

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

DETECÇÃO E EXPRESSÃO DOS GENES
SUPRESSORES p53 E c-Myc EM TUMORES
PALPEBRAIS DE CÃES

Rodrigo Antonio Lopes

Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**DETECÇÃO E EXPRESSÃO DOS GENES
SUPRESSORES p53 E c-Myc EM TUMORES
PALPEBRAIS DE CÃES**

Rodrigo Antonio Lopes

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Lima de Andrade

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Tereza Cristina Cardoso

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia –
Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências
para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal
(Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA – SP

2008

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RODRIGO ANTONIO LOPES – nascido em 02 de maio de 1979, na cidade de Araçatuba, formado em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – Campo Grande – MS, com pós graduação “Lato Sensu” na área de Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais pelo Instituto de Pós-Graduação – QUALITTAS em parceria com o Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP.

ARAÇATUBA – SP

2008

Dedicatória

- Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem Ele, nada seria possível e não estaríamos aqui reunidos, desfrutando, juntos, destes momentos que nos são tão importantes.
- Aos meus pais, Antonio e Isabel, e à minha avó Maria Zilda.
- Aos meus amigos, que aqui deixo uma frase:

“Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonho e outras ainda porque nos desafiam a construí-los.

Quando damos conta, já é tarde para lhes agradecer”

- Dedico àqueles que me ajudaram, direta e indiretamente, na construção deste trabalho.
- E ainda dedico este trabalho a todos aqueles que acreditam que a ousadia e o erro são caminhos para as grandes realizações.

Agradecimentos

- Ao Professor Assistente Doutor ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE, pela orientação, profissionalismo, exemplo como pesquisador, capacidade de orientação e incentivo em todos os momentos na confecção deste trabalho. Agradeço ainda pela amizade conquistada neste período;
- Ao Curso de Pós-graduação em Ciência Animal do Curso de Medicina Veterinária da UNESP – campus de Araçatuba pela aceitação do meu nome como aluno regular no Mestrado, e também por permitir a obtenção deste título;
- À Professora Doutora TEREZA CRISTINA CARDOSO, pela inestimável colaboração na execução deste trabalho, que sem medir esforços acompanhou todos os procedimentos laboratoriais. À Professora Tereza meu Muito Obrigado!;
- À Professora Doutora MARIA CECÍLIA RUI LUVIZOTTO, pela inestimável colaboração no fornecimento dos tumores do Serviço de Patologia Veterinária, bem como na execução do estudo anatomo-patológico e imunoistoquímico. Obrigado também por sempre me incentivar e não desanimar frente aos obstáculos que por vezes surgiram. Professora Cecília, Muito Obrigado!;
- A todos os funcionários da seção de pós-graduação, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, campus de Araçatuba;

- Aos professores e amigos do Programa de Pós-graduação pelo convívio, amizade e carinho;
- Aos amigos que fiz junto ao Laboratório de Virologia e Patologia Veterinária do Curso de Medicina Veterinária da FOA – UNESP – campus de Araçatuba: Gilmara Castilho, Magna Galvão, Ana Carolina Guedes Rosa, Marina Ferrarezi, Vinícius Carreira e Professora Assistente Doutora Daniela Bernadete Rozza;
- Aos funcionários do Curso de Medicina Veterinária da FOA – UNESP – campus de Araçatuba: Elza Branco, Isabel Pereira e Fátima Maria Berttoluci;
- Ao Médico Veterinário Heitor Flávio Ferrari, pela colaboração técnica na execução deste trabalho;
- À FAPESP pelo apoio financeiro na concessão da bolsa e financiamento do projeto de pesquisa (processos: 06/54942-3 e 2008/00429-9);

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. NEOPLASIAS OCULARES EM PEQUENOS ANIMAIS	1
2. CONCEITOS SOBRE ONCOGENES p53 e c-Myc	5
2.1 Oncogene p53	5
2.2 Oncogene c-Myc	9
3. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA DETECÇÃO E EXPRESSÃO DE ONCOGENES	12
4. REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO 2: ARTIGO	26
RESUMO	26
SUMMARY	27
2.1 Introdução	28
2.2 Materiais e Método	32
2.2.1 Amostras	32
2.2.2 Avaliação Anatomopatológica dos tumores	33
2.2.3 Imunoistoquímica	34
2.2.4 Tratamento para extração do DNA e RNA	35
2.2.5 Extração de DNA pelo método do Acetato de Amônio 4 M	36
2.2.6 Extração do RNA total – método do Trizol	37
2.2.7 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	37

2.2.8 RT-PCR em uma única etapa	39
2.2.9 PCR ELISA E RT-PCR ELISA	40
2.2.10 Determinação do ponto de corte e da curva padrão do ELISA	41
2.3 Resultados	42
2.3.1 Avaliações anatomopatológica e imunoistoquímica	42
2.3.2 Quantificação do DNA e RNA extraídos e relação A280/260	43
2.3.3 Presença dos oncogenes p53 e c-Myc por eletroforese em gel de agarose e PCR ELISA	44
2.3.4 Expressão dos genes p53 e c-Myc pelas técnicas eletroforese em gel de agarose e RT-PCR ELISA	45
2.4 Discussão	48
2.5 Conclusão	51
2.6 Referências Bibliográficas	53
APÊNDICES	59
IMAGENS FOTOGRÁFICAS DE ALGUNS CASOS AQUI ESTUDADOS. COLORAÇÕES DE HEMATOXILINA-EOSINA E IMUNOMARCAÇÃO PARA CITOQUERATINA AE1/AE3 E VIMENTINA (V9).	60
LISTA DE MATERIAIS, SOLUÇÕES E REAGENTES UTILIZADOS NA COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA-EOSINA E IMUNOISTOQUÍMICA	67
LISTA DE MATERIAIS, SOLUÇÕES E REAGENTES UTILIZADOS NA PCR e RT-PCR	68
LISTA DE MATERIAIS, SOLUÇÕES E REAGENTES UTILIZADOS NO PCR-ELISA E RT-PCR-ELISA	69

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

5. NEOPLASIAS OCULARES EM PEQUENOS ANIMAIS

As neoplasias, quaisquer que sejam, decorrem de alterações bioquímicas, genéticas e anatômicas de células e tecidos normais. Estas células sofrem modificações tornando-se diferenciadas das normais, inclusive nas suas propriedades; crescem autonomamente, sem ou com pouca relação com os mecanismos reguladores intra e intercelulares observados nos tecidos normais. Tais alterações podem ser geradas por agentes extrínsecos e intrínsecos, ou ainda pela combinação desses. Em cães e gatos, os fatores extrínsecos mais comuns são a radiação ultravioleta (UV) e ionizante (podendo causar o carcinoma epidermóide da pele em gatos brancos e que afetam menos freqüentemente os cães), agentes virais tumorais (vírus da leucemia felina – FeLV, vírus do sarcoma felino), e agentes químicos carcinogênicos (petróleo, poliésteres e xileno, solventes de inseticidas tópicos presentes em xampus antipulgas e carrapatos). Dos fatores intrínsecos podemos citar a dieta, pois por exemplo, o alto consumo de gordura é um fator predisponente a tumores de mamas. Citam-se ainda, efeitos hormonais (prostaglandinas) e predisposição genética (cães da raça Boxer tendem a apresentar mais neoplasias quando comparados às outras raças caninas) (MORRISON, 1998). Em se tratando de tumores oculares, podemos citar como fatores predisponentes a idade (KREHBIEL, 1975; ROBERTS, 1986), genética

(MORRISON, 1998), infecção por vírus (MORRISON, 1979; BONNEY, 1980; WILLIAMS, 1981), exposição freqüente a raios solares (MORGAN, 1969; BISTNER, 1998) e presença de neoplasias de comportamento metastático em outros tecidos/órgãos (MORGAN, 1969).

Os tumores que acometem as pálpebras e a terceira pálpebra de cães apresentam maior incidência em animais idosos e são tipicamente benignos (AQUINO, 2007). Tumores malignos, incluindo adenocarcinoma, melanoma, carcinoma de células basais e de células escamosas, são infreqüentes, e representam uma porcentagem em torno de 8,2% dos tumores. Nestes casos, são comparativamente maiores em tamanho, mas com pequeno potencial metastático (HIRAI et al., 1997; KREHBIEL, 1975). A aparência clínica da neoplasia e seus sinais clínicos variam consideravelmente de acordo com a região acometida, podendo mimetizar um processo inflamatório ocular no início até um quadro de uveíte e/ou glaucoma (WILLIS, 2001). Os animais são trazidos pelos seus proprietários por apresentarem inúmeros sinais clínicos oculares como presença de formações pedunculadas (BISTNER, 1998; BONNEY, 1980), feridas crônicas, hifema “olho vermelho”, buftalmia, epífora, secreção abundante, entre outros (BISTNER, 1998).

