2002, tendo concluído em 2006. Durante a graduação, foi monitora duas vezes das disciplinas de Patologia Geral e Patologia Especial, sendo ainda monitora da disciplina de Nutrição Animal e Zootecnia. Participou de vários cursos e estágios, entre eles, o estágio curricular no Departamento de Patologia Animal da Universidade Federal de Viçosa (UFV). No ano de 2007, iniciou o mestrado em Medicina Veterinária, na área de concentração de Patologia Animal da UFV, sob orientação da Professora Dra. Marlene Isabel Vargas Vilorio, tendo concluído o mesmo em 2009, quando defendeu a dissertação intitulada “Avaliação da co-infecção do circovírus suíno 2 com *Mycoplasma hyopneumoniae* em amostras de pulmões coletadas em abatedouro na Região da Mata Mineira”. Durante o mestrado, participou da rotina de necropsia e leitura de lâminas, ministrou minicursos nas semanas acadêmicas da mesma universidade e publicou vários resumos. Ingressou no programa de doutorado na Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho, no ano de 2009, inicialmente sob orientação do Prof. Dr. Luiz Fernando de Oliveira e Silva Carvalho, na área de Clínica Médica de Suínos, tendo trocado de área e orientador, no ano seguinte, por motivo de aposentadoria do Prof. Luiz Fernando. Passou a ser orientada pelo Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi, do Departamento de Patologia Veterinária. Durante o doutorado, publicou artigos científicos e resumos. Ministrou aula das disciplinas de Patologia Geral, Patologia Especial e Fisiologia Animal I, por dois semestres na UNIDESC. Participou de vários cursos de aperfeiçoamento, como “The Gross Morbid Anatomy of Diseases of Animals” ministrado no ano de 2010 na cidade de Belo Horizonte e participou ainda da “Pasantia de analisis de inmunohistoquímica y lectinhistoquímica” na Facultad de Ciencias Veterinarias da Universidad Nacional de La Plata- Argentina.

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | ix |
| LISTA DE TABELAS | iii |
| LISTA DE FIGURAS | iv |
| RESUMO..... | vii |
| ABSTRACT..... | viii |
| 1. Introdução | 1 |
| 2. Revisão de Literatura..... | 2 |
| 2.1. Neoplasias mamárias caninas | 2 |
| 2.2. Metástases..... | 3 |
| 2.3. Lecitinas | 3 |
| 2.3.1. Histórico..... | 3 |
| 2.3.2. Definição | 4 |
| 2.3.3. Decodificadoras de glicocódigos | 6 |
| 2.3.4. Ocorrência | 6 |
| 2.3.5. Nomenclatura e classificação..... | 7 |
| 2.3.6. Funções e utilização | 8 |
| 2.3.7. Como marcadores de tecidos | 9 |
| 3. Objetivo | 10 |
| 4. Material e métodos | 10 |
| 4.1. Grupos experimentais..... | 10 |
| 4.2. Lecitina-histoquímica..... | 12 |
| 4.3. Avaliação do tipo celular, distribuição da marcação e contagem das células marcadas | 13 |
| 4.4. Análise estatística | 13 |
| 5. Resultados..... | 14 |
| 6. Discussão..... | 22 |
| 6. Conclusões..... | 34 |
| 7. Referências | 35 |

LISTA DE TABELAS

| | | Páginas |
|----------|--|---------|
| Tabela 1 | Classificação das lecitinas animais de acordo com a estrutura..... | 8 |
| Tabela 2 | Características utilizadas para classificação dos tumores mamários das cadelas conforme o grau de malignidade..... | 11 |
| Tabela 3 | Número de amostras de mama normal, neoplasias mamárias caninas classificadas por tipo e grau histológico e metástases..... | 11 |
| Tabela 4 | Lecitinas biotiniladas utilizados em tecidos de neoplasmas mamários, tecidos mamários normais..... | 12 |
| Tabela 5 | Estruturas celulares marcadas pelas Lecitinas UEA, DBA, HPA E PNA, de acordo com o tipo histológico de mama canina. CE= Células Epiteliais; CI= Células Inflamatórias; CEn= Células Endoteliais; FB= Fibroblastos; MP= Células mioepiteliais; CD= Condrócitos..... | 15 |
| Tabela 6 | Valores médios e desvio padrão das lecitinas <i>Ulex europaeus</i> (UEA), <i>Arachis hypogaea</i> (PNA), <i>Helix pomatia</i> (HPA) e <i>Dolichos biflorus</i> (DBA), comparadas entre as Classificações histopatológicas..... | 21 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| Figura 1. Ligação lecitina-açúcar é causada por combinações de hidrogênios da proteína com grupos hidroxilas do açúcar | 5 |
| Figura 2. Detecção de glicoconjugados pelas lecitinas: <i>Ulex europaeus</i> (UEA), <i>Arachis hypogaea</i> (PNA), <i>Helix pomatia</i> (HPA) e <i>Dolichos biflorus</i> (DBA) nos grupos: (A) controle, médias (n=7), (B) adenoma, médias (n=10), (C) carcinoma sólido grau II, médias (n=10) e (D) carcinoma sólido grau III, médias (n=7), seguidas de pelo menos por uma letra em comum não diferem pelo teste de Tuckey ($p>0,05$). Os resultados estão expressos com a média \pm erro-padrão. | 16 |
| Figura 3. Detecção de glicoconjugados pelas lecitinas: <i>Ulex europaeus</i> (UEA), <i>Arachis hypogaea</i> (PNA), <i>Helix pomatia</i> (HPA) e <i>Dolichos biflorus</i> (DBA) nos grupos: (A) carcinoma papilar grau I, médias (n=7), (B) carcinoma papilar grau II, médias (n=8), (C) carcinoma papilar grau III, médias (n=7) e (D) carcinoma tubular grau I, médias (n=8), seguidas de pelo menos por uma letra em comum não diferem pelo teste de Tuckey ($p>0,05$). Os resultados estão expressos com a média \pm erro-padrão. | 17 |
| Figura 4. Detecção de glicoconjugados pelas lecitinas: <i>Ulex europaeus</i> (UEA), <i>Arachis hypogaea</i> (PNA), <i>Helix pomatia</i> (HPA) e <i>Dolichos biflorus</i> (DBA) nos grupos: (A) carcinoma tubular grau II, médias (n=8), (B) carcinoma tubular grau III, médias (n=10), (C) carcinoma em tumor misto grau I, médias (n=9) e (D) carcinoma em tumor misto grau II, médias (n=9), seguidas de pelo menos por uma letra em comum não diferem pelo teste de Tuckey ($p>0,05$). Os resultados estão expressos com a média \pm erro-padrão. | 19 |
| Figura 5. Médias do percentual de células marcadas (\pm desvio padrão) de glicoconjugados pelas lecitinas: <i>Ulex europaeus</i> (UEA), <i>Arachis hypogaea</i> (PNA), <i>Helix pomatia</i> (HPA) e <i>Dolichos biflorus</i> (DBA) nos grupos: (A) carcinoma em tumor misto grau III, (n=10), (B) carcinossarcoma, (n=10), (C) metástase, (n=10), seguidas de pelo menos uma letra em comum não diferem pelo teste de Tuckey ($p>0,05$). | 20 |
| Figura 6. Fotomicrografia de carcinoma sólido grau II em cadela. Observar marcação de receptores da lecitina DBA no citoplasma de células epiteliais (seta vermelha). | 23 |

- Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva de 40x.
- Figura 7. Fotomicrografia de carcinoma sólido grau II em cadela. Observar marcação de receptores da lecitina UEA no citoplasma de células epiteliais (seta vermelha). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x. 27
- Figura 8. Fotomicrografia de neoplasia mamária canina metastática em linfonodo. Observar marcação de receptores da lecitina UEA no citoplasma de células epiteliais (seta vermelha). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x. 27
- Figura 9. Fotomicrografia mama sem neoplasia canina. Observar marcação de receptores da lecitina UEA no citoplasma de células epiteliais (seta vermelha). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x. 28
- Figura 10. Fotomicrografia carcinoma em tumor misto grau I em cadela. Observar marcação de receptores da lecitina UEA no citoplasma de células epiteliais (seta vermelha). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x. 28
- Figura 11. Fotomicrografia de carcinoma papilar grau II em cadela. Observar marcação de receptores da lecitina DBA no citoplasma de células epiteliais (seta vermelha). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x. 29
- Figura 12. Fotomicrografia de carcinoma papilar grau II em cadela. Observar marcação de receptores da lecitina DBA no citoplasma de células epiteliais (seta vermelha). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x. 29
- Figura 13. Fotomicrografia de neoplasia mamária canina metastática em linfonodo. Observar marcação de receptores da lecitina DBA no citoplasma de células epiteliais (seta vermelha). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x. 30
- Figura 14. Fotomicrografia de carcinoma tubular grau II em cadela. Observar marcação de receptores da lecitina PNA no citoplasma de células epiteliais (seta vermelha). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x. 30
- Figura 15. Fotomicrografia de carcinoma em tumor misto grau I em 31

cadela. Observar marcação de receptores da lecitina PNA no citoplasma de células epiteliais (seta vermelha). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x.

- Figura 16. Fotomicrografia de carcinoma em tumor misto grau I em cadela. Observar marcação de receptores da lecitina PNA no citoplasma de células epiteliais (seta vermelha). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x. 31
- Figura 17. Fotomicrografia de carcinoma mamário metastático em linfonodo. Observar marcação de receptores da lecitina HPA no citoplasma de células epiteliais (seta vermelha). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x. 32
- Figura 18. Fotomicrografia de carcinoma papilar grau II. Observar marcação de receptores da lecitina HPA no citoplasma de células epiteliais (seta vermelha). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x. 32
- Figura 19. Fotomicrografia de carcinoma em tumor misto grau II em cadela. Observar marcação de receptores da lecitina HPA no citoplasma de células epiteliais (seta vermelha). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x. 33
- Figura 20. Fotomicrografia de carcinoma tubular grau II em cadela. Observar marcação de receptores da lecitina HPA no citoplasma de células epiteliais (seta vermelha). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x. 33

DETECÇÃO DE CONJUGADOS DE LECITINAS EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS PRIMÁRIAS DE CADELAS E EM METÁSTASES

RESUMO- Os tumores mamários representam aproximadamente 52%, de todas as neoplasias observadas em cadelas. Lecitinas são proteínas naturais de origem não imune, que se ligam a carboidratos. Por existir um grande número de lecitinas com capacidade de ligação com diferentes carboidratos, esta versátil molécula tem sido utilizada em diversos segmentos da pesquisa biológica. O presente trabalho tem por objetivo investigar, em tecido mamário canino, receptores das lecitinas UEA - *Ulex europaeus* (carqueja), PNA - *Arachis hypogaea* (amendoim), HPA - *Helix pomatia* (caracol romano) e DBA - *Dolichos biflorus* (faveira) presentes em tecido mamário normal, em neoplasias mamárias e em metástases dessas neoplasias. Para tanto, foram utilizadas 125 amostras de mama, classificadas de acordo com Cassali et al., (2011). Para a quantificação da frequência da marcação foram aleatoriamente selecionados quatro campos por corte e estabelecido um valor para o percentual de células marcadas, utilizando-se objetiva de 40x. Os resultados foram submetidos às análises de variância e à comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Para a lecitina UEA, não foi observada diferença significativa entre nenhum dos tipos histológicos. Para PNA, foi observada menor marcação no carcinoma sólido grau II, que diferiu significativamente dos demais tipos histológicos. Para HPA, observou-se menor marcação do grupo carcinossarcoma, que diferiu significativamente dos demais tipos histológicos. Para DBA, houve menor marcação do carcinoma papilar grau II com relação aos demais tipos histológicos. Na comparação das lecitinas utilizadas no presente estudo, por tipo histológico, não foi observado nenhum padrão. Quanto à formação de glicoconjugados em estruturas celulares (tipo celular e marcação de membrana, citoplasmática ou nuclear), as lecitinas UEA, DBA, HPA e PNA não revelaram diferenças entre si. As lecitinas UEA, DBA, HPA e PNA, revelaram padrão de marcação diferente entre tecido mamário sem neoplasia e neoplasias mamárias caninas. As lecitinas UEA, DBA, HPA e PNA, não revelaram padrão de marcação diferente entre os tipos histológicos de neoplasias mamárias caninas. As lecitinas UEA, DBA, HPA e PNA, se revelaram menos marcadas em focos metastáticos de neoplasias mamárias caninas que em tecido mamário canino sem neoplasias e tecido mamário neoplásico de cadela. Com relação a quantidade de marcação, as lecitinas PNA e HPA revelaram-se promissoras para a avaliação diagnóstica de neoplasias mamárias caninas. A formação de glicoconjugados de PNA variou entre vários tipos histológicos e de HPA foi menor no grupo dos carcinossarcomas. As lecitinas UEA e DBA revelaram marcação muito semelhante entre os tipos histológicos de neoplasias mamárias caninas, metástases e tecido mamário normal.

Palavras-chave: Tumor mamário canino, oncologia veterinária, UEA, PNA, HPA, DBA

DETECTION OF LECTIN CONJUGATES IN PRIMARY BREAST NEOPLASMS OF BITCHES AND METASTASES

ABSTRACT- Mammary tumors represent approximately 52% of all malignancies observed in dogs. Lectins are natural proteins of non-immune origin which bind to carbohydrates. Because there is a large number of lectins, with binding affinity for different carbohydrates, this versatile molecule has been used in several segments of biological research. The present study aims to investigate, in canine mammary tissue, lectins receptors UEA - *Ulex europaeus* (gorse), PNA - *Arachis hypogaea* (peanut), HPA - *Helix pomatia* (Roman snail) and DBA - *Dolichos biflorus* (horse gram) present in normal breast tissue, in breast neoplasms and metastases in these neoplasms. Thus, we used 125 samples of breast, classified according Cassali et al., (2011). To quantify the frequency of marking, four fields per section were randomly selected and a value for the percentage of labeled cells was set, using a 40x objective. The results were submitted to analysis of variance and comparison of means by Tukey test ($p < 0.05$). For lectin UEA, there was no significant difference between any of histological types. For PNA, the lowest marking was observed in solid carcinoma grade II, which differed significantly from other histologic types. For HPA, a lower markup in carcinosarcoma group was observed, which differed significantly from other histological types. For DBA the smaller markup was for grade II papillary carcinoma in relation to other histologic types. Comparison the lectins used in this study for histological type showed no observable pattern. None of lectins had more or less marking in all groups, marking or different histological types between more and less aggressive. Lectins PNA and HPA have shown promise for the diagnostic evaluation of canine mammary neoplasms. The formation of glycoconjugates for PNA varied between different histological types and HPA was lower in the carcinosarcomas. Lectins UEA and DBA labeling revealed to be very similar between histological types of canine mammary tumors, metastases and normal breast tissue.

Keywords: canine mammary tumor, veterinary oncology, UEA, PNA, DBA

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN - Adenoma

C - Grupo controle

CARCINOS - Carcinossarcoma

Con A - *Concanavalina A*

CP - Carcinoma Papilar

CRD - Domínio de reconhecimento de carboidrato

CT - Carcinoma Tubular

CTM - Carcinoma em Tumor Misto

CS - Carcinoma sólido

DAB - Diaminobenzidina

DBA - *Dolichos biflorus*

Era - Receptor de estrógeno

HPA - *Helix pomatia*

LEAPT - *Lectin Direct Enzyme-Activated Prodrug Therapy*

MET - Metástase

PAS - Ácido periódico Schiff

PBS - Solução salina tamponada com fosfatos

PgR - Receptor de progesterona

pH - Potencial hidrogênico

PNA - *Arachis hypogaea*

RCA - *Ricinus communis*

UEA - *Ulex europaeus*

WGA - *Wheat germ*

WHO - Organização Mundial de Saúde

1. Introdução

As neoplasias apresentam elevada incidência, tanto em humanos quanto em animais, estas são indicadas como uma das causas mais frequentes de óbito em cães e gatos (BALDIN et al., 2005). O diagnóstico e o tratamento do câncer representam um dos maiores desafios na clínica veterinária de pequenos animais. A incidência de câncer em animais tem aumentado, também devido aos avanços nas técnicas diagnósticas (DOBSON; GORMAN, 1988) e à longevidade crescente destes animais (MORRISON, 1998). Os tumores mamários são muito frequentes em canídeos. Correspondem a cerca de 25 a 50% do total dos tumores observados em cães, atrás apenas dos de pele (FIDLER, 1967; MOULTON, 1990). Segundo Dagli (2008) os tumores mamários representam aproximadamente 52% de todas as neoplasias.