No homem, a incidência de carcinomas de células basais e carcinomas de células escamosas é de 62,2% e 8,7%, respectivamente. A faixa etária de ocorrência encontra-se entre 62 e 80 anos. Alguns estudos evidenciam ainda, que esta incidência teve um aumento significativo nos últimos anos,

umentando os valores de 1,5 por milhão para 5,1 por milhão de pessoas (WANG, et al., 2003; LIN et al., 2006).

O diagnóstico não pode ser baseado somente em achados clínicos ou radiográficos. São necessários exames complementares citológicos para se estabelecer o diagnóstico definitivo. No caso de tumores oculares, os exames comumente realizados são: aspirado por agulha fina, biópsia incisional ou excisional, que permitem a realização de exames histopatológicos ou imunoistoquímicos. Em princípio, todos os tumores devem ser submetidos a exames histológicos, pois mesmo os nódulos pequenos, com aparência benigna podem revelar focos de células malignas (WILLIS, 2001).

Os métodos de tratamento mais comumente empregados para neoplasias palpebrais, tanto em seres humanos como em cães, ainda estão restritos a remoção cirúrgica do crescimento tumoral, crioterapia e excisão a laser. As radiações ionizantes também podem ser utilizadas, mas se limitam a alguns tipos tumorais e localizações. O uso do Estrôncio-90 foi relatado por ANDRADE et al. (2003) como tratamento de carcinomas de terceira pálpebra. No estudo concluíram que tal procedimento é uma alternativa viável para a preservação desta estrutura ocular, com vantagens do baixo custo quando comparado com as outras opções de tratamento, sendo passível de ser realizado na rotina de hospitais e clínicas veterinárias.

O modo de crescimento de uma neoplasia é freqüentemente o indicador da sua invasividade relativa. Lesões expansivas, bem circunscritas, são mais facilmente excisadas; tumores infiltrativos com ou sem ulceração são mais

agressivos, apresentando alta taxa de recidiva pós-operatória (ROBBINS e COTRAN, 2005). Tradicionalmente, cerca de 50% dos cães com tumores malignos comprovados por biópsia, sofrem recidivas ou metástases após a excisão cirúrgica. Tal procedimento é recomendado para a maioria dos cães que apresentam este tipo de neoplasia, e o objetivo terapêutico é remover toda a evidência macroscópica de tumor (DUBIELZIG, 1990). A excisão não deve ser realizada também em animais que possuam carcinomas inflamatórios ou moléstias metastáticas. A alta taxa de recidiva indica a incapacidade de remoção de todos os focos de células malignas. A avaliação completa, incluindo as radiografias torácicas, a palpação cuidadosa dos linfonodos periféricos, tecido mole adjacente e estruturas ósseas, assim como análises laboratoriais adequadas, são pré-requisitos para o tratamento cirúrgico adequado (KIRK, 2003).

O prognóstico destas enfermidades baseia-se no tempo de evolução dos tumores e na rapidez com que estes são diagnosticados. As características clínicas e o comportamento biológico são os parâmetros mais importantes a serem considerados para se instituir o prognóstico. Características como modo e taxa de crescimento, volume total do tumor e envolvimento dos linfonodos regionais ou distantes são fundamentais para determinar prognóstico e possível tratamento. Os tumores malignos quase sempre têm um crescimento rápido (ROBERTS, 1986).

É de fundamental importância, também, a análise dos linfonodos regionais, pois, tumores com alto potencial metastático tem prognóstico desfavorável. O

carcinoma infiltrativo está associado a um índice de recidiva significativamente mais elevado que o carcinoma não invasivo (AQUINO, 2007).

Apesar de uma profunda investigação clínico-patológica ser a base para o manejo inicial das neoplasias, pouco se conhece sobre os prognósticos e as causas dos tumores em cães. Estratégias clínicas e patológicas estão sujeitas a inúmeros erros, e métodos de visualização por imagem não são sensíveis o suficiente para uma avaliação concreta (POPOV, et al., 1997).

Usualmente, um conjunto de alterações moleculares em diferentes níveis de regulação é responsável pelo estabelecimento do câncer, de modo que uma simples alteração celular raramente é suficiente para deflagrar o processo tumorigênico. Todavia, a alteração de alguns genes com papel central em múltiplos canais regulatórios revela o potencial impacto de uma única desordem molecular para a promoção da neoplasia (FARIA e RABENHORST, 2005).

6. CONCEITOS SOBRE OS GENES SUPRESSORES p53 e c-Myc

2.1 Gene supressor p53

Os genes que controlam o crescimento celular, regulam a proliferação e a diferenciação de células com algum tipo de alteração e as protegem, são chamados genes supressores. Já os oncogenes, caracterizam-se pela capacidade de promover o crescimento celular na ausência de sinais

mitogênicos normais e seus produtos são chamados de oncoproteínas (ROBBINS E COTRAN, 2005).

Acredita-se que mutações do gene p53 são as alterações genéticas mais comuns em neoplasias em cães, entretanto pouco se sabe sobre ele e suas mutações (FARIA, 2005). Inúmeros estudos têm tido como foco de investigação a significância do papel do gene p53 e a sua patogênese numa grande variedade de neoplasias que acometem o homem e os cães. Entretanto, os estudos revelam que o mesmo está expresso em pouco mais de 50% dos tumores. A sua participação na evolução clínica e resposta terapêutica constitui-se na base potencial do desenvolvimento de novas terapias (JOHNSON, 1998; ROBBINS E COTRAN, 2005). A capacidade da proteína P53 em controlar a apoptose em resposta à lesão do DNA apresenta importantes implicações terapêuticas práticas.

Apoptose constitui-se em um processo de morte celular sem reação inflamatória, diferentemente da necrose celular. Ela consiste de uma série de eventos intracelulares, os quais ocorrem por meio de uma seqüência padrão e idêntica, mesmo quando desencadeada por fatores bastante distintos (PINHO, 2005).

A radiação e a quimioterapia, que são duas modalidades de tratamento do câncer, promovem uma lesão no DNA, e subsequente apoptose. Tumores que mantêm o gene supressor p53 preservado são mais prováveis de responder a tais tratamentos do que tumores que apresentam alelos mutantes. Entretanto, neoplasias que apresentam mutações deste gene são relativamente resistentes

a protocolos de quimioterapia e radioterapia. Com base nesses dados, o desenvolvimento de novas alternativas de tratamento tem sido investigadas, visando aumentar a atividade da proteína P53 em regular a proliferação de células tumorais, ou induzi-las à apoptose, eliminando de forma seletiva as células tumorais com função anormal do p53 (ROBBINS E COTRAN, 2005). Neste sentido, SHIMADA et al. (2006) ao investigarem a viabilidade, segurança, atividade biológica e a eficácia do tratamento utilizando terapia gênica adenoviral com o gene supressor p53 (Ad5CMV-p53- ADVEXIN®) em pacientes humanos com carcinoma de células escamosas esofágico, observaram redução na taxa de crescimento tumoral, segurança e viabilidade do seu uso. TOLCHER et al. (2006) demonstraram a mesma viabilidade e segurança ao analisar a farmacocinética deste medicamento. FUJIWARA et al. (2006) obtiveram os mesmos benefícios clínicos em pacientes com tumores de pulmão.

Na maioria dos casos as mutações de inativação afetam ambos os alelos do p53 e são adquiridas no processo de divisão das células somáticas, porém a frequência destes eventos é baixa. Alguns casos de herdabilidade de um alelo mutante também são observados. O fato das mutações serem comuns em diversos tipos de tumores sugere que a proteína P53 (uma proteína nuclear) funciona como uma guardiã crítica contra qualquer formação do câncer. Acredita-se que a mesma esteja relacionada com a manutenção da integridade do DNA e tem suma importância no mecanismo de reparação celular. É evidente que o p53 age como um “policia molecular” que impede a propagação

de células geneticamente lesadas e induz a apoptose em células com danos irreparáveis no DNA (JIANG, et al., 1999; MUTO et al., 2000; ROBBINS & COTRAN, 2005). Tumores que apresentam funcionalidade anormal do gene p53 são, em geral, mais resistentes à apoptose, e acumulam mutações adicionais que contribuem para a progressão da neoplasia (LEVINE, 2000).

Acredita-se que mutações do gene p53 sejam a alteração genética mais comum em tumores mamários em cadelas (VAN LEEUWEN et al., 1996), assim como outros tipos tumorais que acometem o homem e os cães. Poucos são os relatos de estudos do p53 em neoplasias que acometem os cães (VELDHOEN & MILNER, 1998; LEE, et al., 2002; LEE et al., 2004; ZUCCARI, et al., 2004; KELLER, et al., 2007). Algumas anormalidades deste gene têm sido documentadas em carcinomas de tireóide (DEVILEE et al., 1994), papilomas orais (MAYR et al., 1994), osteossarcomas (VAN LEEUWEN et al., 1997), adenoma da glândula perianal (MAYR et al., 1997) e linfomas (VELDHOEN et al., 1998). A super-expressão da proteína P53 também foi observada em tumores epiteliais, mesenquimais e de células redondas (VELDHOEN & MILNER, 1998). Muto et al. (2000) detectaram algumas alterações nos éxons 5-8 em tumores mamários de cães, desde os tumores benignos até os carcinomas.

CARVALHO et al. (2005) ao analisarem a presença da proteína P53 em carcinomas oculares de bovinos, concluíram que existe uma alta correlação entre a mutação gênica do gene p53 com inúmeros tumores sólidos, e que, a super-expressão e o acúmulo desta proteína nestes tipos tumorais sugerem

uma possível mutação neste tipo de neoplasia. Salientaram ainda, que estudos moleculares mais específicos sejam realizados a fim de se promover um maior esclarecimento da relação do acúmulo desta proteína com a mutação do gene p53. Na atualidade, os estudos tem se voltado para a pesquisa da possibilidade de se criar alternativas para a inativação do gene p53 e suas alterações em alguns casos de neoplasias de cães, uma vez que o mesmo é reconhecido como de grande potencial na terapia anti-câncer (VELDHOEN & MILNER, 1998). Não foram encontradas pesquisas referentes ao estudo da presença e expressão deste gene supressor em tumores que acometem o bulbo ocular e seus anexos no homem e nos animais de companhia.

2.2 Gene Supressor c-Myc

O papel do gene c-Myc no câncer foi inicialmente apontado por Varmus e Bishop, ganhadores do prêmio Nobel em 1989. Entretanto, os estudos estavam se iniciando em 1911, quando Peyton Rous evidenciou que um sarcoma típico em aves poderia ser transmitido através de extratos tumorais não-celulares, sugerindo que algum vírus poderia ser o possível agente etiológico desta neoplasia (citado por FARIA, 2005). Baseado neste trabalho, Sheiness e Bishop (1979), ao estudarem um sub-grupo de retrovírus (Viral Avian Myelocytomatosis) causador da mielocitomatose em aves, identificaram o gene v-Myc. Subseqüentemente, o gene c-Myc (de *cell*) foi identificado como o homólogo celular deste gene retroviral, sendo sua super-expressão demonstrada em vários tumores humanos e animais (DANG, 1999).

O gene c-Myc está localizado na região cromossômica 8q24.1, compreendendo 3 éxons, cujos produtos (p64 e p67; de *protein*, seguido do peso molecular em kDa) consistem em fosfoproteínas nucleares altamente conservadas (TAUB et al., 1982; LUSCHER e EISENMAN, 1990). Há relativa abundância da P67 em relação à P64, também conhecidas como Myc-1 e Myc-2, respectivamente, embora as quantidades das isoformas variem de acordo com os tecidos. Uma terceira isoforma da proteína c-Myc, denominada de Mys-s (do inglês *short*) ou Myc-3, foi descrita recentemente (SPOTTS et al., 1997). Logo depois da descoberta do c-Myc, dois outros genes relacionados foram encontrados amplificados em cânceres humanos: o n-Myc (nos neuroblastomas) e o l-myc (nos carcinomas do pulmão, do inglês *lung*). Adicionalmente, dois novos genes foram identificados, contudo somente em roedores: o B-Myc e o S-Myc. O conjunto desses cinco genes é denominado genericamente como *família de genes Myc* (MELKOUMIAN et al., 2002). A proteína C-Myc contém duas seqüências de localização nuclear (NLS) e domínios estruturais que a caracterizam como um fator de transcrição. Os primeiros 143 aminoácidos da porção N-terminal compreendem o domínio de transativação (TAD), que contém as regiões chamadas *Myc boxes* (Mb) I e II. Estas últimas são intrinsecamente ligadas às atividades biológicas exercidas pela C-Myc e altamente conservadas entre os membros da família. A porção C-terminal contempla três importantes domínios: [1] a região básica (BR), implicada no reconhecimento específico da seqüência do DNA, [2] a *helix-loop-helix* (HLH) e [3] o *zipper* de leucina (LZ), estas últimas responsáveis pela

formação de heterodímeros específicos entre a C-Myc e seus ligantes (PELENGARIS et al., 2002; FACCHINE e PENN, 1998).

O funcionamento altamente regulado do ciclo celular permite reparos a danos ao DNA antes da replicação, resultando na integridade genômica. A proliferação celular desordenada pode desencadear erros, ocasionando novas mutações e aberrações cromossômicas. A superexpressão do c-Myc, mesmo que transitoriamente, parece induzir instabilidade cromossômica, caracterizada por ampliações, aneuploidias e poliploidias (LEVENS, 2002). Outros estudos sugerem que a proteína C-Myc promove a produção de radicais livres pelas mitocôndrias, acarretando em danos ao DNA e, assim, instabilidade genômica (AMATI et al., 1998). A proteína C-Myc também apresenta importante papel na diferenciação celular. Demonstrou-se que a baixa expressão de C-Myc é acompanhada de diferenciação precoce e parada permanente da ciclagem celular (CANELLES et al., 1997). Por outro lado, a expressão ectópica de C-Myc é suficiente para bloquear os mecanismos de diferenciação celular (ONCLERCQ et al., 1989).

Liao et al. (2003) e Amariglio et al. (2007) identificaram a presença de mutações e algumas modificações na expressão do gene c-Myc em tumor venéreo transmissível de cães, por técnicas de PCR e PCR *in situ*. Inoue et al. (1999) concluíram que cada um dos cinco adenocarcinomas mamários de cadelas analisados, expressaram a proteína C-Myc, assim como os tumores benignos de origem epitelial. Embora a ligação entre este gene supressor e o câncer esteja bem estabelecida, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, os mecanismos

moleculares que promovem a transformação maligna mediada pelo c-Myc não são completamente conhecidos.

Embora haja um grande número de evidências que sugerem que os genes p53 e c-Myc influenciem nos processos neoplásicos de origem epitelial em humanos e em animais, estudos ainda não demonstraram as suas atividades nos processos tumorigênicos em neoplasias de pálpebra de cães.

7. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA DETECÇÃO E EXPRESSÃO DE GENES SUPRESSORES DE TUMOR

A análise laboratorial de possíveis alterações destes genes supressores pode ser realizada por métodos distintos. A técnica molecular empregada como rotina laboratorial é a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a verificação da presença dos genes, e a reação em cadeia pela polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) para a detecção de suas respectivas expressões. A reação de PCR é considerada um método sensível e de baixo custo para rotina laboratorial (VASCONCELLOS, 2008).

A PCR tem sua principal aplicação quando a quantidade de DNA disponível é reduzida, e também, em procedimentos científicos de Biologia Molecular como amplificação para gerar mutagênese, detecção de mutações ou preparação de fragmentos de DNA para clonagem (inserção em plasmídeo, por exemplo), e ainda, para identificação de patógenos. Para a visualização dos possíveis produtos amplificados, utiliza-se a técnica de eletroforese em gel de

agarose, que se é um método laboratorial útil e de baixo custo (CHAN et al., 2001, LOPES et al., 2007).

A eletroforese em gel de agarose é uma técnica de separação de moléculas que envolve a migração de partículas em um determinado gel durante a aplicação de uma diferença de potencial elétrico. As moléculas são separadas de acordo com o seu tamanho (peso molecular), sendo que as de menor peso molecular migram mais rapidamente do que as de maior peso. Em alguns casos, o formato das moléculas também tem influência nesta migração, devido a sua maior facilidade em migrar pelo gel. A eletroforese normalmente é utilizada para separar proteínas e moléculas de DNA e RNA (COMMBS, et al., 1999; COX et al., 2006).

Outro método de visualização dos produtos oriundos de uma reação de PCR é a técnica de PCR ELISA. Neste procedimento os produtos de uma reação da PCR são visualizados e quantificados por meio de uma reação de ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay). Este procedimento, ainda permite a aferição das sequências internas dos produtos de uma PCR, um método mais econômico e alternativo que o PCR em tempo real (Real Time PCR) (ZHANG et al., 2000; MANKOC, et al., 2007).