Diversos fatores têm sido relacionados ao prognóstico das neoplasias, entre eles o tamanho, o envolvimento de linfonodos, a presença de metástases distantes, o tipo histológico, o grau de malignidade, o grau de diferenciação celular, a evidência de infiltrado mononuclear adjacente ao tumor e a presença ou ausência de marcadores que indiquem crescimento celular neoplásico (RUTTEMAN *et al.*, 2001).

A utilização dos marcadores tumorais na avaliação do prognóstico do câncer de mama tem crescido bastante nos últimos anos. Muitos desses marcadores, os quais foram inicialmente identificados por meio de estudos moleculares e bioquímicos, podem agora ser localizados em cortes de tecido pelo uso da imunohistoquímica (OHASHI et al., 2006). Incluem-se nesta ampla categoria uma variedade de marcadores, tais como: genes que atuam na proliferação celular (proteínas c-erbB-2 e c-erbB-3), diferenciação celular (ER α - receptor de estrógeno α), gene p53, receptor de progesterona (PgR), apoptose (gene de supressão tumoral p53) e invasão celular (catepsina D) (RUDLAND et al., 2006). O uso de proteínas que estejam presentes em diversos tecidos e que sejam relacionadas a vários fenômenos celulares teria substancial valor para a avaliação de fatores relacionados ao diagnóstico (DODD e DRICKAMER, 2001).

Frente ao exposto torna-se interessante obter maiores informações e identificação de possíveis imuno-marcadores tumorais para estabelecer prognósticos mais precisos e possivelmente orientar opções de tratamento. Assim, o

presente trabalho tem por objetivo investigar, no tecido mamário, receptores das lecitinas UEA - *Ulex europaeus* (carqueja), PNA - *Arachis hypogaea* (amendoim), HPA - *Helix pomatia* (caracol romano) e DBA - *Dolichos biflorus* (faveira) presentes em glândula mamária normal, em neoplasias mamárias e em metástases dessas neoplasias.

2. Revisão de Literatura

2.1. Neoplasias mamárias caninas

Os tumores mamários são as neoplasias mais frequentes na cadela e representam problema de grande impacto em medicina veterinária (CASSALI et al., 2011). 75% dos tumores mamários apresentam comportamento maligno (HEDLUND, 2008) sendo verificado aumento na incidência com a progressão da idade. As metástases de tumores mamários acometem preferencialmente os pulmões, devido ao intenso fluxo de sangue que passa por este órgão (RUBIN; FARBER, 2002).

A transformação neoplásica é multifatorial, mas sabe-se que o desenvolvimento de neoplasias mamárias em cadelas é dependente em grande parte de hormônios. Tanto é que a incidência de tumor de mama é de 0,5% quando se faz a castração antes do primeiro cio, 8% após o primeiro ciclo estral e 26% após dois ou mais ciclos (OLIVEIRA et al., 2003). No entanto, um estudo sistemático realizado com base nas diretrizes de Cochrane, por Beauvais et al. (2012), após pesquisar entre 11.149 artigos em bases de dados, selecionou 13 estudos redigidos em inglês, que abordaram a associação entre idade de esterilização e tumores mamários. Concluindo que, embora haja evidências de que a castração até 2,5 anos esteja associada à redução de tumores mamários, esta evidência é fraca, devido à escassez de estudos publicados que abordem adequadamente a questão.

As neoplasias mamárias caninas historicamente constituem um desafio para clínicos e, principalmente, para patologistas, já que a nomenclatura e classificação desses tumores têm se revelado muitas controversas (ZUCCARI, 2008).

No Brasil, foi elaborada padronização da classificação histológica das neoplasias mamárias caninas, durante o Encontro de Patologia Mamária: Diagnóstico, Prognóstico e Tratamento das Neoplasias Mamárias da Cadela, em

2010, na cidade de Belo Horizonte-MG (CASSALI et al., 2011). Os diagnósticos para tumores mamários caninos malignos foram padronizados em carcinomas *in situ*; carcinomas lobulares, carcinomas em tumores mistos; carcinomas complexos, carcinomas tubulares; carcinomas papilares; carcinomas sólidos; carcinomas micropapilares; carcinomas anaplásicos; carcinomas pleomórficos; carcinomas mucinosos e carcinomas ricos em lipídeos.

2.2. Metástases

O processo metastático consiste em uma série de passos. A angiogênese é o desenvolvimento de vasos para suprir as necessidades metabólicas do tumor primário. Esse aporte, também pode ser utilizado como uma rota de escape para células neoplásicas adentrarem à circulação. Células tumorais, também adentram a circulação indiretamente via vasos linfáticos. Essas células precisam sobreviver dentro da circulação para chegar a um novo órgão, podendo extravasar da circulação para o tecido adjacente. Uma vez nesse novo sítio, a célula deve iniciar e manter crescimento para formar a micrometástase pré-angiogênica. Esse crescimento deve ser capaz de sustentar a formação de novos vasos sanguíneos, a fim de formar a neoplasia visível macroscopicamente (CHAMBERS et al., 2002).

Metástases em linfonodos regionais, são um passo inicial da metástase distante e portanto, são consideradas como importante fator prognóstico para o tumor mamário canino. É um critério válido também para o tumor mamário humano. Metástases nos linfonodos são geralmente seguidas por metástases distantes, principalmente em pulmão, o que pode levar à morte do animal (KLOPFLEICH et al., 2010).

2.3. Lecitinas

2.3.1. Histórico

Lecitinas são conhecidas desde o século XIX. Tradicionalmente considera-se que foram descobertas por Stillmark em 1888, na Rússia. Ao observar a toxicidade de sementes de mamona (*Ricinus communis*), ligou essa toxicidade à ocorrência de um fator proteico hemaglutinante. Denominou-o ricina, tornando uma descrição, em plantas, de uma proteína com atividade biológica bem definida (GOLDSTEIN;

HAYES, 1978). Entretanto, Weir Mitchell, já havia encontrado lecitinas em tecido de serpente em 1860 (GABIUS, 2001).

Em 1919, James B. Summer obteve a primeira lecitina na forma cristalizada, a partir de sementes de *Canavalia ensiformes*, a Concanavalina A (ConA). Na década de 1940, Rose M. Reguera e William C. Boyd relataram que certas sementes contêm aglutininas específicas para antígenos dos grupos sanguíneos humanos. Observaram que extratos de *Phaseolus lunatus* (feijão fava) aglutinavam seletivamente eritrócitos do grupo A e descreveram que, dentre extratos de sementes de diferentes espécies, havia diversos com especificidade para grupos sanguíneos particulares (WANG, 2001).

Subsequentemente, as lecitinas foram essenciais na elucidação das bases moleculares de grupos sanguíneos específicos. Recentes avanços na química dos carboidratos e estudos da ligação proteína-ligante mediados por lecitinas são focos de numerosas pesquisas, em particular, sua investigação no papel do reconhecimento celular (AMBROSI et al., 2005).

2.3.2. Definição

Lecitinas são proteínas naturais de origem não imune, que hidrofobicamente se ligam de forma não covalente a carboidratos com características apropriadas (KENNEDY et al., 1995). Esta interação lecitina-açúcar é específica e de alta afinidade, podendo ocorrer com carboidratos localizados nas superfícies celulares, como açúcares livres e, ainda, com a parte glicídica de glicoconjugados extracelulares (LIS e SHARON, 1973; FREED, 1985). Estas proteínas provocam aglutinação de forma seletiva para os diferentes grupos sanguíneos humanos. O termo lecitina prevalece, embora apenas algumas destas tenham capacidade seletiva de hemaglutinação (AMBROSI et al., 2005).

A lecitina é composta por multidomínios complexos, porém a atividade de ligação, geralmente se dá com um módulo designado domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD). CRDs são classificados em diversas famílias estruturalmente distintas, que desempenham funções específicas (DODD e DRICKAMER, 2001). A especificidade de ligação da lecitina a carboidratos é definida por açúcares simples que mais eficientemente inibem a sua ligação (LOTAN et al., 1975). Esta ligação

lectina-açúcar é causada por combinações de hidrogênios da proteína com grupos hidroxilas do açúcar (Figura 1), geralmente incluindo acoplamento de uma face hidrofóbica do açúcar com o lado de aminoácido aromático das cadeias peptídicas (WEIS e DRICKAMER, 1996).

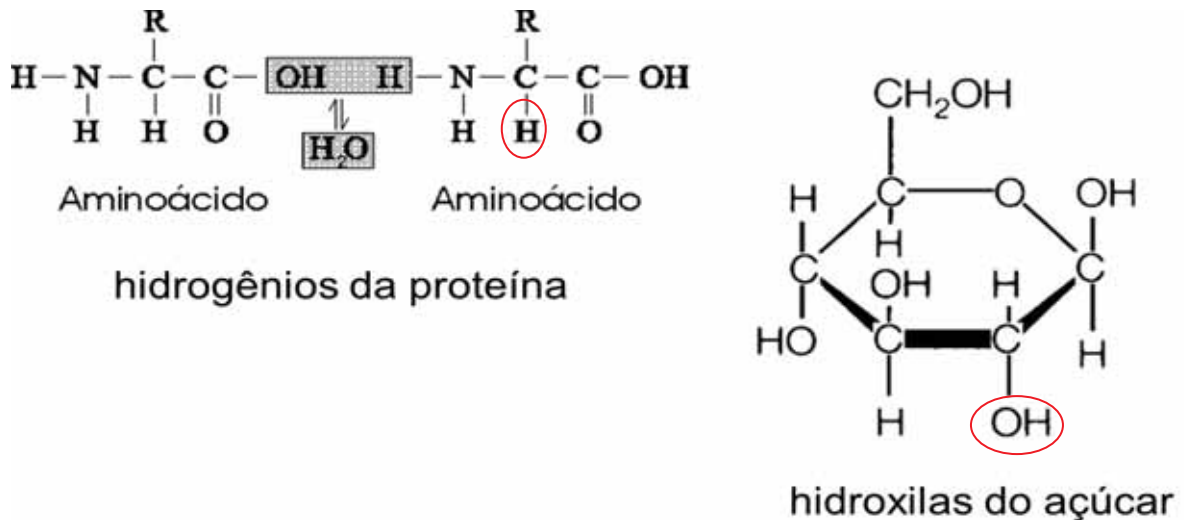


Figura 1. Representação esquemática da ligação lectina-açúcar é causada por combinações de hidrogênios da proteína com grupos hidroxilas do açúcar

Segundo Goldstein et al. (1980), a ligação à lectina se dá por meio de aglutinação celular e/ou precipitação de glicoconjugados, na presença dos sacarídeos complementares apropriados. Os glicoconjugados, que são moléculas ricas em carboidratos, participam de diversos fenômenos celulares, tais como, reconhecimento celular e adesão, inibição de contato e controle de crescimento (YAMAKAWA & NAGI, 1978). Mudanças nos carboidratos da membrana nuclear refletem na formação e diferenciação da membrana celular, que ocorre durante o fluxo dos constituintes do envelope nuclear, através do retículo endoplasmático e complexo de Golgi para a membrana celular (HAKOMORI, 1984; FEIZE; CHILDS, 1985). Atualmente, a visualização dos conjugados de lectinas por fluorescência, enzima, ou substâncias eletro-densas, tem sido utilizada como reagente histoquímico para identificar e localizar resíduos de carboidratos específicos nos tecidos normais e alterados (ALROY et al., 1984 A; ALROY et al., 1984 B). As lectinas desempenham um importante papel nas funções fisiológicas dos animais e a natureza das proteínas está frequentemente alterada em condições patológicas.

Por essa razão, a marcação destas moléculas tem se mostrado uma importante ferramenta no diagnóstico das neoplasias (DAMJANOV, 1987).

2.3.3. Decodificadoras de glicocódigos

A combinação de diferentes moléculas de carboidratos (glicoproteínas e glicolípidos), na superfície da célula, promove a marcação de maneira que a mesma possa ser reconhecida de uma forma particular e ter um percurso definido nos processos de reconhecimento, como: adesão célula-célula, célula-matriz e reconhecimentos específicos da célula por outra célula. Além disso, os carboidratos são reconhecidos como marcadores de diferenciação e como determinantes antigênicos. As lecitinas podem ser consideradas como moléculas decodificadoras de glicocódigos, reconhecendo os açúcares responsáveis pelas funções de adesão, migração ou invasão, uma vez que podem detectar diferenças tênues entre estruturas complexas de carboidratos (NANGIA-MAKKER, 2002).

Desta forma, os glicocódigos têm maior multiplicidade que os códigos inscritos nos nucleotídeos ou aminoácidos que se interconectam linearmente. Quatro aminoácidos diferentes podem formar 24 tetrapeptídeos, enquanto quatro monossacarídeos diferentes podem potencialmente produzir 35.560 tetrassacarídeos diferentes (SMETANA; ANDRÉ, 2007)

As células neoplásicas usam os carboidratos como um mecanismo de escape imunológico. Durante o processo de metástase os carboidratos envolvem-se em interações celulares do tipo: célula tumoral-célula tumoral, célula tumoral-membrana extracelular ou célula tumoral-célula endotelial (NANGIA-MAKKER et al., 2002).

2.3.4. Ocorrência

As lecitinas estão amplamente distribuídas na natureza, pois além de serem detectadas em plantas, especialmente em sementes de leguminosas, já foram isoladas de todas as classes e famílias de seres vivos: bactérias, vírus, fungos, líquens, peixes, moluscos e mamíferos (GABIUS; GABIUS, 1993).

2.3.5. Nomenclatura e classificação

O nome de algumas lecitinas é dado a partir de suas características biológicas. A calreticulina é uma lecitina que se localiza no retículo endoplasmático e na proteína sérica fixadora de manose, seu nome indica sua afinidade e localização (AMBROSI et al., 2005).

Para designar as lecitinas, utilizam-se três letras, as duas primeiras derivam do nome científico ou do nome vulgar em inglês do organismo de origem, a terceira é um “A” que provém do termo “aglutinin”. Se de um mesmo organismo foram isoladas várias lecitinas, agregam-se números ou letras romanas. Como exemplos: RCA-I, primeira lecitina isolada de *Ricinus communis* (mamoneira) e WGA, lecitina isolada de “wheat germ” (gérmen de trigo) (SMETANA; ANDRÉ, 2007).

Muitas destas lecitinas detectadas em células animais podem ser agrupadas em famílias distintas que exibem similaridade quanto às propriedades estruturais e de sequência de aminoácidos em suas cadeias polipeptídicas (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação das lecitinas animais de acordo com a estrutura

| Família de lecitina | Lecitinas conhecidas | Exemplo | Função conhecida |
|---------------------|----------------------|---|---|
| Tipo C | >40 | Selectinas | Migração de leucócitos através do endotélio |
| | | 175 k-Da | Reconhecimento de antígeno e apresentação de galectina-1 |
| Galectina | 15 | Galectina 1 | Pró-apoptótica e interação célula-célula |
| | | Galectina 3 | Antiapoptótica e interação célula-célula e célula-substrato |
| Tipo I | >10 | Singlecs | Interação célula-célula nos sistemas imune e nervoso |
| Tipo P | 2 | 46-kDa manose6-proteína fosfato ligante | Alvo de enzimas lisossomais |
| Pentroxinas | 2 | Proteína C reativa | Proteção imune inata |

(SMETANA; ANDRÉ, 2007)

2.3.6. Funções e utilização

Por existir um grande número de lecitinas, com capacidade de ligação com diferentes carboidratos, estas versáteis moléculas têm sido utilizadas em diversos segmentos da pesquisa biológica, tais como: tipificação de grupos sanguíneos em humanos, agente mitogênico e para detectar alterações durante a proliferação celular (KENNEDY et al., 1995).

A ação das lecitinas depende da conformação estrutural e de seu tamanho. A maioria delas necessita estar ligada a metais iônicos divalentes. Tripsinas ou carboidrases aumentam a atividade das lecitinas por facilitarem a aproximação com seu sítio glicídico ativo. Outras propriedades, tais como, percentuais e sequências de aminoácidos, ponto isoelétrico, peso e forma moleculares são também importantes para compreender seus efeitos (JANZEN et al., 1976; ZHU-SALZMAN; SALZMAN, 2001).

A função das lecitinas na natureza ainda não foi totalmente elucidada. Especula-se que, em um mesmo organismo, as lecitinas possam exercer funções específicas e distintas ou mesmo ter múltiplas ações (JANZEN et al., 1976; ZHU-SALZMAN; SALZMAN, 2001). Os vírus da influenza e do políoma possuem lecitinas que se unem a moléculas de ácido siálico das células animais, permitindo a adesão e posterior ingresso nos tecidos. Bactérias como *Salmonella* sp e *Escherichia coli* possuem lecitinas de superfície que intervêm na patogenicidade por facilitar a adesão aos tecidos. O protozoário *Entamoeba histolytica*, também possui lecitinas que intervêm no reconhecimento de células de mamíferos. No fungo *Dictyostelium discoideum*, foi encontrada uma lecitina relacionada com a diferenciação celular (ESKO, 2009).