A extração de DNA e RNA a partir de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina é difícil, caro e requer muito cuidado. Inicialmente, alguns autores reportaram a impossibilidade da análise de DNA e RNA extraídos em tecidos nestas condições (GREER et al., 1991; GALL et al., 1993). Porém,

estudos recentes comprovaram por diferentes métodos de extração que é possível extrair os ácidos nucléicos a partir de blocos parafinados de tecidos fixados em formol. COOMBS et al. (1999), KORBNER et al. (2003), BONIN et al. (2005), COX et al. (2006), LOPES et al. (2007) e GILBERT et al. (2007) reportaram que é possível a extração de DNA e RNA íntegros, por diferentes métodos a partir de fragmentos de tecidos formolizados e embebidos em parafina. DIGGLE et al. (2003), SHI et al. (2004), RIVERO et al. (2006) e CHAN et al. (2006) utilizaram diferentes protocolos para a extração de DNA a partir de tecidos sob as mesmas condições, e concluíram que trata-se de um método simples e adequado na qual se obtém um DNA de qualidade, o qual pode ser amplificado facilmente numa reação de PCR.

4. REFERÊNCIAS

AMARIGLIO, E.N. et al. Identity of rearranged LINE/c-MYC junctions sequences specific for the canine transmissible venereal tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.88, p.8136-8139, 2007.

AMATI, B., ALEVIZOPOULOS, K., VLACH, J. Myc and the cell cycle. *Front Biosci*, v.3, p. 250-268, 1998.

ANDRADE, A.L., et al. Clinical Trial with ⁹⁰Strontium low radiation for treatment of third eyelid neoplasms in dogs. On-line: www.ivis.org. Document n° P3028.0903.

AQUINO, S.M. Management of eyelid neoplasms in the dog and cat. *Clinic Technology Animal Practice*, v.22, n.2, p.46-54, 2007.

BISTNER, S.I. Olho e órbita. In: *Slatter: Manual de Cirurgia de Pequenos Animais*, 2 ed., v.2, cap 158, p.2553-65, 1998.

BONIN, S., et al. DNA and RNA obtained from Bouin's fixed tissues. *Journal of Clinical Pathology*, v.58, p.313-316, 2005.

BONNEY, C.H., et al. Papillomatosis of the conjunctiva and adnexa in dogs. *The Journal of American Veterinary Medical Association*, v.176, p.48-51, 1980.

CANELLES, M., et al. Max and inhibitory C-MYC mutans induce erythroid differentiation and resistance to apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Oncogene*, v.14, p.315-327, 1997.

CARVALHO, T., et al. Immunohistochemical studies of epithelial cell proliferation and p53 mutation in bovine ocular squamous cell carcinoma. *Veterinary Pathology*, v.42, n.1, p.66-73, 2005.

CHAN, P.K.S., et al. Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplifications of human and viral DNA. *Journal of Clinical Pathology*, v.54, p.401-403, 2001.

COMMBS, N.J., GOUGH, A.C., PRIMORSE, J.N. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissues. *Nucleic Acids Research*, v.27, n.16, p.12, 1999.

COX, M.L., et al. Assessment of fixatives, fixation, and tissue processing on morphology and RNA integrity. *Experimental and Molecular pathology*, v.80, p.183–191, 2006.

DANG, C.V. C-MYC targeted genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol. Cell Biol.*, v.19, p. 1-11, 1999.

DEVILEE, P., et al. The canine p53 gene is subject to somatic mutations in thyroid carcinoma. *Anticancer Research*, v.14, n.5A, p.2039-46, 1994.

DIGGLE, P., BENTLEY, J., KILTIE, A.E. Development of a rapid, small-scale DNA repair assay for use on clinical samples. *Nucleic Acids Research*, v.31, n.15, p.83, 2003.

Dubielzig, R. R. Ocular neoplasia in small animals. *Vet Clin North Am Anim Pract* v.20, n.3, p.837-48, 1990.

FACCHINI, L.K., PENN, L.Z. The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *FASEB J.*, v.12, p.633-651, 1998.

FARIA, M.H.G., RABENHORST, S.H.B. Impacto do oncogene C-MYC no câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v.52, n.2, p.165-171, 2005.

FUJIWARA, T., et al. Multicenter phase I study of repeated intratumoral delivery of adenoviral p53 in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v.24, n.11, p.1689-1699, 2006.

GALL, C.E., et al. DNA amplification by polymerase chain reaction from brain tissues embedded in paraffin. *International Journal of Experiment Pathology*, v.74, p.333-337, 1993.

GILBERT, M.T.P., et al. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? *Plos One*, v.6, p.537, 2007.

GREER, C.E., et al. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. *American Journal of Clinic Pathology*, v.5, n.2, p.117-24, 1991.

HIRAI, T., et al. Apocrine gland tumor of the eyelid in a dog. *Veterinary Pathology*, v.34, p.232-234, 1997.

INOUE, M., SHIRAMIZU, K. Immunohistochemical detection of p53 and c-myc proteins in canine mammary tumors. *Journal of Comparative Pathology*, v.120, p.169 – 175, 1999.

JIANG, W., et al. p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation. *Oncogene*, v.18, p.4247-4253, 1999.

JOHNSON, A.S., COUTO, C.G., WEGWORST, M. Mutation of the P53 tumor suppressor gene in spontaneously occurring osteosarcomas of the dog. *Carcinogenesis*, v.19, n.1, p.213-217, 1998.

KELLER, S.M., et al. A comprehensive test system to identify suitable antibodies against p53 for immunohistochemical analysis of canine tissues. *Journal of Comparative Pathology*, v.37, p.59-70, 2007.

KIRK, N.G. Doenças e cirurgia da terceira pálpebra do cão. Em: Manual de Oftalmologia Veterinária, Primeira edição brasileira, Ed. Manole, cap.6, p.120-121, 2003

KORBLER, T., et al. A simple method for RNA isolation from formalin-fixed end paraffin embedded lymphatic tissues. *Experimental and Molecular Pathology*, v.74, p.336-340, 2003.

KREHBIEL, J.D., LANGHAN, R.F. Eyelid neoplasms of dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v.36, p.115-119, 1975.

LEE, C., et al. Mutation and overexpression of P53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Science*, v.5, n.1, p.63-69, 2004.

LEE, C., KWEON, O. Mutations of P53 tumor supressor gene in spontaneous canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Science*, v.3, n.4, p.321-325, 2002.

LEVENS D., LEON, J., EILERS, M. Contributions of Myc to tomorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, v.1602, p.61-71, 2002.

LEVINE, R.A. Overexpression of the sis oncogene in a canine osteosarcoma cell line. *Veterinary Pathology*, v.39, p.411-412, 2000.

LIAO, K., et al. Identification of canine transmissible venereal tumor cells using in situ polymerase chain reaction and the stable sequence of the long interspersed nuclear element. *Journal of Veterinary Diagnostic Investimen*, v.5, p.399-406, 2003.

LIN, H.Y. et al. Incidence of euelid cancers in Taiwan: a 21-year review. *Ophthalmology*, v.113, n.11, p. 2101-2107, 2006.

LOPES, R.A. et al., Comparação entre técnicas de extração de RNA a partir de blocos parafinados para o diagnóstico de tumores oculares em cães. In: SEMANA DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA DA FOA UNESP, 7., 2007, Araçatuba. Resumos...Araçatuba: SDVC, 2007. CD-ROM.

LUSCHER, B., EISENMAN, R.N. New light on Myc and Myb. *Genes Dev.*, v.4, p. 2025-2035, 1990.

MANKOC, S., et al. Comparison of different molecular methods for assessment of equine arteritis virus (EAV) infection: A novel one-step MGB real-time RT-PCR assay, PCR ELISA and classical RT-PCR for detection of highly diverse sequences of Slovenian EAV variants. *Journal of Virological Methods*, v.146, p.341-354, 2007.

MAYR, B., et al. Canine tumour suppressor gene p53--mutation in a case of adenoma of circumanal glands. *Veterinary Research Community*, v.21, n.5, p.369-373, 1997.

MAYR, B., et al. Sequence of an exon of the canine p53 gene--mutation in a papilloma. *Brasilian Veterinary Journal*, v.150, n.1, p.81-84, 1994.

MELKOUMIAN, Z.K., MARTIROSYAN, A.R., STROBL, J.S. Myc protein is differentially sensitive to quinidine in tumor versus immortalized breast epithelial cell lines. *Int. J. Cancer*. v.102, p.60-69, 2002.

MORGAN, G. Ocular tumors in animals. *Journal of Small Animals Practice*, v.10, n.10, p.563-70, 1969.

MORRISON, W.B., VONDERHAAR, M.A., RICHARDSON, R.C. Biologia da moléstia neoplásica. In: *Slatter: Manual de Cirurgia de Pequenos Animais*, segunda edição, v. 2, cap.148, p.2387, 1998.

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

ONCLERCQ, R., BABINET, C., CREMISI, C. Exogenous C-MYC gene overexpression interferes with early events in F9 cell differentiation. *Oncogene Res.*, v.4, p. 293-302, 1989.

PELENGARIS, S., KHAN, M., EVAN, G. C-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat. Rev. Cancer*. v.2, p.764-766, 2002.

PINHO, M.S.L. Proteína P53: algum valor clínico ou apenas pesquisa? Uma revisão da literatura. On-line: <http://www.sbcp.org.br/revista>. Documento nº:P258_260.

POPOV, Z., et al. The prognostic value of p53 nuclear overexpression and MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder. *American Cancer Society*, v.80, n.8, 1472-1481, 1997.

RIVERO, E.C., NEVES, A.C., SILVA-VALAZUELA, M.G. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathology Research and practice*, v.202, p.523-529, 2006.

ROBBINS, S.L., COTRAN, V. Neoplasias In: Patologia – Bases Patológicas das Doenças. 7ª edição, ed, Saunders, v.7, p.310 – 318, 2005.

ROBERTS, S.M., SEVERIN, G.A., LAVACH, J.D. Prevalence and treatment of palpebral neoplasms in the dog: 200 cases (1975-1983). *The Journal of American Veterinary Medical Association*, v.189, n.10, p.355-59, 1986.

SHEINESS, D., BISHOP, J.M. DNA and RNA from uninfected vertebrate cells containing nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus. *Journal of Virology*, v.31, p.514-521, 1979.

SHI, S., et al. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin embedded tissues: heat induced retrieval in alkaline solution. *Histochemical Cell Biology*, v.122, p.211-218, 2004.

SHIMADA, H., et al. Phase I/II adenoviral p53 gene therapy for chemoradiation resistant advanced esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Science*, v.97, n.6, p.554-561, 2006.

SPOTTS, G.D., et al. Identification of downstream-initiated C-MYC proteins which are dominant-negative inhibitors of transactivation by full length C-MYC proteins. *Mol. Cell Biol.*, v.17, p. 1459-1468, 1997.

TAUB, R. et al. Translocation of the C-MYC gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmocytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* n.79, p.7837-7841, 1982.

TOLCHER, A.W., et al. Phase I, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of intravenously administered Ad5CMV-p53, an adenoviral vector containing the wild-type p53 gene, in patients with advanced cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v.24, n.13, p.2052-2058, 2006.

VAN LEEUWEN, I.S., et al. P53 gene mutations in osteosarcomas in the dog. *Cancer Letters*, v.111, n.1-2, p.173-178, 1997.

VAN LEEUWEN, I.S., et al. P53 mutations in mammary tumor cell lines and corresponding tumor tissues in the dog. *Anticancer Research*, v.16, n.6B, p.3737-3744, 1996.

VASCONCELLOS, J.F., et al. Otimização do método de detecção do gene PML-RAR para PCR quantitativo. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v.44, n.1, p.7-10, 2008.

VELDHOEN, N., et al. Isolation of canine p53 cDna and detailed characterization of the full length canine p53 protein. *Oncogene*, v.16, p.1077-1084, 1998.

VELDHOEN, N., et al. Mutations of the p53 gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53 mutations in the dog. *Oncogene*, v.16, n.2, p.249-255, 1998.

WANG, J.K., et al. Malignant eyelid tumours in Taiwan. *Eye*, v.17, n.2, p.216-220, 2003.

WILLIAMS, L.W., GELATT, K.N. Ophthalmic neoplasms in the cat. *J A Anim Hosp Assoc.*, v.17, p.999-1008, 1981.

WILLIS, A.M., WILKIE, D.A. Ocular Oncology. *Clinical Techniques of Small Animal Practice*, v.16, n.1, p.77-85, 2001.

ZHANG, P., et al. Improved diagnosis of porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis* using polymerase chain reaction-enzyme-linked oligosorbent assay (PCR-ELOSA). *Molecular and Cellular Probes*, v.14, n.2, p.101-108, 2000.

ZUCCARI, D.A., et al. Immunocytochemical study of Ki-67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. *Veterinary Clinic Pathology*, v.33, n.1, p.23-28, 2004.

CAPÍTULO 2: ARTIGO

DETECÇÃO E EXPRESSÃO DOS GENES SUPRESSORES p53 E c-Myc EM TUMORES PALPEBRAIS DE CÃES

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram detectar a presença e a expressão dos genes supressores p53 e c-Myc em tumores palpebrais, pelas técnicas de PCR, RT-PCR, PCR-ELISA E RT-PCR-ELISA que até o então não foram descritas nestes tumores e nesta espécie. Foram utilizadas 10 amostras de tumores que foram fixados em formol e incluídos em parafina. O material foi obtido junto aos arquivos do Serviço de Patologia Veterinária, sendo nove amostras de tumores localizados nas pálpebras e terceira pálpebra e uma de tumor mamário para controle. Todos os tumores tiveram o seu diagnóstico firmado empregando-se a coloração de H.E e imunohistoquímica para citoqueratina AE1/AE3 e vimentina (V9), marcadores de tecido epitelial e mesenquimal, respectivamente. Os resultados indicaram que os tumores palpebrais e da terceira pálpebra aqui estudados verificou-se a presença do gene supressor p53 em 8 amostras (88,8%, n=8), e entre as amostras positivas (n=8), ele esteve expresso em 75 % delas. O gene supressor c-Myc esteve presente em 5 amostras (55,5%) e com expressão em 100% delas (n=5). Foi possível concluir que os tumores palpebrais e da terceira pálpebra de cães expressam o p-53 e c-Myc identificados pelas técnicas de PCR e RT-PCR, no entanto, as técnicas de PCR ELISA e RT-PCR ELISA foram mais importantes para avaliação da presença e expressão do oncogenes estudados, pois permitiram identificar produtos amplificados que não foram visualizados em gel de agarose.

Palavras-chave: tumores palpebrais, p53, c-Myc, PCR, RT-PCR, PCR ELISA, RT-PCR ELISA, cão.

DETECTION AND EXPRESSION OF SUPPRESSOR GENES p53 and c-Myc IN EYELID TUMORS OF DOGS

SUMMARY

The aims of this study were to detect the presence and the expression of p53 and c-Myc suppressor genes in eyelid tumors of dogs, by the PCR, RT-PCR, PCR-ELISA and RT-PCR-ELISA techniques, which until then they were not described in these tumors and in this specie. Ten samples of tumors were fixed in formalin and included in paraffin. The material was obtained from the archives of the Department of Veterinary Pathology, being nine samples of epithelial tumors located in the eyelids and the third eyelid, and a breast tumor which was used as a positive control of the reactions. All the samples had reached their diagnosis employing up the HE technique, and the immunohistochemistry for cytokeratin AE1/AE3 and vimentin (V9). The results showed that the eyelid and the third eyelid tumors, here studied, (88.8%, n=8) of them demonstrated the presence of the p53 gene and between the positive samples (n=8), the expression was around 75%. The c-Myc gene was present in 55.5% (n=5) of the samples, with 100% of expression (n=5). Thus, it was possible to conclude that the eyelid and the third eyelid tumors of dogs express the p53 and c-Myc genes, identified by the techniques of PCR and RT-PCR, however, the PCR ELISA and RT-PCR ELISA techniques were of extreme importance for assessing the presence and expression of these studied genes, and they allowed to identify amplified products that were not visible on the electrophoresis on the agarose gel.

Key-words: Eyelid tumors, p53, c-Myc, PCR, RT-PCR, ELISA PCR, RT-PCR ELISA and dog.

2.1 Introdução

A ocorrência de tumores oculares em pequenos animais é baixa. Em cães, 75% a 80% destes tumores são benignos e acometem, principalmente, as pálpebras de animais entre nove e 10 anos de idade (KREHBIEL, 1975; WILLIS, 2001). Os tumores das estruturas extra-oculares (pálpebras, conjuntiva e terceira pálpebra) são mais facilmente diagnosticados por biópsias aspirativa (citopatologia) e biópsia excisional (histopatologia) (ROBERTS et al, 1986).