2.3.7. Como marcadores de tecidos

As lecitinas podem ser utilizadas para identificar células que são difíceis de diferenciar com técnicas convencionais. Em alguns casos, substituem procedimentos mais complexos e custosos como, por exemplo, a imuno-histoquímica. Permitem que sejam realizados estudo retrospectivos, pois podem ser utilizadas em cortes congelados e amostras fixadas em formol e incluídas em parafina. Possuem nível de especificidade maior que as outras técnicas de coloração utilizadas para identificar carboidratos, como o *Periodic Acid Schiff* e o *Alcian Blue*. Sua especificidade é tão alta quanto a especificidade antígeno-anticorpo, base das técnicas de imuno-histoquímica (Gimeno, 2012, informação pessoal*).

Em cães, estudos utilizando lecitina-histoquímica para identificar alterações celulares neoplásicas, já foram realizados em diversos tecidos, como: próstata (ORGAD et al; 1984), pâncreas (SKUTESKY et al; 1987), células endoteliais cutâneas, linhagem megacariocítica (KOLBATZKY; HERMANNNS, 1993), linfonodos, timo, condrócitos, células espermatogênicas, adrenal, endotélio perianal e endometrial, matriz extracelular de tecidos conectivos, leptomeninge (UCHIDA et al; 2001) e ducto renal (KOBAYASHI et al; 2008). Poucos estudos, no entanto, foram realizados com neoplasias mamárias (EJURI, et al., 1999) e aparentemente nenhum até o presente momento que comparasse neoplasias primárias e metástases.

pesquisas têm sido realizadas, ainda, com a utilização da lecitina como forma avançada de transporte de fármacos em um processo denominado latenciação, que utiliza modificação molecular. Robinson et al. (2004) desenvolveram um sistema, a que chamaram de LEAPT (*Lectin-Directed Enzyme-Activated Prodrug Therapy*). Trata-se de um sistema de liberação bipartite, que explora o sistema endógeno de ligações de carboidrato à lecitina para internalizar o conjugado de enzima-glicosilada, por endocitose, em células específicas e pré-determinadas. Em seguida, é administrado o pró-fármaco (conjugado substrato-fármaco), que é ativado pela enzima pré-liberada no sítio de ação desejado.

3. Objetivo

Investigar a formação de glicoconjugados das lecitinas UEA, PNA , HPA e DBA em tecidos de glândula mamária normal, neoplasias mamárias e metástases de neoplasias mamárias, com o objetivo de verificar sua possível utilidade na avaliação diagnóstica de diferentes tipos histológicos de neoplasias mamárias caninas.

4. Material e métodos

4.1. Grupos experimentais

Foram utilizadas 125 amostras de tecidos, onde destas, sete eram mamas de cadelas sem histórico de neoplasia (controle). Para o conjunto de neoplasias mamárias e metástases foram utilizadas 118 amostras selecionadas do arquivo do Departamento de Patologia Veterinária (FCAV-UNESP, Jaboticabal). Todas as amostras estavam incluídas em parafina.

O grau de malignidade em tumores de mama de cadelas foi proposto por Misdorp (1999), associando as formações de túbulos, hipercromatismo, mitoses e pleomorfismo nuclear, de acordo com a Tabela 2:

As neoplasias foram classificadas de acordo com os critérios do Consenso em Neoplasias Mamárias (CASSALI et al. 2011). Assim, foram compostos os grupos experimentais conforme apresentado na Tabela 3:

Tabela 2. Características utilizadas para classificação dos tumores mamários das cadelas conforme o grau de malignidade.

| Características | Escores |
|--|----------------------------|
| 1. <i>Formação de túbulo</i> : um ponto para formação de túbulos bem marcada; três pontos para pouco ou nenhum túbulo | 1 2 3 |
| 2. <i>Hipercromatismo e mitoses</i> : um ponto se uma figura mitótica é vista ocasionalmente; dois pontos se duas ou três figuras são vistas; três pontos se o número é alto | 1 2 3 |
| 3. <i>Tamanho e forma irregular do núcleo</i> : um ponto se os núcleos são proporcionais em tamanho e forma, três pontos quando o pleomorfismo é marcado | 1 2 3 |
| Total do escore | Grau de malignidade |
| 3-5 | I |
| 6-7 | II |
| 8-9 | III |

Fonte: Misdorp et al., 1999

Tabela 3. Número de amostras de mama normal, neoplasias mamárias caninas classificadas por tipo e grau histológico e metástases.

| Grupo | Nº de amostras | Tipo histológico |
|-------|----------------|---|
| 1 | 7 | Grupo controle (Mamas sem neoplasia) |
| 2 | 10 | Adenomas |
| 3 | 10 | Carcinoma mamário padrão sólido grau II |
| 4 | 9 | Carcinoma mamário padrão sólido grau III |
| 5 | 7 | Carcinoma mamário padrão papilar grau I |
| 6 | 8 | Carcinoma mamário padrão papilar grau II |
| 7 | 7 | Carcinoma mamário padrão papilar grau III |
| 8 | 8 | Carcinoma mamário padrão tubular grau I |
| 9 | 8 | Carcinoma mamário padrão tubular grau II |
| 10 | 10 | Carcinoma mamário padrão tubular grau III |
| 11 | 9 | Carcinoma em tumor misto grau I |
| 12 | 9 | Carcinoma em tumor misto grau II |
| 13 | 10 | Carcinoma em tumor misto grau III |
| 14 | 6 | Carcinossarcomas |
| 15 | 10 | Metástases |

4.2. Lecitina-histoquímica

Para a técnica de lecitina-histoquímica foram utilizadas as lecitinas biotiniladas UEA- *Ulex europaeus* (carqueja), PNA- *Arachis hypogaea* (amendoim), HPA- *Helix pomatia* (caracol romano) e DBA- *Dolichos biflorus* (faveira), de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4: Lecitinas biotiniladas utilizadas em tecidos de neoplasias mamárias, tecidos mamários normais e metástases com seus sítios de ligação específico.

| Lecitinas biotiniladas | Sítio de ligação | Diluições | Procedência |
|------------------------|-------------------------------------|-----------|----------------------|
| UEA | A-L-fucose | 1:200 | EY lab ref: 28091-7 |
| PNA | Galactosamina- β | 1:100 | EY lab ref: 2882-2 |
| HPA | N – acetilgalactosamina | 1:400 | EY lab ref: 280823-2 |
| DBA | α -N- acetilgalactosamina | 1:400 | Vector ref: 280823-1 |

Todas as amostras haviam sido fixadas em solução de formol a 10%, tamponado com fosfatos, (pH 7,4) e processados rotineiramente até a inclusão em parafina. Cortes seriados de 4 μ m de cada amostra foram feitos em micrótomo Jung *autocut* 2055 e posteriormente, corados com Hematoxilina e Eosina ou submetidos à lecitina-histoquímica.

Os cortes de tecido com 4 μ m, foram desparafinizados em xilol, reidratados em álcoois decrescentes e, então, incubados por trinta minutos em uma solução a 8% de peróxido de hidrogênio, em metanol absoluto, para bloqueio da peroxidase endógena. Na sequência, foi realizado tratamento pelo calor em panela de vapor (*steamer*, Walita), utilizando-se a solução de citrato de sódio (pH 6,0). A seguir, os cortes foram tratados com solução bloqueadora de reação inespecífica (*protein block serum-free* – número de catálogo X0909 - DAKO Corp.). Ato contínuo, os cortes foram recobertos com as lecitinas biotiniladas na diluição ótima previamente padronizada e incubados a 4° C por 18 h. Em seguida, procedeu-se então a incubação com o complexo streptoavidina/peroxidase, por 30 min (Kit DAKO L SAB+ System número de catálogo K0690), à temperatura ambiente. A reação foi revelada pelo substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB liquido DAKO número de

catálogo K3466). A incubação com este substrato foi de aproximadamente 5min. Seguiram-se a lavagem das preparações em água destilada e a contracoloração com hematoxilina de Harris (1-2 minutos). Entre todos esses passos, foi realizada a lavagem das lâminas por três vezes em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) a 0,01M, pH 7,2, por 5min. Ao final as lâminas passaram pela bateria crescente de álcoois e xilóis, foram montadas com bálsamo do Canadá e observadas em microscopia de luz.

Como controle negativo, substituiu-se a solução de lecitina marcada por diluente de anticorpo (Antibody Diluent with Background Reducing Components, ref. S3022, DAKO) em todas as reações lecitina-histoquímicas.

4.3. Avaliação do tipo celular, distribuição da marcação e contagem das células marcadas

A observação das células foi feita em microscópio de luz binocular acoplado em equipamento para fotomicrografia digital (Nikon E200). Antes da contagem, foram analisados o tipo celular marcado e a distribuição da marcação. Para a quantificação da frequência da marcação, foram aleatoriamente selecionados quatro campos por corte e foi contado um total de 100 células entre as marcadas e as não marcadas, utilizando-se objetiva de 40x. Os resultados foram expressos em porcentagem de células marcadas.

4.4. Análise estatística

Foram realizadas comparações entre todas as lecitinas (UEA, PNA, HPA e DBA) em cada tipo histológico (Grupos 1 ao 15). Para cada lecitina, foram comparados, todos os tipos histológicos (Grupos 1 ao 15) entre si.

Os resultados foram submetidos às análises de variância e à comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (SNEDECOR e COCHRAN, 1974).

5. Resultados

A ligação com o epitélio normal (glândula mamária sem neoplasia) foi relativamente uniforme para todas as lecitinas utilizadas no presente estudo, onde foi observada marcação predominantemente em membrana e citoplasma de células epiteliais. A ligação das mesmas lecitinas, no entanto, apresentou-se bastante variada para as células neoplásicas, variando entre membrana, citoplasma e núcleo de células epiteliais, células inflamatórias, células endoteliais, fibroblastos, células mioepiteliais e condrócitos. Em foco metastático, a marcação foi predominante em membrana e citoplasma de células epiteliais, núcleo, membrana e citoplasma de células inflamatórias (Tabela 5).

Tabela 5. Estruturas celulares marcadas pelas Lecitinas UEA, DBA, HPA E PNA, de acordo com o tipo histológico de mama canina. CE= Células Epiteliais; CI= Células Inflamatórias; CEn= Células Endoteliais; FB= Fibroblastos; MP= Células mioepiteliais; CD= Condrócitos.

| | | UEA | | | DBA | | | HPA | | | PNA | | |
|------------|-----|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|
| | | M | C | N | M | C | N | M | C | N | M | C | N |
| Controle | CE | + | + | 0 | + | + | 0 | + | + | 0 | + | + | 0 |
| | CI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | CEn | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | FB | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | MP | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | CD | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Neoplasia | CE | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | CI | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | CEn | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | FB | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | MP | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | CD | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Mestástase | CE | + | + | 0 | + | + | 0 | + | + | 0 | + | + | 0 |
| | CI | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | CEn | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | FB | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | MP | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | CD | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Nas comparações entre as lecitinas e os tipos histológico, não foi observado diferença significativa entre nenhuma delas no grupo controle (Figura 2A). No grupo adenoma, observou-se aumento da marcação na lecitina HPA em relação à PNA (Figura 2B). No grupo carcinoma sólido grau II, foi observado maior marcação da lecitina DBA, diferindo significativamente de UEA e PNA, nesta análise, ainda

observou-se que UEA diferiu significativamente de PNA (Figura 2C). No grupo carcinoma sólido grau III, não foi observado diferença significativa (Figura 2D).

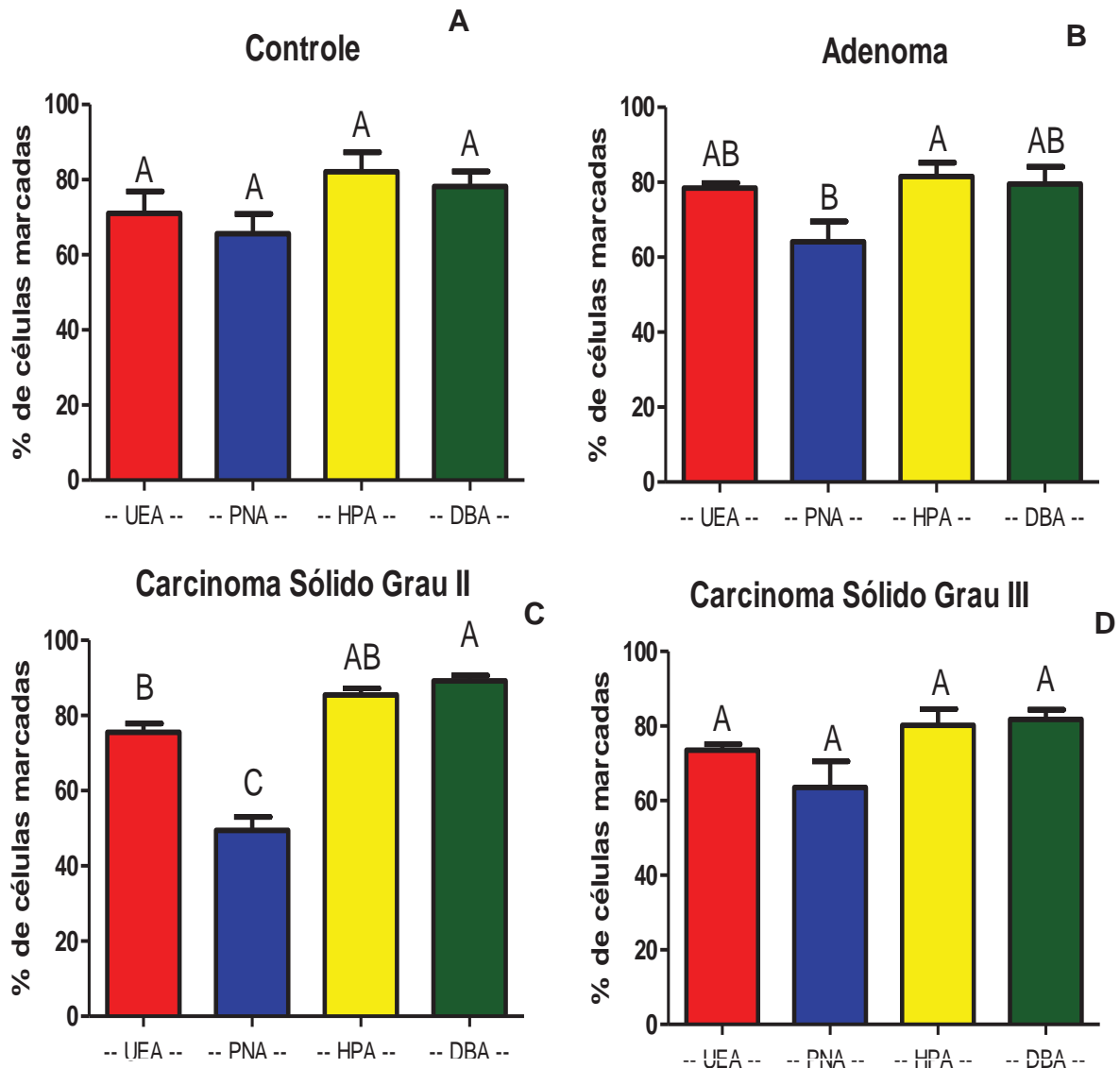


Figura 2. Médias do percentual de células marcadas (\pm desvio padrão) pelas lectinas: *Ulex europaeus* (UEA), *Arachis hypogaea* (PNA), *Helix pomatia* (HPA) e *Dolichos biflorus* (DBA) nos grupos: (A) controle, (n=7), (B) adenoma, (n=10), (C) carcinoma sólido grau II, (n=10) e (D) carcinoma sólido grau III, (n=7), seguidas de pelo menos uma letra em comum não diferem pelo teste de Tuckey ($p > 0.05$).

Para o grupo carcinoma papilar grau I, foi observada maior marcação da lectina HPA, que diferiu significativamente de PNA e UEA (Figura 3A). No carcinoma papilar grau II, observou-se maior marcação de PNA que diferiu significativamente de UEA (Figura 3B). No grupo carcinoma papilar grau III, não foi observado

diferença significativa (Figura 3C). No grupo carcinoma tubular grau I, não foi observado diferença significativa (Figura 3D).