Grande parte dos tumores extra-oculares é de origem epitelial, sendo que as neoplasias de trato uveal são secundárias às metástases, e são de origem melanocítica. Os carcinomas de células escamosas, também conhecidos como carcinoma espinocelular, carcinoma epidermóide ou escamocelular constituem o grupo de tumores malignos epiteliais. Estas lesões originam-se das células epiteliais pavimentosas da epiderme e sua incidência varia de três até 20% do total da ocorrência dos tumores cutâneos (BISTNER, 1998). As pálpebras, conjuntiva e córnea são as estruturas mais freqüentemente afetadas (CARLTON, 1998). Tais tumores são encontrados normalmente em animais com a pele hipopigmentada, onde a exposição crônica à luz solar, originam quadros de dermatite como lesão inicial. À análise macroscópica, observa-se elevação de pele, com aspecto de ferida crônica, geralmente ulcerada, com formato de “couve-flor” e de consistência firme, sendo que em alguns casos, assemelha-se, macroscopicamente, aos papilomas. A lesão tem início como placa eritematosa, progredindo pelos estágios de carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo (BISTNER, 1998).

Pelo grau de malignidade, apresenta comportamento invasivo, abrangendo tecidos adjacentes. Citologicamente observa-se anisocitose, anisocariose, hiperchromasia, figuras mitóticas atípicas com queratinização citoplasmática e nucléolos bem evidentes. Alguns tumores caracterizam-se por células com elevado grau de anaplasia, que se disseminam rapidamente e produzem metástases nos linfonodos regionais e pulmões (MORGAN, 1969).

O estudo, abrangendo os aspectos moleculares das neoplasias em cães ainda se baseia, em grande parte, em técnicas de hibridização *in situ*, que são limitadas a um número pequeno de genes (KUMARAGURUPARAN et al., 2006). O desvendamento do genoma canino tem apresentado constante crescimento na última década, permitindo a aplicação dos seus conhecimentos gerados, na compreensão dos mecanismos envolvidos com a gênese das neoplasias (KIRKNESS et al., 2003).

A evolução das pesquisas em biologia molecular, como importante ferramenta para o estudo de processos neoplásicos, tem identificado uma ampla variedade de marcadores, que podem constituir a base para a estratificação de vários tipos de neoplasias no homem e no cão (LEE et al., 2004). Um grande número genes foi identificado durante os últimos 20 anos. Estes genes, assim como suas proteínas codificadas, têm múltiplos papéis, participando nas funções celulares relacionadas com o crescimento e proliferação celular (ROBBINS E COTRAN, 2005). Muitos deles têm como foco, a investigação do papel do gene supressor de tumor p53, o qual foi atribuído um papel significativo no desenvolvimento da carcinogênese do homem e dos

cães. A partir de então, observa-se uma vasta literatura na busca do real valor potencial e aplicabilidade clínica deste gene supressor (MUTO et al., 2000).

O gene p53, também denominado de “guardião do genoma”, está localizado no cromossomo 17 e no cromossomo 5, no homem e no cão, respectivamente, e é o alvo mais comum para alterações genéticas dos tumores em humanos e nos animais. Mutações neste gene estão presentes em cerca de 50% dos tumores humanos. A perda da atividade do gene p53 pode ocorrer em todos os tipos de câncer. O fato das mutações do gene p53 serem comuns em diversos tumores sugere que a proteína P53 participa como “guardiã crítica” contra a gênese do câncer, fato que evidencia o seu papel no impedimento da programação de células geneticamente alteradas (ROBBINS, 2005). Assim, esta fosfoproteína nuclear codificada pelo gene p53 possui algumas funções específicas como agente supressor da proliferação celular, na reparação do DNA e desempenha um papel importante na indução da morte celular programada (apoptose) (MUTO et al., 2000; JOHNSON et al., 1998; KOEING et al., 2003).

Estudos recentes deduzem, ainda, que a codificação da seqüência de aminoácidos para a proteína P53 em cães apresenta homologia de aproximadamente 80% com a seqüência humana e algumas anormalidades, como a mutação gênica do p53, têm sido documentadas em carcinomas da tireóide, papiloma oral, adenomas, linfomas, osteossarcomas, carcinomas mamários e melanomas de cães (LEE et al., 2004; MUTO et al., 2000). Tais mutações do p53 também têm sido relatadas na patogênese de inúmeros tipos

de câncer no homem e no cão, assim como o comportamento biológico agressivo dos tumores, prognósticos reservados e alterações nas respostas terapêuticas (JOHNSON et al., 1998; LEE et al., 2002).

O gene supressor de tumor c-Myc tem sido apontado como peça central na carcinogênese em diversos tumores (LEE et al., 2002). Estudos recentes demonstraram a participação direta e indireta da proteína C-Myc como agente regulatório do ciclo celular, metabolismo, apoptose, instabilidade genômica e sensibilidade a fármacos quimioterápicos (LEE et al., 2004; ROBBINS E COTRAN, 2005; LEE et al., 2002).

A ativação inadequada do gene c-Myc, que contribui para o desenvolvimento das neoplasias no homem, pode ocorrer por diferentes mecanismos, como translocações cromossômicas, amplificação gênica e inserção de retrovírus adjacentes ao gene. Outros estudos sugerem que esta proteína promove a produção de radicais livres pelas mitocôndrias, acarretando danos ao DNA e, desta forma, gerando instabilidade genômica (ROBBINS, 2005; FARIA, 2006).

Embora a ligação entre o gene c-Myc e o câncer esteja bem estabelecida, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, os mecanismos moleculares que promovem a transformação maligna mediada pelo c-Myc não foram completamente desvendados. A super-expressão do gene c-Myc tem sido verificada em uma grande variedade de neoplasias e os esforços têm se voltado para melhor compreender as intrincadas vias moleculares reguladas por ele e seu possível impacto frente às mesmas (FARIA, 2006).

Há relatos da expressão do c-Myc em tumor venéreo transmissível (TVT) em cães oriundos de diferentes países, bem como em melanomas, osteossarcomas, carcinomas e tumores de mama (LEVINE, 2002; LIAO et al., AMARIGLIO, 1991). No entanto, não foram encontrados relatos sobre a expressão dos genes supressores de tumor p53 e c-Myc e suas mutações nos tumores dos anexos oculares do homem e do cão. Sendo assim, a pesquisa ora encetada poderá colaborar para a melhoria no que tange ao diagnóstico, prognóstico e terapêutica do câncer do bulbo ocular e seus anexos, em cães. Este trabalho teve por objetivos detectar a presença e a expressão dos genes supressores de tumor p53 e c-Myc em tumores palpebrais e da terceira pálpebra de cães pelas técnicas de PCR, RT-PCR, PCR-ELISA E RT-PCR-ELISA.

2.2 Materiais e Método

2.2.1 Amostras

As amostras estudadas foram obtidas junto ao Serviço de Patologia Veterinária, onde foram selecionados nove casos de tumores dos anexos oculares no período de 1998 a 2005. Foram colhidos fragmentos para as seguintes análises: 1) anatomopatológica; 2) imunoistoquímica para citoqueratina e vimentina; 3) PRC para identificação dos genes p53 e c-Myc e 4) RT-PCR para identificação de suas respectivas expressões. A fim de se verificarem os produtos amplificados que não foram observados no gel de agarose, foram realizados o PCR ELISA e RT-PCR ELISA, que se

apresentam como método mais sensível (MANKOC et al., 2007). Para tanto, dos blocos parafinados foram retirados três cortes em secções de 10 micrômetros (10 μ m) e armazenados em microtubos de 1,5ml de polipropileno autoclavados. Em cada microtubo, foram acondicionados três cortes histológicos, totalizando 30 μ m de fragmentos a serem analisados, que ficaram armazenados em temperatura ambiente até o momento do início do processo de desparafinização, digestão e extração do DNA e RNA (BHUDEVI, 2003).

2.2.2 Avaliação Anatomopatológica dos tumores

Os fragmentos para análise anatomopatológica foram provenientes de peças cirúrgicas que foram fixadas em formol tamponado a 10 % por no mínimo 72 horas e, posteriormente, incluídos em parafina. Dos blocos foram obtidos fragmentos de 3 a 4 μ m, que foram corados rotineiramente pela coloração de H.E. (Hematoxilina¹ e Eosina²) e analisados por microscopia de luz. As lâminas foram avaliadas por um único patologista e, posteriormente, foram documentadas por fotos.