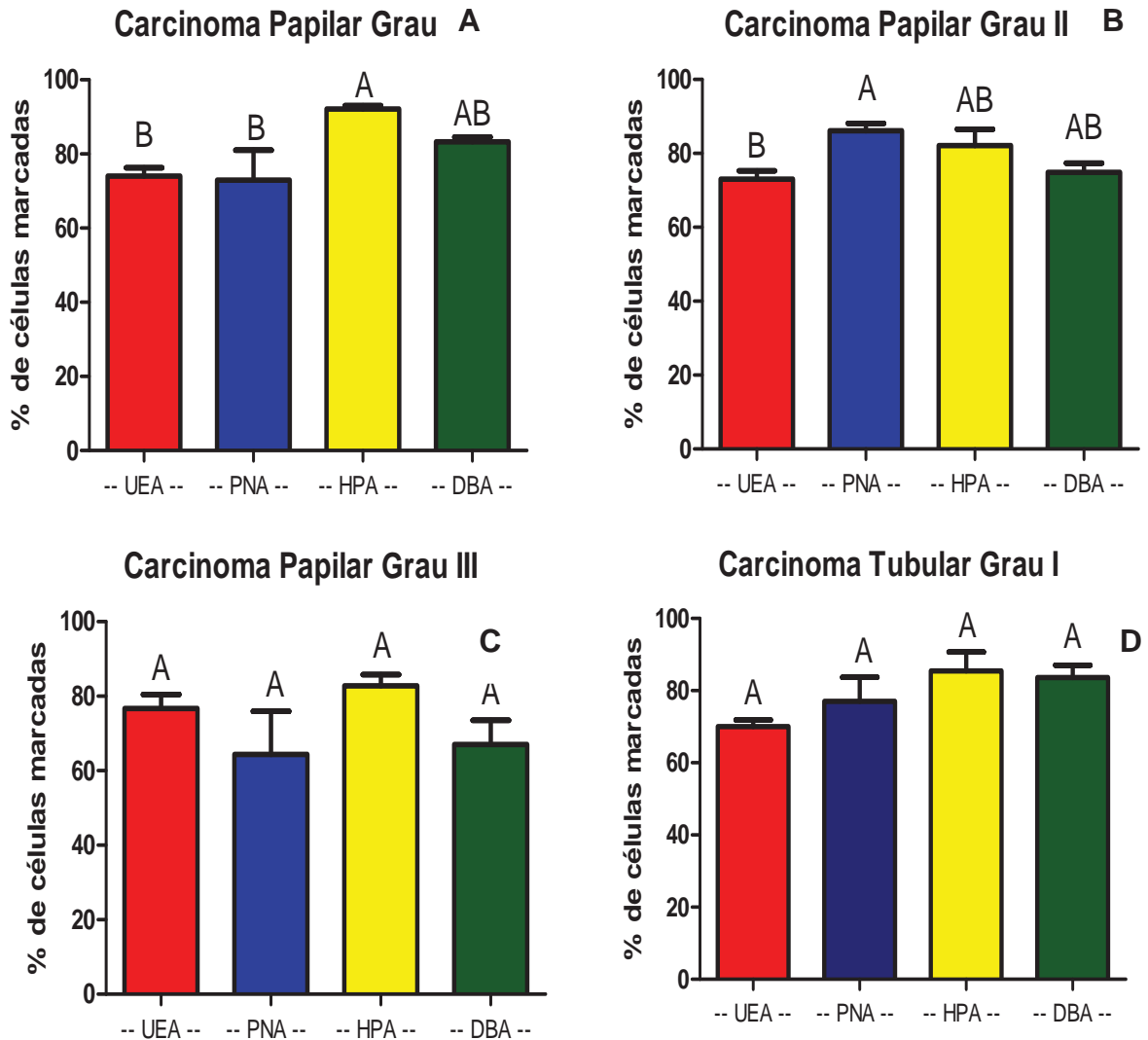


Figura 3. Médias do percentual de células marcadas (\pm desvio padrão) pelas lectinas: *Ulex europaeus* (UEA), *Arachis hypogaea* (PNA), *Helix pomatia* (HPA) e *Dolichos biflorus* (DBA) nos grupos: (A) carcinoma papilar grau I, (n=7), (B) carcinoma papilar grau II, (n=8), (C) carcinoma papilar grau III, (n=7) e (D) carcinoma tubular grau I, (n=8), seguidas de pelo menos por uma letra em comum não diferem pelo teste de Tuckey ($p>0,05$).

No grupo carcinoma tubular grau II, foi observado maior marcação das lecitinas PNA e DBA, que diferiram significativamente de UEA (Figura 4A). No grupo carcinoma tubular grau III, observou-se maior marcação da lecitina HPA que diferiu significativamente de PNA (Figura 4B). No grupo carcinoma em tumor misto grau I, não foi observado diferença significativa (Figura 4C). No grupo carcinoma em tumor misto grau II, observou-se uma maior marcação das lecitinas HPA e DBA, que diferiram significativamente de PNA (Figura 4D).

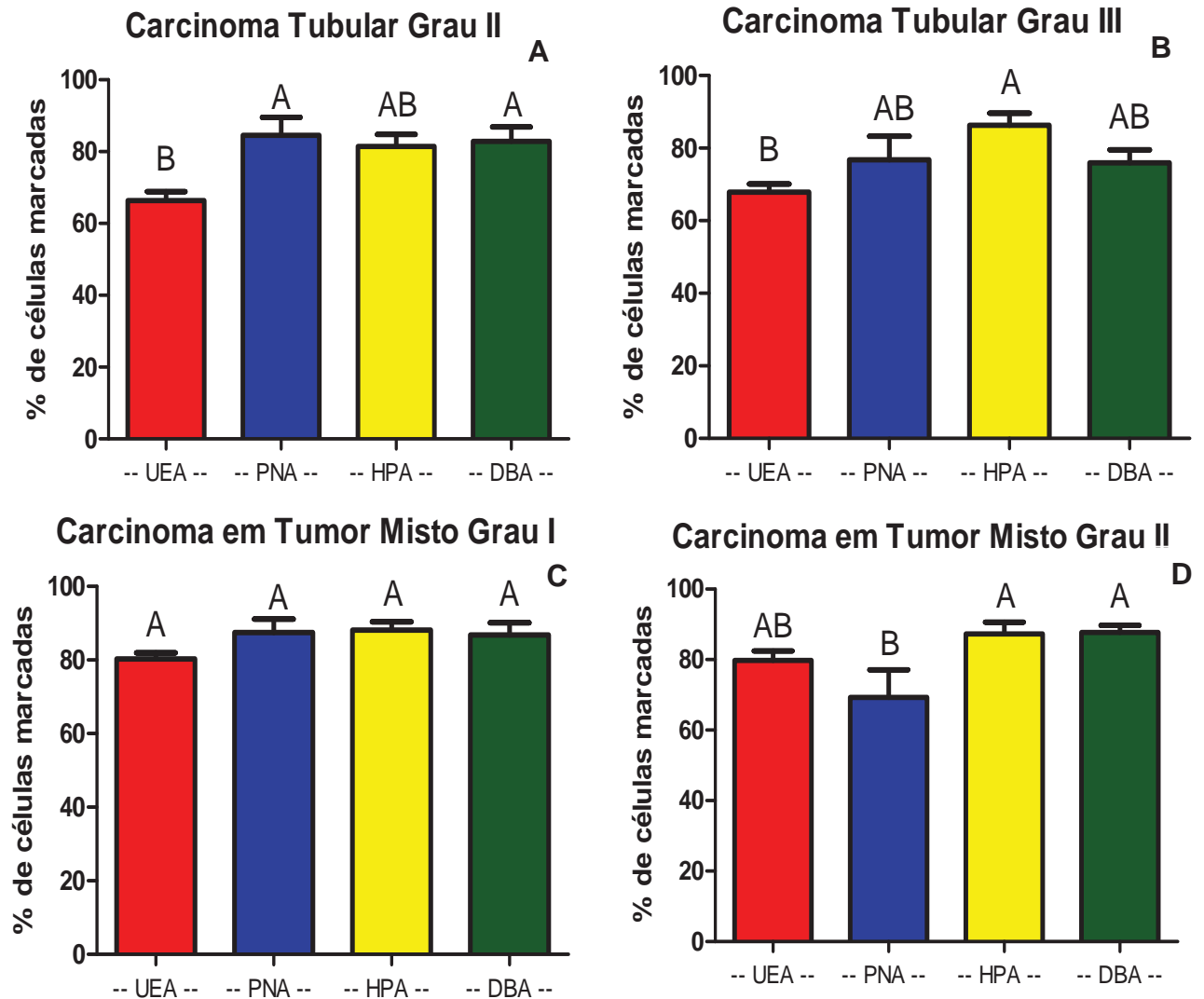


Figura 4. Médias do percentual de células marcadas (\pm desvio padrão) pelas lecitinas: *Ulex europaeus* (UEA), *Arachis hypogaea* (PNA), *Helix pomatia* (HPA) e *Dolichos biflorus* (DBA) nos grupos: (A) carcinoma tubular grau II, (n=8), (B) carcinoma tubular grau III, (n=10), (C) carcinoma em tumor misto grau I, (n=9) e (D) carcinoma em tumor misto grau II, (n=9), seguidas de pelo menos por uma letra em comum não diferem pelo teste de Tuckey ($p>0,05$).

No grupo carcinoma em tumor misto grau III, não foi observado diferença significativa (Figura 5A). No grupo carcinosarcoma, a lecitina DBA apresentou maior marcação, diferindo significativamente de HPA e PNA (Figura 5B). No grupo metástase não foi observada diferença significativa (Figura 5C).

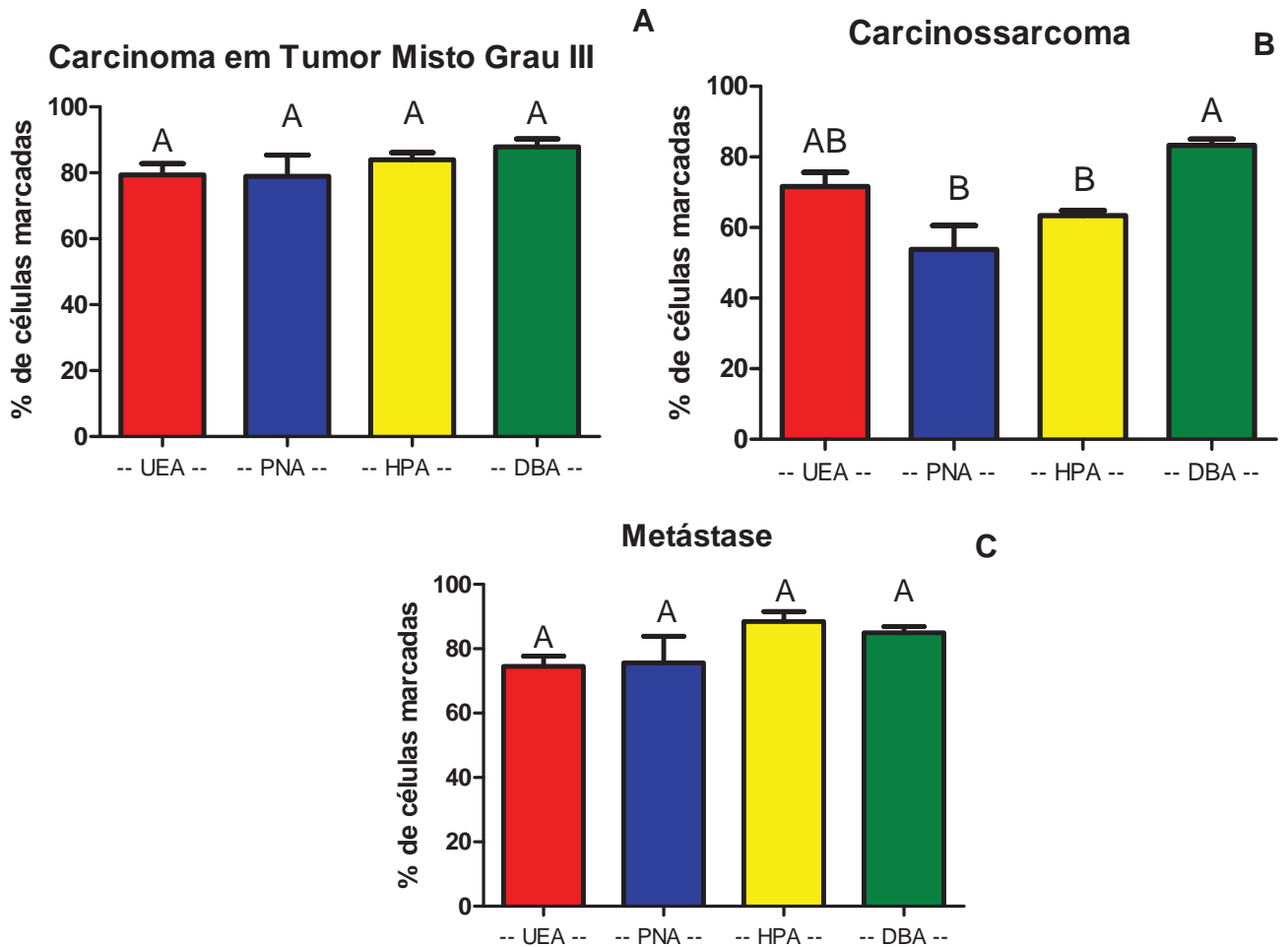


Figura 5. Médias do percentual de células marcadas (\pm desvio padrão) pelas lecitinas: *Ulex europaeus* (UEA), *Arachis hypogaea* (PNA), *Helix pomatia* (HPA) e *Dolichos biflorus* (DBA) nos grupos: (A) carcinoma em tumor misto grau III, (n=10), (B) carcinosarcoma, (n=10), (C) metástase, (n=10), seguidas de pelo menos uma letra em comum não diferem pelo teste de Tuckey ($p > 0,05$).

Na análise comparativa entre os grupos histológicos, pôde-se observar que com a lecitina UEA, não foi verificada diferença estatística entre nenhum tipo histológico (Figuras 7, 8, 9, 10 e Tabela 5). Na lecitina PNA, foi observada menor marcação no grupo carcinoma sólido grau II, que diferiu significativamente dos grupos carcinoma papilar grau II, carcinomas tubulares graus I, II e III, carcinoma em

tumor misto grau I e metástase. O grupo carcinoma em tumor misto grau I, diferiu significativamente também do carcinosarcoma (Figuras 14, 15, 16 e Tabela 5). Na lecitina HPA, foi observado menor marcação do grupo carcinosarcoma, diferindo significativamente dos grupos: controle, carcinoma sólido grau II, carcinomas papilares graus I, II e III, carcinomas tubulares graus I e III, carcinomas em tumores mistos graus I, II e III (Figuras 17, 18, 19, 20 e Tabela 5). Na lecitina DBA, foi observada menor marcação ($p < 0,05$) no grupo carcinoma papilar grau III em relação aos dos grupos carcinomas sólidos graus II e III, carcinoma papilar grau I, carcinomas tubulares graus I e II, carcinomas em tumores mistos graus I, II e III, carcinosarcoma e metástase (Figuras 11, 12, 13 e Tabela 5).