¹ Eosin Y (2',4',5',7'-tetrabromofluoresceína)- C₂₀H₃Br₄O₅, Sigma Chemical CO. St Louis, EUA

² Hematoxilina (C₁₆H₁₄O₆, PM 302,29), Cromato Produtos Químicos LTDA. Indústria Brasileira. Rua Goioerê, 01, Diadema/SP

2.2.3 Imunoistoquímica

Os cortes histológicos foram submetidos à imunomarcação para citoqueratina (AE1/AE3; Dako®) e vimentina (V9; Dako®) para confirmação da origem epitelial dos tumores. Inicialmente, realizou-se a desparafinização do tecido em xilol, à temperatura ambiente por 30 minutos. A hidratação dos cortes foi realizada utilizando-se concentrações decrescentes de álcool. A recuperação antigênica pelo calor foi realizada em forno microondas com solução de citrato 10 mL (pH = 6.0) (2,1 g de ácido cítrico monohidratada diluídos em 1000 mL de água destilada) em duas etapas de fervura de 5 minutos cada, deixando-se o material esfriar em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em água corrente e, em seguida, procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena com uma solução de 100 mL de água oxigenada (20V) diluída em 100 mL de metanol, durante 30 minutos. Na seqüência, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários (anti-citoqueratina e anti-vimentina, Dako®-Cytochemicon), por 18 horas a uma temperatura de 4^oC em câmara úmida e, como controle negativo, não se utilizou o anticorpo primário sobre os tecidos. Ato contínuo, as lâminas foram lavadas em solução tampão PBS (pH=7,4). A incubação com o “kit” LSAB (Dako®), que contempla o anticorpo secundário, ocorreu durante 30 minutos em câmara úmida. Em seguida, as lâminas foram submetidas à passagem em solução tampão. As diluições usadas foram 1:300 para a citoqueratina (AE1/AE3) e 1:400 para a vimentina (V9) em 1% de soroalbumina bovina (SAB), cujas diluições foram padronizadas previamente. A revelação foi

conduzida utilizando-se o cromógeno diaminobenzidina (DAB), com sucessivas lavagens em solução tampão, água corrente e água destilada. Por fim, foi realizada a contra-coloração com Hematoxilina de Mayer (Dako®), 5,0 mL por lâmina e lavagem em água destilada. As lâminas foram desidratadas em lavagens crescentes de alcoóis e xilol e, posteriormente, montadas em resina sintética.

2.2.4 Tratamento para extração do DNA e RNA

As amostras dos tecidos foram cortadas em três fragmentos de 10µm cada e colocadas em microtubos estéreis, livres de DNase e RNase. Aos microtubos contendo os cortes, foram adicionados 1,5 mL de xilol, e logo aquecidos em Banho-Maria a 56°C por 10 minutos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados (13.000Xg) a 4°C, durante cinco minutos. O líquido sobrenadante foi desprezado e este procedimento foi repetido na íntegra por mais duas vezes. Em seguida, foram adicionados 1,5mL de etanol absoluto com agitação durante trinta segundos, sendo então os microtubos centrifugados (13.000Xg) por cinco minutos a 4°C. O sobrenadante (etanol) foi desprezado e tal procedimento foi repetido por três vezes, mas utilizando-se, agora, concentrações decrescentes de álcool a fim de se promover a hidratação dos tecidos. Na seqüência, aos microtubos foi adicionado 1,0mL de tampão de lise (Tris 200mM; EDTA 10mM; SDS 0,4%; NACl 400mM)) conjuntamente com 5,0µL de proteinase K (Gibco-BRL®) na concentração de 1mg/mL. Os tubos foram colocados em Banho-Maria a 56°C e a digestão dos

tecidos foi acompanhada até a sua finalização, porém a adição da enzima teve que ser repetida quatro vezes, em média, em mesma quantidade do que a inicial, pois a mesma possui ação entre três a quatro horas. Finalizada a digestão dos tecidos, a temperatura do Banho-Maria foi elevada a 90°C por 10 minutos para a inativação da proteinase K.

As amostras agora já desparafinadas e digeridas foram submetidas ao processamento de extração do DNA, pelo método do Acetato de Amônio 4 M (RIVERO et al., 2006) e de RNA, pelo método do Trizol®, segundo instruções do fabricante (Invitrogen™).

2.2.5 Extração de DNA pelo método do Acetato de Amônio 4 M

Logo após a digestão, as amostras foram submetidas à extração de DNA com Acetato de Amônio 4M para o mesmo volume da solução de lise contendo o tecido digerido. Esta mistura permaneceu em descanso no gelo por cinco minutos sendo centrifugada (13.000Xg) por 13 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Em seguida, foi adicionado 1mL de isopropanol em cada novo microtubo e estes foram centrifugados (13.000Xg) durante 10 minutos na mesma temperatura. Ato contínuo, o sobrenadante foi descartado e a ele foram adicionados 200µL de etanol 75%. As amostras foram novamente submetidas à centrifugação sob as mesmas condições anteriores, e em seguida o etanol foi descartado. Para ressuspender o DNA extraído foi adicionado 20µL de H₂O NaOH 4M. As

amostras foram armazenadas à temperatura de -80°C até o processamento do PCR. O procedimento acima descrito foi realizado de acordo com Rivero et al. (2006) com algumas modificações.

2.2.6 Extração do RNA total – método do Trizol

Logo após a desparafinização, as amostras foram submetidas ao processo de extração do RNA com Trizol® em uma única etapa, utilizando-se fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (50:49:1). Em seguida, os tubos foram centrifugados (13.000Xg/4°C/10 min). O sobrenadante foi desprezado e o sedimento contendo o RNA foi lavado com 1mL de etanol 70% e novamente centrifugado a 7500Xg/4°C/5min. O *pellet* formado foi submetido à evaporação do etanol remanescente, diluído em 20µL de água ultra-pura adicionada de DEPEC (Diethyl Pirocarbonato, Sigma, D5758). Os tubos foram conservados a -80°C para posterior processamento de síntese do cDNA (Transcrição reversa – RT) (COX et al., 2006). A quantificação de RNA e DNA foi realizada em espectrofotômetro Eppendorf® Biophotometer (Ag. 22331).

2.2.7 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

As amostras de DNA e RNA extraídos foram submetidas à purificação utilizando uma enzima para a digestão de moléculas de proteínas inespecíficas (Protein Degradation®) e RNase (Invitrogentm), respectivamente em Banho-Maria, 56°C, por uma hora. Em seguida foi realizada a PCR para amplificação

de fragmentos de DNA dos genes p53 e c-Myc e do gene constitucional canino beta-actina, que amplificam fragmentos de 356pb, 317pb e 627pb, respectivamente (Quadro 1). Foram adicionados aos microtubos de PCR: 5µL de DNA, 41,5µL de PCR-SuperMix®, 1µL de cada oligonucleotídeos iniciadores biotinizados, 7µL MgSO4 e 1µL da enzima TAQ Platinum®.

A reação de PCR seguiu as seguintes condições:

- | | |
|---|-------------|
| 1º. - 94°C durante 5 minutos – desnaturação inicial | } 40 ciclos |
| 2º. - 94°C durante 15 segundos | |
| 3º. - 55°C durante 30 segundos – anelamento | |
| 4º. - 68°C por 1 minuto – extensão | |
| 5º. - Extensão final a 68°C por 10 minutos | |

Quadro 1 - Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) do gene constitucional canino e dos genes supressores p53 e c-Myc utilizados na reação de PCR.

<i>Primers</i>	Peso molecular (PM)	Seqüência de <i>primers</i>	Denominação dos <i>primers</i> (concentração)
<i>Beta Actina</i>	627 pb	5'-GGGCCAGAAGGACTCCTACGT-3' Biotin 5'-CGGAACCGCTCGTTGCCA-3'	ACT2+562 (18.6 nmoles) ACT3-914 (20.1 nmoles)
<i>P53</i>	356 pb	5'-TTGCCAGCTGGCGAAGACCTG-3' Biotin 5'-ACCTCGGGTGGCTCATAAGGCA-3'	P53+767 (23.5 nmoles) P53-1123 (17.7 nmoles)
<i>c-Myc</i>	317 pb	5'-ATGCACCAAGATTTTCTTCACTGC-3' Biotin 5'-TCCTAGAGAAGAACACAGGCAACAC-3'	MycT1+ (153.2 nmoles) MycT4- (164.2 nmoles)

2.2.8 RT-PCR em uma única etapa

As amostras de RNA extraídos foram submetidas ao protocolo ao RT-PCR (Kit Superscript III®) para a verificação da expressão dos genes em questão (p53 e c-Myc) e do gene constitucional canino como controle positivo da reação. As reações foram realizadas com: 2µL de RNA total em 25µL do Tampão 2X do Kit SSIII *one step* (TAQ Platinum ® High Fidelity), adicionados de 2µL de cada oligonucleotídeos iniciadores (p53 e c-Myc) e do constitucional canino beta-actina e 2µL da suspensão de RT-TAQ que ficaram incubados durante 30 minutos a 50°C. Para a reação de RT-PCR, os tubos foram acondicionados no termociclador (MJ Research-Eppendorf®) sob as seguintes condições:

1º. - 94°C - 5'	} 40 ciclos
2º. - 94°C - 15''	
3º. - 55°C - 30''	
4º. - 68°C - 1'	
5º. - 68°C - 10''	

Tanto os produtos da PCR como da RT-PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% com 0,5µg/mL de brometo de etídeo, cujas imagens foram detectadas e documentadas pelo sistema KODAKDC290 *Digital Camera*.