Tabela 6. Valores médios¹ e desvio padrão² das lecitinas *Ulex europaeus*(UEA), *Arachis hypogaea* (PNA), *Helix pomatia* (HPA) e *Dolichos biflorus* (DBA), comparadas entre as classificações histopatológicas.

| Classificação | Lecitinas | | | | | | | |
|---------------|------------|---|------------|-----|-------------|----|---------|----|
| | UEA | | PNA | | HPA | | DBA | |
| Controle | 75.3 ± 7.4 | A | 65.6 ± 11 | ABC | 82 ± 5 | A | 78 ± 9 | AB |
| ADN | 78.4 ± 10 | A | 71.8 ± 21 | ABC | 81.5 ± 34.4 | AB | 79 ± 11 | AB |
| CS II | 75.5 ± 7.8 | A | 49.4 ± 12 | C | 85.4 ± 9 | A | 89 ± 4 | A |
| CS III | 73.5 ± 5.2 | A | 63.5 ± 17 | ABC | 80.2 ± 7 | AB | 81 ± 7 | A |
| CP I | 74 ± 8.7 | A | 72.9 ± 4.3 | ABC | 92 ± 4 | A | 83 ± 5 | A |
| CP II | 73 ± 12 | A | 86 ± 5.7 | AB | 86 ± 5 | A | 74 ± 8 | AB |
| CP III | 76.7 ± 9.6 | A | 64.3 ± 8.9 | ABC | 82 ± 5 | A | 67 ± 9 | B |
| CT I | 69 ± 8.3 | A | 77 ± 8.6 | AB | 85 ± 12 | A | 85 ± 5 | A |
| CT II | 66.4 ± 8.6 | A | 84.5 ± 12 | AB | 81 ± 5 | AB | 82 ± 4 | A |
| CT III | 67.8 ± 8.3 | A | 76.7 ± 12 | AB | 86 ± 10 | A | 75 ± 7 | AB |
| CTM I | 74.4 ± 12 | A | 84.5 ± 11 | A | 88 ± 4 | A | 86 ± 6 | A |
| CTM II | 77.5 ± 5.5 | A | 64.7 ± 19 | ABC | 87 ± 5 | A | 88 ± 7 | A |
| CTM III | 79.4 ± 5,5 | A | 69.7 ± 17 | AB | 83 ± 7 | A | 87 ± 5 | A |
| CARCINOS | 71.6 ± 7.3 | A | 53.8 ± 19 | BC | 63 ± 22 | B | 83 ± 5 | A |
| MET | 74.5 ± 7.4 | A | 79.2 ± 13 | AB | 88 ± 4 | A | 84 ± 4 | A |

¹ Médias (n=125) seguidas de pelo menos uma letra em comum na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

² Desvio padrão comparados entre as classificações histopatológicas;

³ Controle (C); Adenoma (ADN); Carcinoma Sólido grau I (CS II); Carcinoma Sólido grau III (CS III); Carcinoma Papilar grau I (CP I); Carcinoma Papilar grau II (CP II); Carcinoma Papilar grau III (CP III); Carcinoma Tubular grau I (CT I); Carcinoma Tubular grau II (CT II); Carcinoma Tubular grau III (CT III); Carcinoma em Tumor Misto grau I (CTM I); Carcinoma em Tumor Misto grau II (CTM II); Carcinoma em Tumor Misto grau III; (CTM III); Carcinosarcoma (CARCINOS) e Metástase (MET)

6. Discussão

No presente estudo, avaliou-se a detecção de conjugados das lecitinas UEA, PNA, HPA e DBA em mama normal, neoplasias mamárias classificadas e graduadas de acordo com o Consenso em Neoplasias Mamárias (CASSALI et al., 2011) e em metástases de neoplasias mamárias. A gradação histológica é controversa, segundo Gilbertson et al. (1983), graduar uma neoplasia é uma das informações mais importantes relacionadas ao tratamento para o veterinário clínico. Sem o grau histológico a comparação entre resultados se torna difícil e praticamente impossível de obter conclusões sobre as características biológicas dos diferentes tipos de carcinomas mamários. No entanto, num estudo realizado por Gerlinger et al. (2012), foram coletadas amostras de várias regiões de tumores de quatro pacientes com neoplasia renal e avaliados mutação e padrão de atividade genética e estrutural dos cromossomos. O tumor principal revelou-se amplamente variado. Apenas um terço das mutações revelou-se comuns a todas as 14 amostras e um quarto delas, foram encontradas em apenas uma amostra. Resultado que ilustra a diversidade presente em cada tumor. A conclusão foi de que a análise histopatológica representa uma visão local de uma paisagem ampla, uma vez que em diferentes regiões do tumor, podem ser encontradas características associadas a prognósticos bons e ruins.

Com relação a ligação de lecitinas às células epiteliais, diversos autores já descreveram órgãos, espécies e idades específicas (COOPER, 1982; FISCHER et al., 1984; KIVELA, 1987; MOORE, 1988; SKTELSKY, 1987). Estas diferenças estão diretamente ligadas às diferentes técnicas utilizadas (tecido congelado, tecido parafinado, técnica de fluorescência, métodos diretos e indiretos), que variam em habilidade e sensibilidade de reconhecimento de lecitinas. Por exemplo, a intensidade de ligação de SBA e Con A, em tonsilas humanas hiperplásicas, reduz em tecido parafinado quando comparado ao congelado. Em tecidos parafinados, só é possível a fraca marcação de células endoteliais de pequenos vasos e não é possível a marcação das mesmas em artérias e veias. Além disso, para conclusões bioquímicas e estruturais, deve-se ter em mente que as lecitinas são definidas por especificidade de ligação a monossacarídeos definidos por teste de inibição de hapteno. Torna-se evidente que a especificidade de lecitinas é muito mais evidente

para oligossacarídeos que monossacarídeos, isto pode explicar, por que, em muitos estudos, lecitinas com a mesma especificidade de monossacarídeos, apresentam diferentes padrões de ligação.

A ligação com o epitélio normal (glândula mamária sem neoplasia) foi relativamente uniforme para todas as lecitinas utilizadas no presente estudo, onde foi observada marcação predominantemente em membrana e citoplasma de células epiteliais. A ligação das mesmas lecitinas, no entanto, apresentou-se bastante variada para as células neoplásicas, variando entre membrana, citoplasma e núcleo de células epiteliais, células inflamatórias, células endoteliais, fibroblastos, células mioepiteliais e condrócitos; refletindo a heterogeneidade destas células e os vários graus de diferenciação das mesmas em diferentes tumores, bem como num mesmo tumor. Resultado semelhante ao encontrado por Augustin et al. (1990) ao avaliar a caracterização fenotípica de células endoteliais com lecitina-histoquímica.

A marcação de receptores de lecitina foi nítida, não havendo dúvidas a respeito do que estava fortemente marcado e não marcado (figura 6).

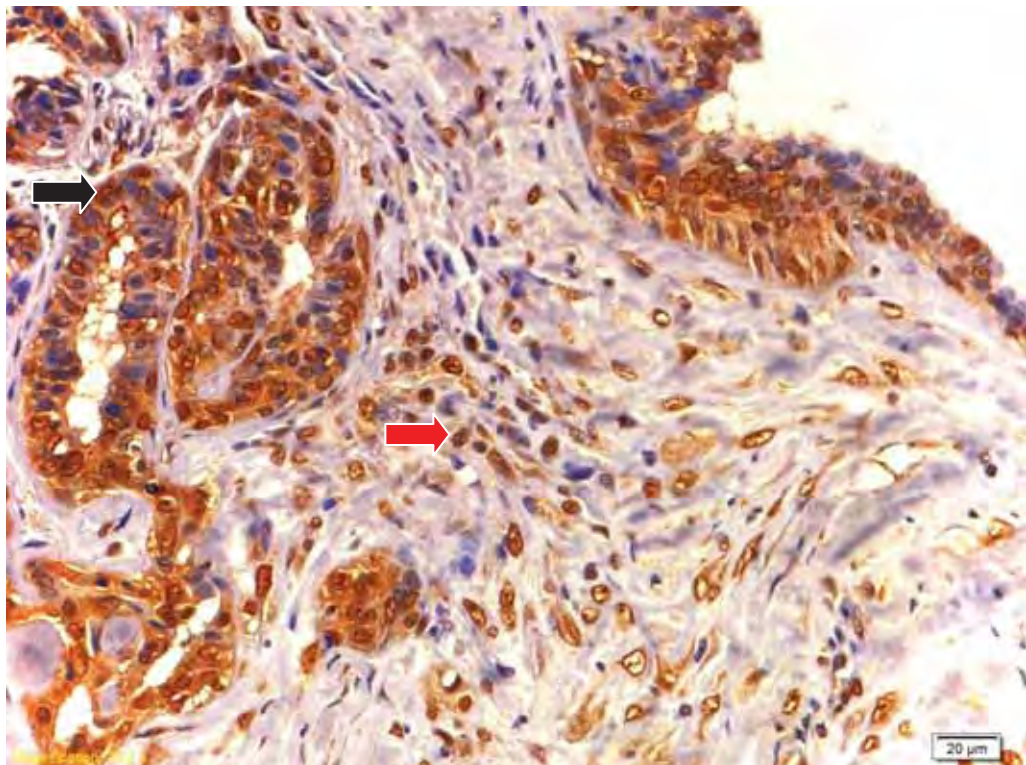


Figura 6. Fotomicrografia de carcinoma tunular grau II em cadela. Observar marcação de receptores da lecitina DBA no citoplasma de células epiteliais (seta preta) e marcação de núcleo de tecido conjuntivo (seta vermelha). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x.

Nos tecidos normais e neoplásicos, observou-se um padrão de coloração intensa e distribuído difusamente. Devido à intensidade de coloração observada, optou-se por uma avaliação semi-quantitativa (estabelecimento de percentual de células marcadas). Esse reforço de expressão de glicoconjugados não é necessariamente devido à biossíntese elevada, mas poderia também refletir a síntese incompleta de cadeia de carboidratos. No foco metastático observou-se menor quantidade de marcação para todas as lecitinas, o que pode ser devido a perda de expressão de (GalNac) N-acetilgalactosamina (HPA), (α -GalNac) α -N-acetilgalactosamina (DBA), (1-3 GalNa) galactose β (PNA) e α fucose (UEA), perdas estas, provavelmente ligadas as mudanças durante o processo de metastatização. O processo metastático consiste em uma série de passos, uma característica comum, é que os passos exigem interações adesivas, muitos destes mediados por glicanos de superfície celular e suas interações com proteínas de ligação de carboidratos (lectinas). Glicanos são construídos por enzimas glicosiltransferase em reações de glicosilação. A glicosilação celular é um evento fundamental e tem sido demonstrado que orchestra os principais processos biológicos, incluindo a comunicação célula-célula, sinalização, transdução, dobramento de proteínas e estabilidade (VARKI, 1993; DWEK, 1995; WELLS et al, 2001). Em células de mamíferos, a transformação oncogênica é muitas vezes acompanhada por um padrão de glicosilação alterada de proteínas e lipídios e estes parecem ter implicações funcionais em potencializar a disseminação metastática de tumores (HAKOMORI, 1996). O grupo metastático, no entanto, não apresentou diferença significativa para nenhuma das lecitinas testadas.

A glicosilação alterada das proteínas em células neoplásicas é um dos processos responsáveis por anaplasia, invasão e potencial metastático. A capacidade das lecitinas de se ligarem seletivamente a carboidratos, faz desta proteína um marcador diferenciado para o estudo de células neoplásicas e metastáticas (ARABI et al., 2010).

A lecitina *Ulex europaeus* (UEA), derivada da carqueja, se liga especificamente à α -L-fucose e tem sido utilizada como marcador vascular em tumores humanos, entretanto, a mesma é referida como um marcador pouco específico (ORDOFIEZ; BATSAKIS, 1984; PARUMS et al., 1990). Desta maneira, O

presente estudo está de acordo com os relatos anteriores, não foi verificada diferença significativa entre os tipos histológicos dos tumores mamários caninos. E em desacordo com Castagnaro & Canese, (1991), que não observaram marcação de UEA em nenhum tipo histológico ao avaliaram a correlação entre expressão de glicoconjugados celulares e maturação escamosa ao utilizarem pele de cinco cães machos sem histórico de neoplasia, cinquenta casos de carcinoma espinocelular, cinco adenocarcinomas hepatóides perianais e quarenta carcinomas mamários sólidos, com e sem evidência de metaplasia escamosa.

A lecitina *Arachis hypogaea* (PNA) derivada do amendoim, se liga especificamente a Gal- β - (1-3 GalNac). Na lecitina PNA, foi observada menor marcação do grupo carcinoma sólido grau II, que diferiu significativamente de outros tipos histológicos. A marcação dos carcinomas sólidos se deu predominantemente em membrana e citoplasma de células epiteliais. O carcinoma sólido é um tipo de carcinoma comum em cadelas, sendo provavelmente uma forma mais avançada que os outros tipos, visto que é mais frequentemente observado quando os tumores se desenvolvem por longos períodos de tempo sem intervenção cirúrgica. Microscopicamente, observa-se uma proliferação de células epiteliais em arranjos sólidos, formando cordões, lençóis ou agrupamentos (CASSALI et al., 2011). Resultados semelhantes foram encontrados por Castagnaro & Canese, (1991), que observaram em carcinomas mamários sólidos de cadelas, marcação epitelial citoplasmática variando de moderada a intensa. O presente estudo obteve resultados diferentes de Skultesky et. al., que ao avaliarem pâncreas normais, com nódulos regenerativos e neoplasias de cães e gatos com PNA, não observaram diferenças de coloração entre os tipos celulares avaliados.

A lecitina de caracol romano, *Helix pomatia Agglutinin* (HPA), se liga especificamente a N-acetilgalactosamina (GalNac). No presente estudo, observou-se que quando comparados os tipos histológicos entre si, HPA apresentou menor marcação no grupo carcinossarcoma, diferindo significativamente dos demais. O carcinossarcoma é um padrão histológico caracterizado por apresentar indiferenciação tanto no componente epitelial (carcinoma) como no mesenquimal (sarcoma) e está relacionado com pobre prognóstico (CASSALI et al., 2011). Desta forma, nossos resultados estão de acordo com o estudo de Burchel et al. (2001),

que mostraram que as propriedades de marcação de lecitina em células neoplásicas, especialmente em linhagens invasivas e metastáticas, como relevantes para avaliar alterações anaplásicas, refletindo o comportamento biológico diferente destes tipos celulares. Futokomi et al. (1991), indicaram que as alterações anaplásicas e as propriedades de marcação são alteradas simultaneamente.

A lecitina *Dolichos biflorus* (DBA), derivada da faveira, se liga especificamente a α -N-acetilgalactosamina (α -GalNac). Quando avaliada a marcação da lecitina DBA entre todos os tipos histológicos, observou-se menor marcação do grupo carcinoma papilar grau III, que diferiu significativamente dos demais tipos histológicos. Carcinomas papilares, por definição apresentam proliferação de células epiteliais em padrão papilífero ou arbóreo com um estroma fibrovascular central (CASSALI et al., 2011). Sams et al. (1990), ao avaliarem anormalidades em marcações de lecitina em polipose familiar e neoplasia não poliposa colo-retal hereditária em humanos, também observaram redução significativa da marcação de DBA em tecidos neoplásicos. Atribuindo a diminuição à falha na síntese de oligossacarídeos longos, de maneira que restassem apenas cadeias mais curtas que não terminavam com α -GalNac.

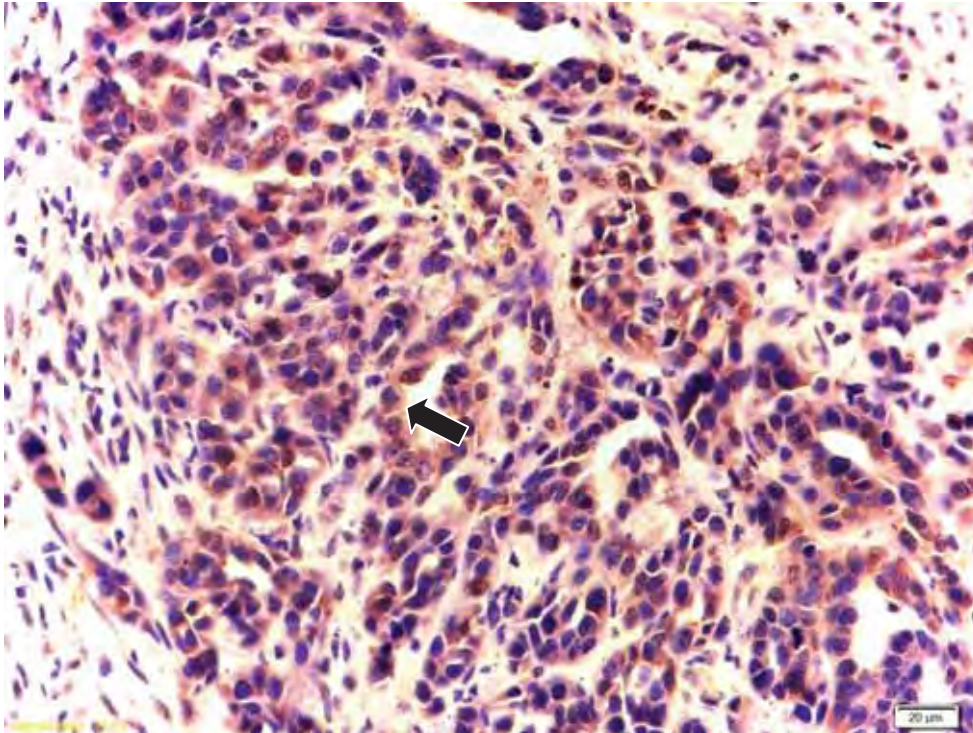


Figura 7. Fotomicrografia de carcinoma sólido grau II em cadela. Observar marcação de receptores da lecitina UEA no citoplasma de células epiteliais (seta preta). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x.

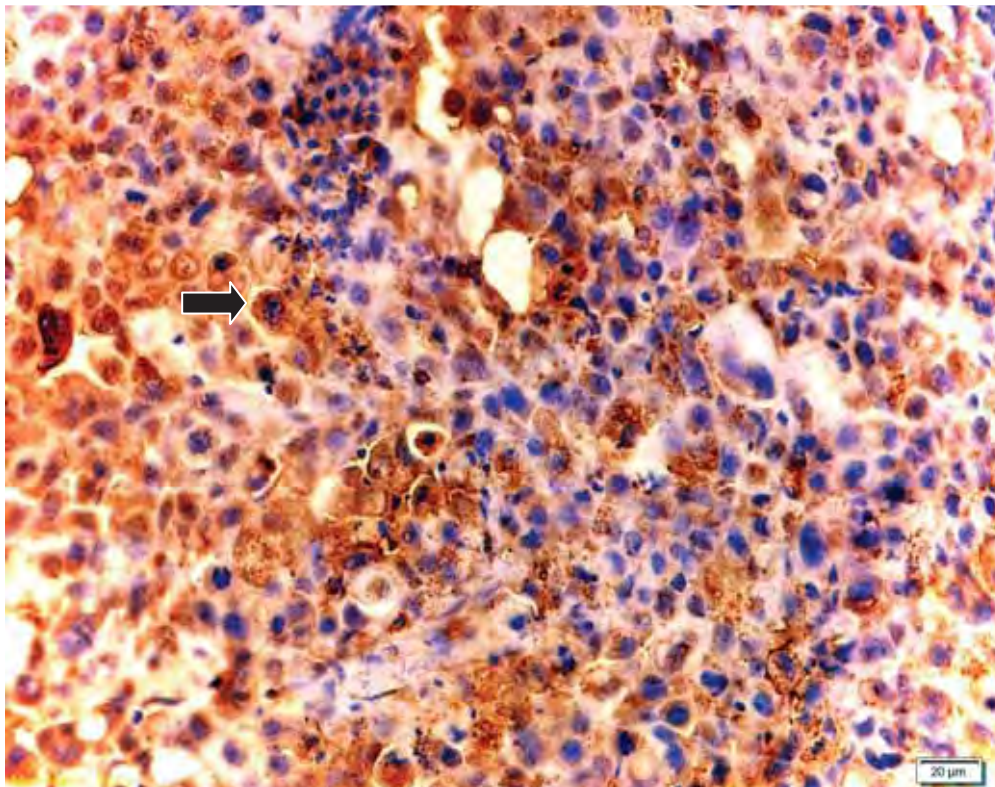


Figura 8. Fotomicrografia de neoplasia mamária canina metastática em linfonodo. Observar marcação de receptores da lecitina UEA no citoplasma de células epiteliais (seta preta). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x.

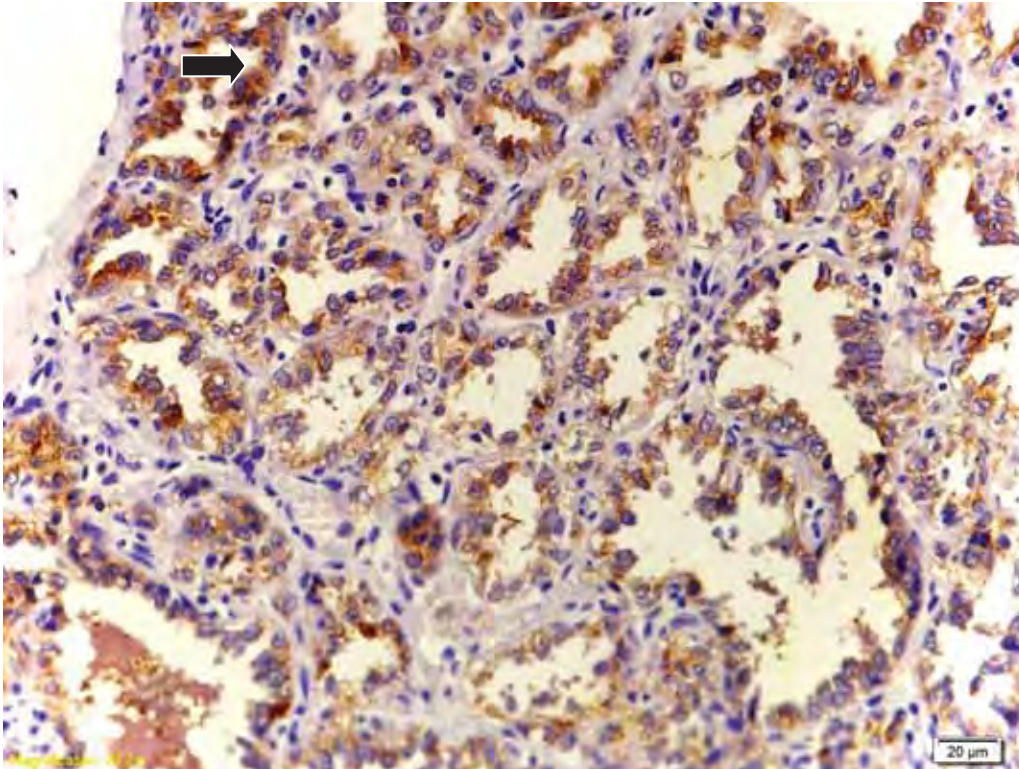


Figura 9. Fotomicrografia mama sem neoplasia canina. Observar marcação de receptores da lecitina UEA no citoplasma de células epiteliais (seta preta). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 20x.

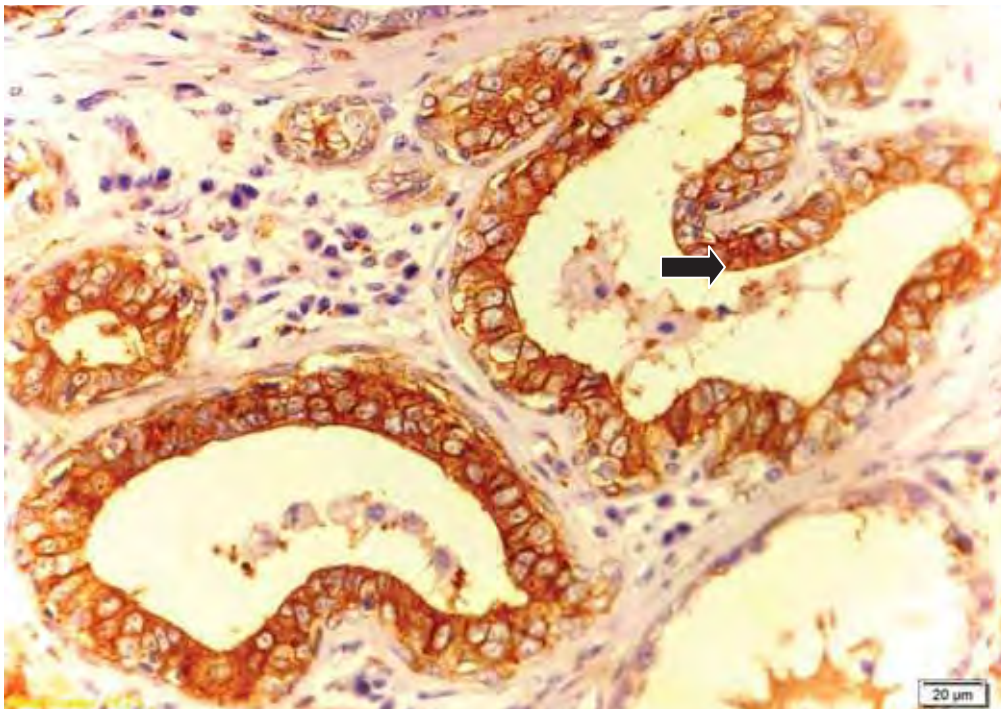


Figura 10. Fotomicrografia carcinoma em tumor misto grau I em cadela. Observar marcação de receptores da lecitina UEA na membrana e citoplasma de células epiteliais (seta preta). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x.

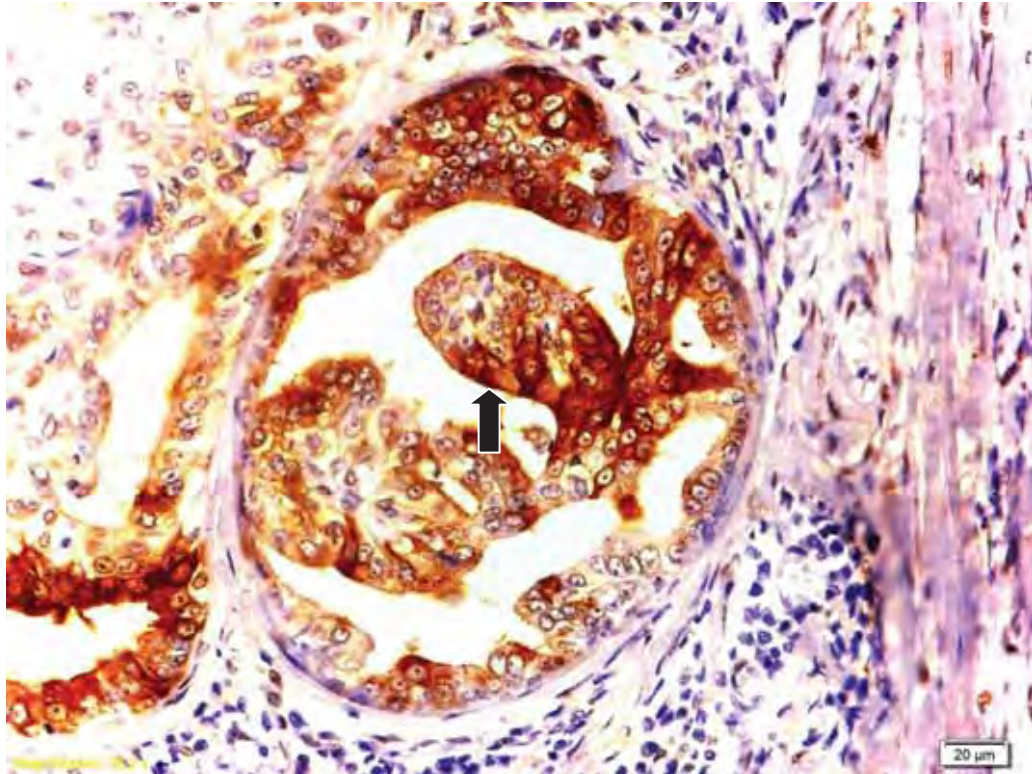


Figura 11. Fotomicrografia de carcinoma papilar grau II em cadela. Observar marcação de receptores da lecitina DBA no citoplasma de células epiteliais (seta preta). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x.

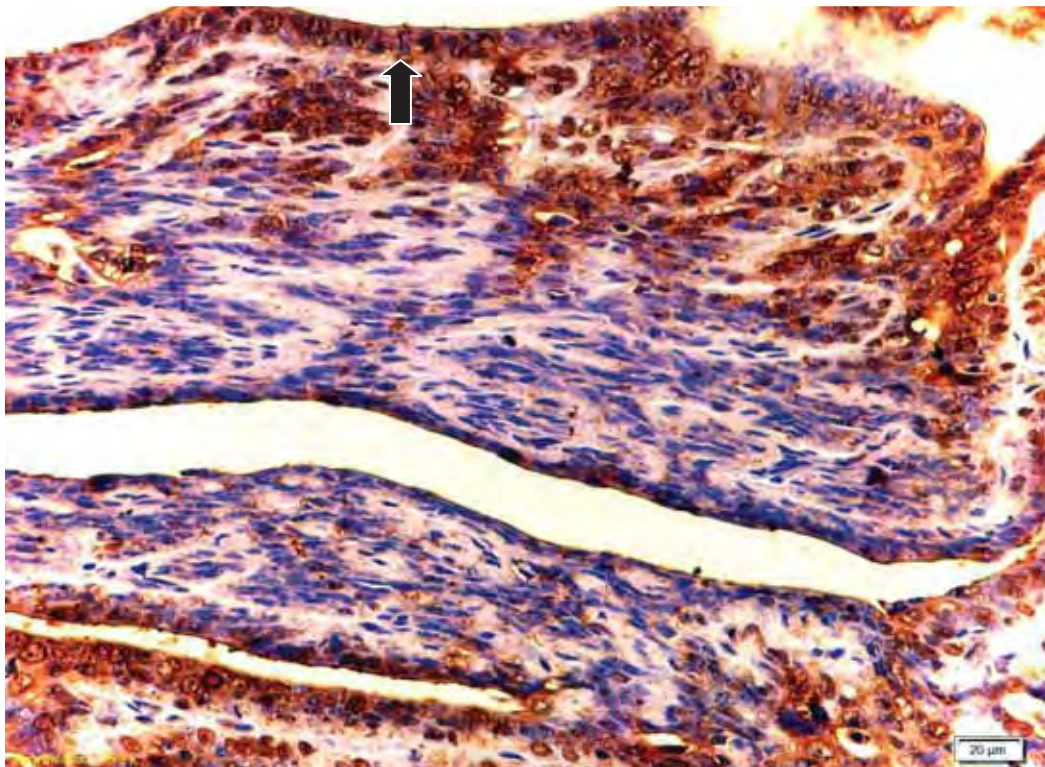


Figura 12. Fotomicrografia de carcinoma papilar grau II em cadela. Observar marcação de receptores da lecitina DBA no núcleo e citoplasma de células epiteliais (seta prta). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x.

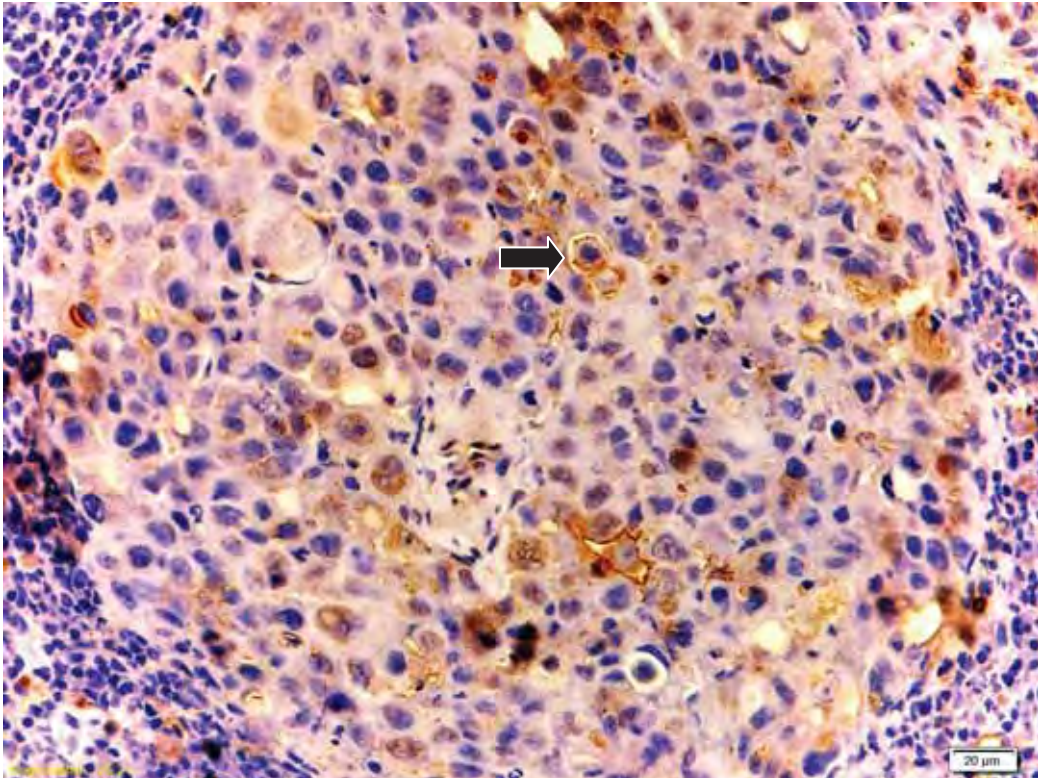


Figura 13. Fotomicrografia de neoplasia mamária canina metastática em linfonodo. Observar marcação de receptores da lecitina DBA na membrana de células epiteliais (seta preta). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x.

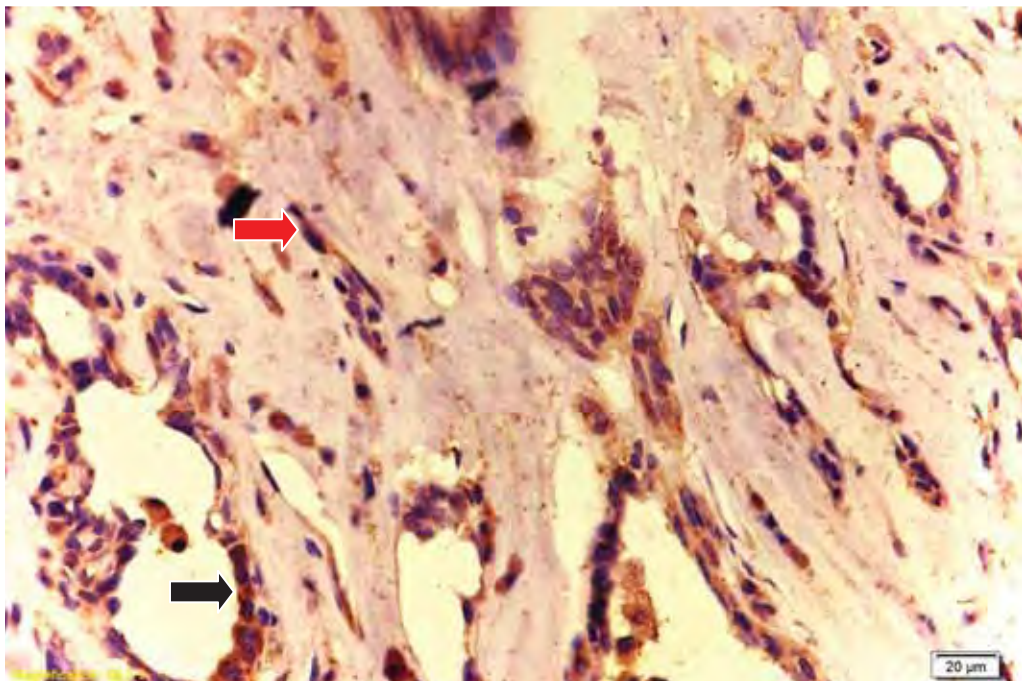


Figura 14. Fotomicrografia de carcinoma tubular grau II em cadela. Observar marcação de receptores da lecitina PNA no citoplasma de células epiteliais (seta preta) e no citoplasma de tecido conjuntivo (seta vermelha). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de

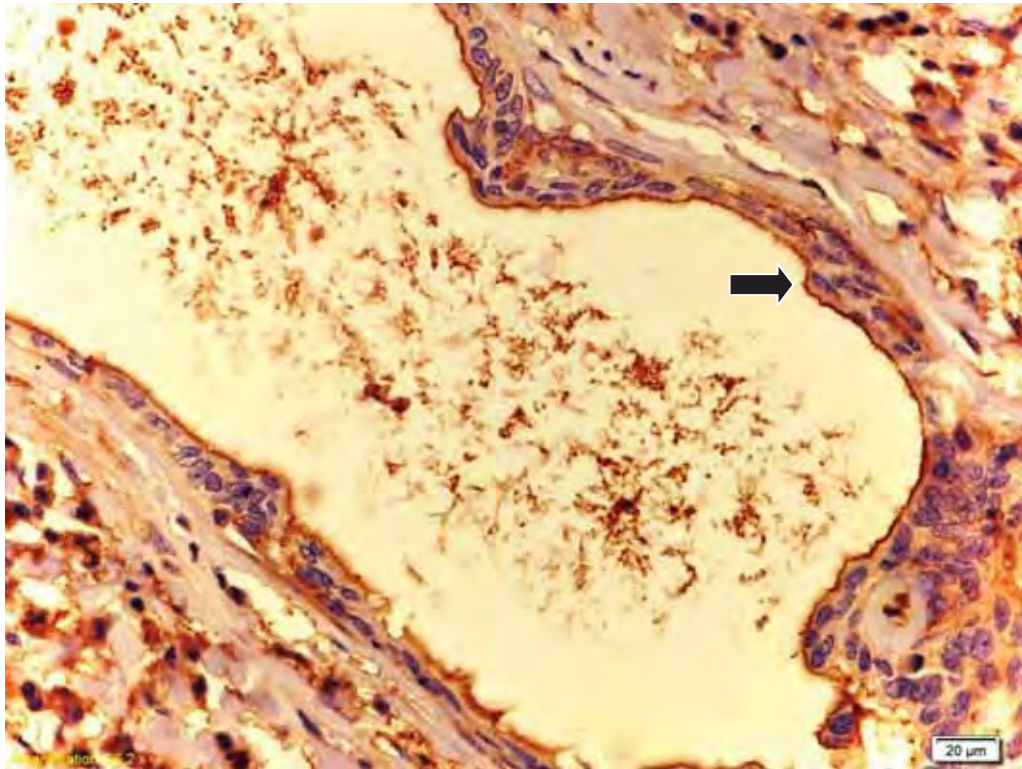


Figura 15. Fotomicrografia de carcinoma em tumor misto grau I em cadela. Observar marcação de receptores da lecitina PNA na membrana de células epiteliais (seta preta). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x.

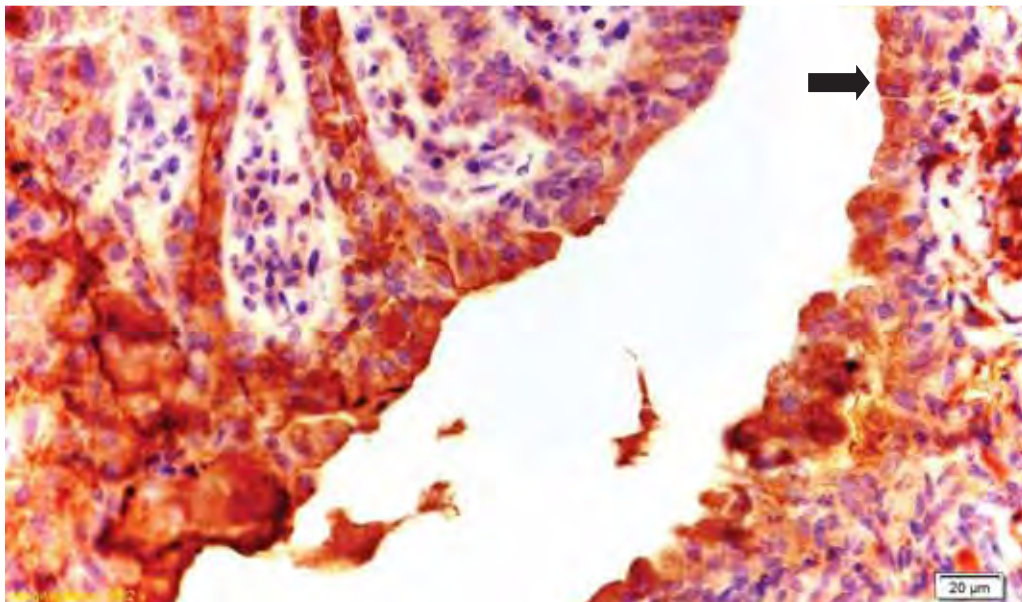


Figura 16. Fotomicrografia de carcinoma em tumor misto grau I em cadela. Observar marcação de receptores da lecitina PNA no citoplasma de células epiteliais (seta preta). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x.

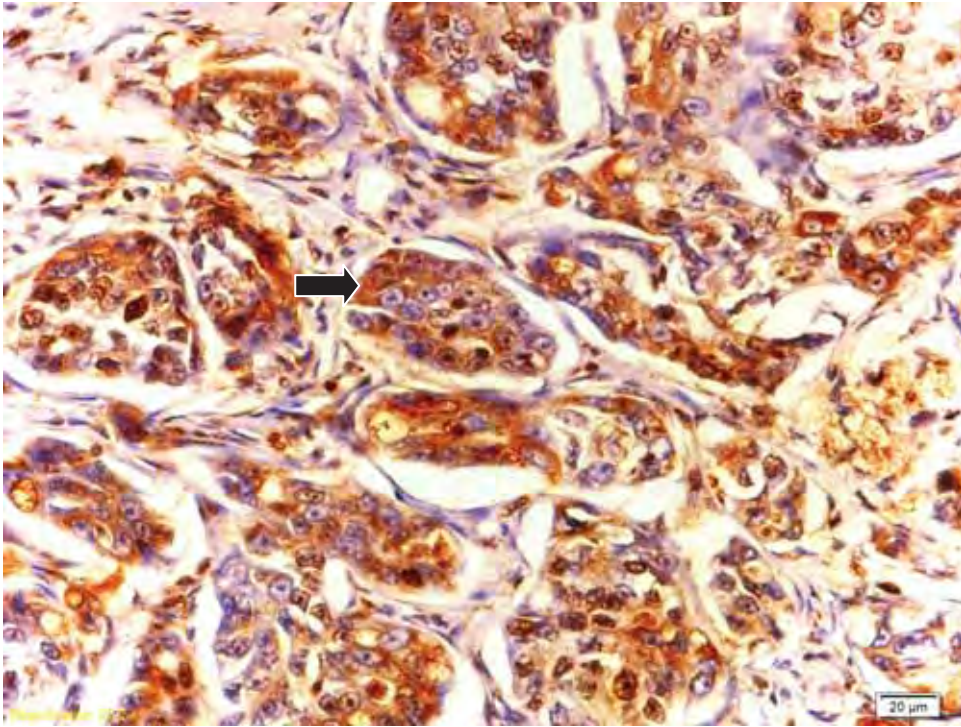


Figura 17. Fotomicrografia de carcinoma mamário metastático em linfonodo. Observar marcação de receptores da lecitina HPA no citoplasma de células epiteliais (seta preta). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x.

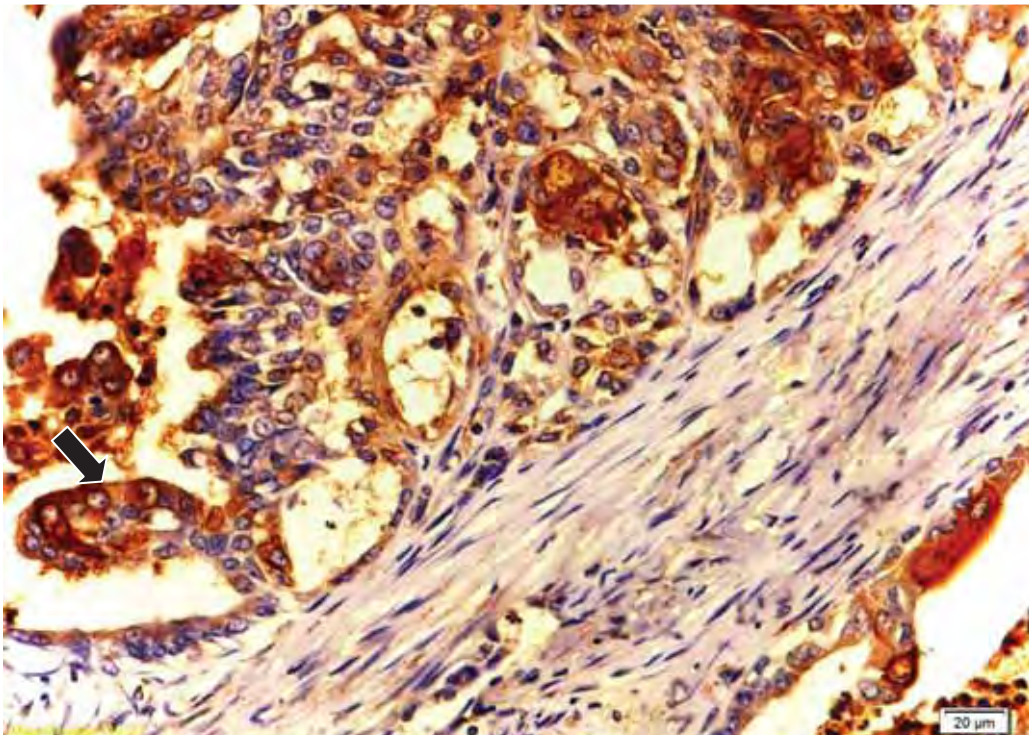


Figura 18. Fotomicrografia de carcinoma papilar grau II. Observar marcação de receptores da lecitina HPA no citoplasma de células epiteliais (seta preta). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x.

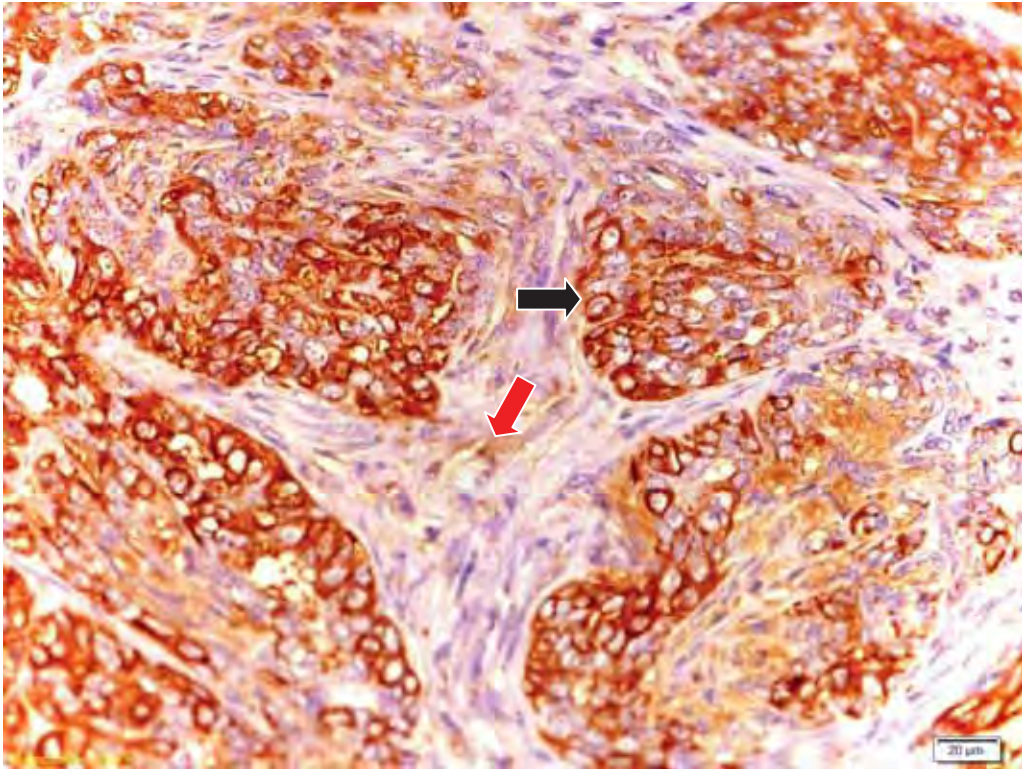


Figura 19. Fotomicrografia de carcinoma em tumor misto grau II em cadela. Observar marcação de receptores da lecitina HPA na membrana de células epiteliais (seta preta) e citoplasma de tecido conjuntivo (seta vermelha). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x.

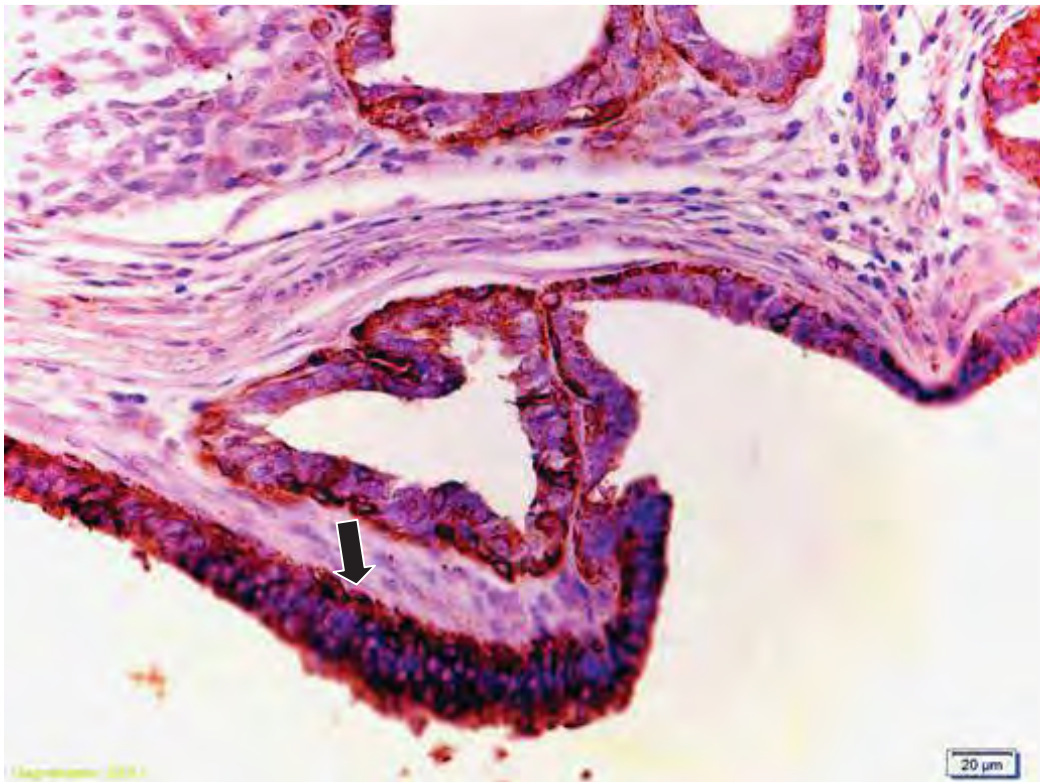


Figura 20. Fotomicrografia de carcinoma tubular grau II em cadela. Observar marcação de receptores da lecitina HPA no citoplasma de células epiteliais (seta preta). Cromógeno DAB, contracoloração Hematoxilina de Harrys. Objetiva 40x.

7. Conclusões

Quanto à formação de glicoconjugados em estruturas celulares (tipo celular e marcação de membrana, citoplasmática ou nuclear), as lecitinas UEA, DBA, HPA e PNA não revelaram diferenças entre si.

As lecitinas UEA, DBA, HPA e PNA, revelaram padrão de marcação diferente entre tecido mamário sem neoplasia e neoplasias mamárias caninas.

As lecitinas UEA, DBA, HPA e PNA, não revelaram padrão de marcação diferente entre os tipos histológicos de neoplasias mamárias caninas.

As lecitinas UEA, DBA, HPA e PNA, se revelaram menos marcadas em focos metastáticos de neoplasias mamárias caninas que em tecido mamário canino sem neoplasias e tecido mamário neoplásico de cadela.

Com relação à quantidade de marcação, as lecitinas PNA e HPA revelaram-se promissoras para a avaliação diagnóstica de neoplasias mamárias caninas. A formação de glicoconjugados de PNA variou entre os tipos histológicos e de HPA foi menor no grupo nos carcinossarcomas.

As lecitinas UEA e DBA revelaram marcação muito semelhante entre os tipos histológicos de neoplasias mamárias caninas, metástases e tecido mamário normal.

8. Referências

- ALROY, J.; UCCI, A. A.; PEREIRA, M. E. A. Lectins: Histochemical probes for specific carbohydrate residues. **Diagnostic Immunochemistry**, v. 2, p. 67-88, 1984a.
- ALROY, J.; ORGAD, U.; UCCI, A. A.; PEREIRA, M. E. A. Identification of glycoprotein storage disease by lectin: A new diagnostic method. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 32, p. 1280- 1284, 1984b.
- AMBROSI, M.; CAMERON, N. R.; DAVIS, B. G. Lectin tools for the molecular understanding of the glycode. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 3, p. 1593-1608, 2005.
- ARABI, M.; SALARI, S.; KARIMI, M.; MOFIDPOUR, H., Lectin Histochemical Study of Cell Surface Glycoconjugate in Gastric Carcinoma Using Helix Pomatia Agglutinin. **Acta Medica Iranica**, v. 48, n. 4, p. 209-213, 2010.
- AUGUSTIN, V. H. G.; SMITH, C. A.; LEWIS, R. M. Phenotypic Characterization of Normal and Neoplastic Canine Endothelial Cells by Lectin Histochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 22, p. 103-109, 1990.
- BALDIN, J. C.; FISCHER, I. C.C.; MORAES. J.; GIOPATO, G.; RAMALHO; M. F, P.; CONTIERI, M. B. 2005. Importância do estudo das neoplasias em medicina veterinária. Conceitos atuais. **Anuário da produção de Iniciação Científica. Discentes**, v. 3, n. 9. Disponível em: <http://www.unianhanguera.edu.br./programasinst/Revista/revistas2006> Acessado em 2009.
- BEAUVAIS, W.; CARDWELL J. M.; BRODBELT, D. C. The effect of neutering on the risk of mammary tumours in dogs – a systematic review. **Journal of Small Animal Practice**. v. 53, p. 314-322, 2012.
- BURCHELL, J. M.; MUNGUL, A.; TAYLOR, P. J. O-linked glycosylation in the mammary gland: changes that occur during malignancy. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 6, n. 3, p. 355-64, 2001.
- CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; DE NARDI, A. B.; FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A. C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, A. C.; DALECK, C. R.; SALGADO, B. S.; FERNANDES, C. G.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; AULER, P. A.; MAGALHÃES, G. M.; SILVA, J. O.;

- RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; OLIVEIRA, L. O.; MALM, C.; ZUCCARI, D. A. P. C.; TANAKA, N. M.; RIBEIRO, L. R.; CAMPOS, L. C.; SOUZA, C. M.; LEITE, J. S.; SOARES, L. M. C.; CAVALCANTI, M. F.; FONTELES, Z. G. C.; SCHUCH, I. D.; PANIAGO, J.; OLIVEIRA, T. S.; TERRA, E. M.; CASTANHEIRA, T. L. L.; FELIX, A. O. C.; CARVALHO, G. D.; GUIM, T. N.; GUIM, T.; GARRIDO, E.; FERNANDES, S. C.; MAIA, F. C. L.; DAGLI, M. L. Z.; ROCHA, N. S.; FUKUMASU, H.; GRANDI, F.; MACHADO, J. P.; SILVA, S. M. M. S.; BEZERRIL, J. E.; FREHSE, M. S.; PAES DE ALMEIDA, E. C.; CAMPOS, C. B. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 4, n. 2, p. 153-180, 2011.
- CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nature**, v, 2, p, 563-572, 2002.
- COOPER, H. S. Peanut lectin-binding sites in large bowel carcinoma. **Laboratory Investigation**. v. 47, p. 83-390, 1982
- DAGLI, M. L. Z. The search for suitable prognostic marker for canine mammary tumors: A promising Outlook. **The Veterinary Journal**, v.177, p. 3-5, 2008.
- DAMJANOV, I. Biology of diseases. Lectin histochemistry and histochemistry. **Laboratory Investigation**, v. 57, p. 5-20,1987.
- DOBSON, J.M.; GORMAN, N. T. A clinical approach to the management of skin tumors in the dog and cat. **Pratice**, v. 10; p. 55-68,1998.
- DODD, R. B., DRICKAMER, K., Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-biding activity. **Glycobiology**, v. 11. n. 5, p. 71-79, 2001.
- EJURI, N., UETSUKA, K., NISHIDA, E., NAKAYSNA, H., DOI, K., Lectin histochemistry of normal and neoplastic canine mammary gland epithelial cells. **Toxicologic Pathology**, v. 11. p. 263-265. 1999.
- ESKO, J. D., SHARON, N., **Microbial Lectins: Hemagglutinins, Adhesins, and Toxins**. Essentials of Glycobiology, second edition, Chapter 24, 2009.
- FEIZI, T., CHILDS, R. A., Carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids as differentiation antigens, tumour- associated antigens and components of receptor systems. **Trends in Biochemical Sciences**, v.10, p. 24-29,1985.

FISCHER, J., KLEIN, P. J., VIERBUCHEN, M., SKUTTA, B., UHLENBRUCK, G., FISCHER, R., Characterization of glycoconjugates of human gastrointestinal mucosa by lectins. I. Histochemical distribution of lectin binding sites in normal alimentary tract as well as in benign and malignant gastric neoplasms. **Journal Histochemistry and Cytochemistry**. v 32, p. 681-689, 1984.

FIDLER, I. J.; BRODEY, R. S. The biological behavior of canine mammary neoplasms. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 151, p. 1311-1318, 1967.

FREED, D. L. "Lectins". **British Medical Journal**, v.290, p. 6468 584-6, 1985.

GABIUS, H. J., Eukaryotic Glycosylation and Lectins: Hardware of the Sugar Code (Glycocode) in Biological Information Transfer. **Electronic Journal of Pathology and Histology**, v. 7, n. 1, 5, 2001.

GABIUS, H. J. E GABIUS, S., Eds.. Lectins and glycobiology. Berlin, Springer-Verlag. Gabor, F., Bogner, E., Weissenboeck, A. e Wirth, M. (2004). "The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery." **Advanced Drug Delivery Reviews** v. 56, p. 459-80, 1993.

GERLINGER, M.; ROWAN, A. J.; HORSWELL, S.; MATH, M.; LARKIN, J.; ENDESFELDER, D.; MATH, D.; GRONROOS, E.; MARTINEZ,P.; MATTHEWS,N.; STEWART, A.; TARPEY, P.; VARELA, I.; PHILLIMORE B.; BEGUM S.; MCDONALD N. Q.; BUTLER, A.; JONES D.; RAINE K.; LATIMER, C.; SANTOS, C. R.; NOHADANI, M.; EKLUND A. C.; DENE, B. S.; CLARK G.; PICKERING L.; STAMP G.; GORE M.; SZALLASI Z.; DOWNWARD, J.; FUTREAL, P. A.; SWANTON,C. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. **The new England Journal of Medicine**. v. 366, n. 10, p. 883-892, 2012.

GILBERTSON, S. R.; KURZMAN, I. D.; ZACHRAU, R. E.; HURVITZ, A. I.; BLACK, M. M. Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. **Veterinary Pathology**, v. 20, n. 2, p. 127-142, 1983.

GOLDSTEIN, I. J. E HAYES, C. E. "The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals." **Advanced in Carbohydrate Chemistry & Biochemistry**, v. 35, p. 127-340, 1978.

- GOLDSTEIN, I.J., HUGHES, R.C., MOUSIGN, M., OSAWA, T., SHARON, N.: What should be called a lectin? (Letter) **Nature**, v.286, n.66, 1980.
- HAKOMORI, S.I., Glycosphingolipids as differentiation dependent,tumor-associated markers and as regulators of cell proliferation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 9, p. 453 – 455,1984.
- HEDLUND, C.S. Cirurgia dos Sistemas Reprodutivo e Genital. In: FOSSUM, T.W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 3 ed. Rio de Janeiro: Mosby, p. 702-774, 2008.
- JANZEN, D. H., JUSTER, H. B. E LIENER, I. E. Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black beans on a bruchid beetle. **Science** v. 192, p. 795-6, 1976.
- KENNEDY, J.F., PALVA, P,M,G., CORELLA, M.T.S., CAVALCANT , B M.S.M., COELHO, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers** v. 26, p. 199-230, 1995.
- KIVELA, T., Glycoconjugates in retinoblastoma: a lectin histochemical study of ten formalin-fixed and paraffinembedded tissues. **Virchows Archive**. v. 410, p. 471-479, 1987.
- KLOPLEICH, R., LENZE, P., HUMMEL, M., GRUBER, A. D., Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles. **Biomed Central Cancer**. v. 10, p. 2-11, 2010.
- KOBAYASHI, N., SUZUKI K., SHIBUYA H, SATO T., AOKI I., NAGASHIMA, Y. Renal Collecting Duct Carcinoma in a Dog. **Veterinary Pathology**, v. 45, p. 489–494, 2008.
- KOLBATZKY, F., HERMANNNS, W., Acute megakaryoblastic leukemia in one cat and two dogs. **Veterinary Pathology**, v. 30, n. 2, p.186-194, 1993.
- LIS, H. E SHARON, N. (1973). "The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins)." **Annual Review of Biochemistry**, v. 42, p. 541-74, 1973.
- LOTAN, R., SKUTELSKY, E., DANON, D., SHARON, N. The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). **The Journal of Biological Chemistry**, v.250, p.8518-8523, 1975.
- MISDORP, H.; ELSE, R.; HELLMAN, E., Histologic classification of mammary tumors of the dog and cat. In: **World Health Organization Internacional Histological**

Classification of Tumors of Domestic Animals, Series 2, v. 7, n. 2, Armed Forces Institute of Pathology Washington DC, 1999.

MOORE, R., KING, .N, ALROY, J., Differences in cellular glycoconjugates of quiescent, inflamed, and neoplastic colonic epithelium in colitis and cancer-prone tamarins. **American Journal of Pathology**. v.131, p. 484-489, 1988

MOULTON, J. E. **Tumors of the mammary gland**. In Tumors in Domestic Animals. University of California Press. p. 518-550, 1990.

MORRISON, W. B. **Cancers in dogs and cats. Medical and surgical management**. Philadelphia : Willians & Wilkins, p. 785, 1998.

NANGIA-MAKKER, P., HOGAN, V., HONJO, Y., BACCARINI, S., TAIT, L., BRESALIER, R., RAZ, A., Inhibition of Human Cancer Cell Growth and Metastasis in Nude Mice by Oral Intake of Modified Citrus Pectin. **Journal of the National Cancer Institute**, v, 94, n, 24, 2002.

OHASHI, E. et al. Retinoids induce growth inhibition and apoptosis in mast cell tumor cell lines. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, p. 797-802, 2006.

OLIVEIRA, L. O., OLIVEIRA, R. T., LORETTI, A. P., RODRIGUES, R., DRIEMEIER, D., Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta Scientiae Veterinariae**. v, 31, n.2, p. 105-110, 2003.

ORDOFIEZ, N. G., BATSAKIS, J. G. Comparison of Ulex europaeus I lectin and factor VIII-related antigen in vascular lesions. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 108, p. 129-132, 1984.

ORGAD, U., ALROY, J., UCCI, A., MERK, F. B., Histochemical studies of epithelial cell glycoconjugates in atrophic, metaplastic, hyperplastic, and neoplastic canine prostate. **Laboratoty Investigation**.;v. 50, p. 294-302, 1984.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos – novas perspectivas. **Congresso de Ciências Veterinárias [Proceedings of the Veterinary Sciences Congress]**, SPCV, Oeiras, p. 183-190, 2002.

PARUMS, D.V., CORDELL, J. L., MICKLEM, K., HERYET, A. R., GATTER, K.C., MASON, D.Y. A new monoclonal antibody that de- 22l tects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. **Journal of Clinical Pathology**. v. 43, p. 752-757, 1990.

- ROBINSON, M. A., CHARLTON, S. T., GARNIER, F., WANG, X. T., DAVIS, S., PERKINS, A. C., FRIER, M., DUNCAN, R., SAVAGE, T. S., WYATT, D. A., WATSON, S. A., DAVIS, B. G. LEAPT: Lectin-directed enzyme-activated prodrug therapy. **Proceedings of National Academy Sciences of the United States of America**. v. 101, n. 40, p. 14527-14532, 2004.
- RUBIN, E., FARBER, J.L. Neoplasia. In: _ . **Patologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002. cap.5, p. 152-209.
- RUDLAND, P. Association of S100A4 and Osteopontin with specific prognostic factors and survival of patients with minimally invasive breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v.12, n.4, p.1192-200, 2006.
- RUTTEMAN, G. R., WITHROW, S. J., MACEWEN, E. G. Tumors of the mammary gland, p.455-477. In: Withrow S.J. & MacEwen E.G. (Eds), **Small Animal Clinical Oncology**. 3rd ed. W.B. Saunders, Philadelphia, 2001.
- SAMS, J., LYNCH H. T., BURT R. W., LANSPA S. J., BOLAND C. R. Abnormalities of Lectin Histochemistry in Familial Polyposis Coli and Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. **Cancer**, v.66, p. 502-508 ,1990.
- SKUTELSKY, E., ALROY J., UCCI, A. A., CARPENTER, J. L., MOORE, F. M., Modulation of carbohydrate residues in regenerative nodules and neoplasms of canine and feline pancreas. **American journal of pathology**, v. 126, n. 1, p.25-31, 1987.
- SMETANA, K., ANDR´R, S., Mammalian Lectin as Tool in Glycochemistry and Histochemistry with Relevance for Diagnostic Procedure. **Methods in Molecular Biology**, v. 418, p. 169-183, 2007.
- UCHIDA, K.; MOROZUMI, M.; YAMAGUCHI R.; TATEYAMA, S. Diffuse leptomenigeal malignant histiocytosis in the brain and spinal cord of a tibetan terrier. **Veterinary Pathology**, v. 38, p. 219–222, 2001.
- YAMAKAWA, T.; NAGI, Y: Glycolipids at the cell surface and their biological functions. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 3, n.128-131,1978.
- ZUCCARI, D. A. C. P.; BERTON, C. R.; TERZIAN, A. C. B.; RUIZ, C. M. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias –importância dos marcadores imuno-histoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo. **Arquivo de Ciências da Saúde**, v.15, p. 189-198, 2008.

ZHU-SALZMAN, K.; SALZMAN, R. A. Functional mechanics of the plant defensive *Griffonia simplicifolia* lectin II: Resistance to proteolysis is independent of glycoconjugate binding in the insect gut. **Journal of Economic Entomology**, v. 94, p. 1280–1284, 2001.

WANG, S.; PANTER, K.E.; EVANS, R.C.; BUNCH, T.D. The effects of pokeweed mitogen (PWN) and phytohemagglutinin (PHA) on bovine oocyte maturation and embryo development in vitro. **Animal Reproduction Science**, v.67, p.215-220, 2001.

WEIS, W. I. E.; DRICKAMER, K. "Structural basis of lectin-carbohydrate recognition." **Annual Review of Biochemistry** v. 65, p. 441-73, 1996.