2.2.9 PCR ELISA E RT-PCR ELISA

A técnica de ELISA foi aplicada junto aos produtos oriundos de possíveis ampliações das amostras submetidas aos protocolos de PCR e RT-PCR.

As amostras da PCR e RT-PCR foram submetidas a três diluições (1:25, 1:50 e 1:100) em tampão carbonato bicarbonato (pH=9.66). Estas diluições foram aplicadas em duplicata no volume de 50µL por cavidade, em microplacas (Maxisorpt®) e incubadas à temperatura de 37°C, durante duas horas. Em seguida, as placas foram lavadas com solução PBS Tween 0,05% por cinco vezes, utilizando-se um volume de 100µL por cavidade e, em seguida, foram secas. O bloqueio foi realizado com 100µL de leite desnatado 10%, a 37°C, por duas horas. Entre as etapas as placas foram lavadas por cinco vezes com 100µL de solução de PBS - Tween 0,05%. Em seguida, foram adicionados 50µL por cavidade do conjugado (Streptoavidina-HRP, Zymed®, 1:100) e incubadas por 40 minutos, a 37°C. Adicionou-se 5mg orto fenilenodiamina (OPD, Sigma®) diluído em 12 mL de solução citrato-fosfato (pH=5) adicionado de 50µL de H₂O₂ 3%. Incubou-se por 15 minutos, em temperatura ambiente. Logo em seguida, a reação foi interrompida com a adição de 25µL de HCl 2M. A leitura foi realizada em um leitor de ELISA (Multiskanreader, Labsystem®) utilizando filtro de 492nm.

2.2.10 Determinação do ponto de corte e da curva padrão do ELISA

Para que os resultados dos procedimentos de PCR-ELISA e de RT-PCR-ELISA pudessem ser avaliados, um gráfico, contendo sucessivas diluições e suas respectivas densidades ópticas, foi confeccionado a partir do produto da amplificação do gene constitucional canino (β -actina) nas amostras dos tumores. Este produto foi submetido a 13 diluições sucessivas (1:25 até 1:202.400 vezes), e as mesmas foram submetidas à técnica de ELISA e os resultados foram avaliados em comprimento de onda 492nm.

Para a determinação do ponto de corte, uma média da densidade óptica das cavidades que não continham amostras (branco) foi calculada. Este valor foi multiplicado por três e assim foi estabelecido o ponto de corte (*cut-off*). Este ponto permaneceu entre as diluições 1:50 e 1:100 e seu valor em comprimento de onda (densidade óptica) foi de 0,123nm. Amostras com densidades ópticas acima deste valor de corte foram consideradas positivas, e as abaixo, consideradas negativas (Figura 1).

Determinação ponto de corte (cut-off)

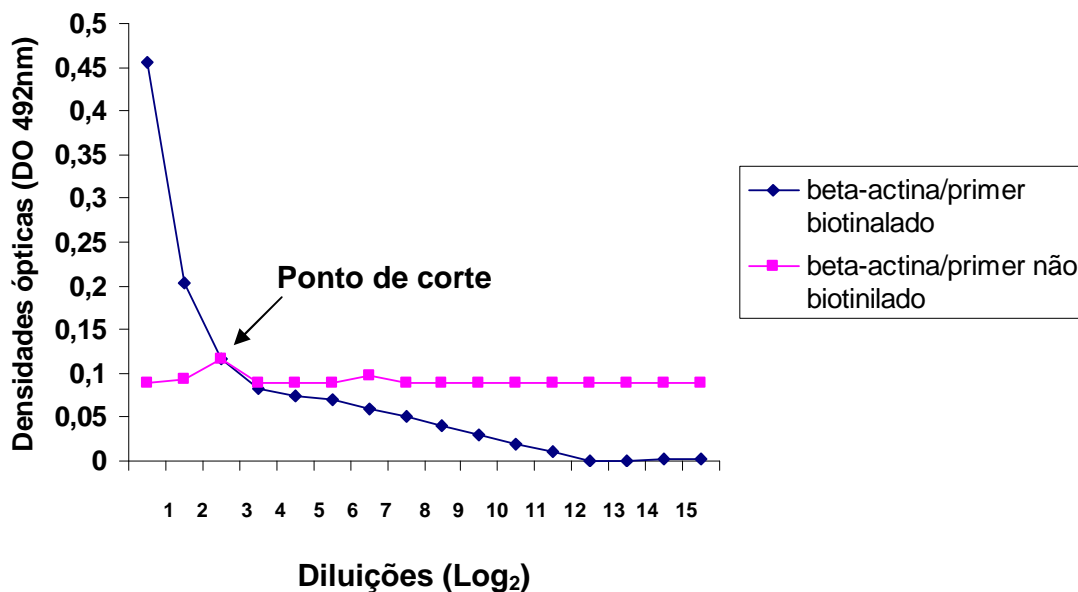


Figura 1 - Determinação do ponto de corte, considerando as densidades ópticas obtidas pela técnica de ELISA. Os valores estão expressos em y = densidades ópticas comprimento de onda 492 nm e x = diluições na razão 2: 1:25; 1:50; 1:100; 1:200; 1:400; 1:800; 1;1600; 1:3200; 1:6400; 1:12.800; 1:25.600; 1:101.200 e 1:202.400. O ponto de corte está destacado como sendo o ponto coincidente entre as leituras positivas e negativas.

2.3 Resultados

2.3.1 Avaliações anatomopatológica e imunoistoquímica

Foram diagnosticados os seguintes tumores: carcinoma escamo-celular (n=4), epiteloma sebáceo (n=2), melanoma (n=1), acrocordon (n=1) e tricoblastoma (n=1). Um tumor de mama com laudo anatomopatológico de carcinoma complexo (n=1) foi utilizado como controle positivo para todas as reações. As lâminas coradas pelo H.E foram utilizadas como controle à

observação das regiões imunomarcadas para citoqueratina (AE1/AE3) e vimentina (V9).

Na imunohistoquímica, todos os fragmentos de tecido neoplásico apresentaram forte expressão das citoqueratinas AE1/AE3 e ausência de imunomarcagem para tecido mesenquimal, exceto no melanoma, confirmando, desta forma, a origem epitelial dos tumores (Figura 2).

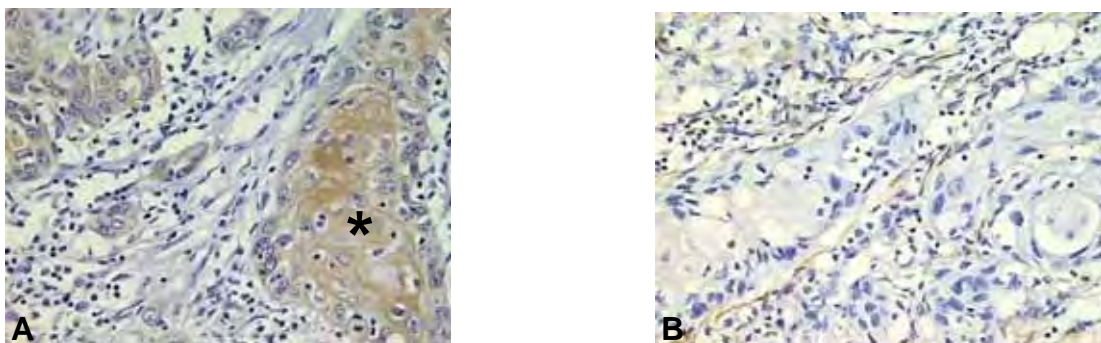


Figura 2 – Imagem fotográfica de cortes histológicos de carcinoma de células escamosas de cão, localizado na terceira pálpebra, submetidos a imunomarcagem para citoqueratina (A) e vimentina (B) (40X). (A) Nota-se as células epiteliais imunomarcadas (*) com a coloração acastanhada. (B) Nota-se a imunomarcagem para vimentina somente dos fibroblastos (amostra 3).

2.3.2 Quantificação do DNA e RNA extraídos e relação A280/260

Foi possível realizar a extração de DNA e RNA dos fragmentos parafinados de tumores palpebrais de cães e quantificá-los pelos métodos descritos. Os valores individuais da quantidade de DNA e RNA extraídos, bem como a relação A260/280, que mensura o grau de pureza dos mesmos encontram-se descritos na Tabela 1. Pelos valores observados, nota-se que foi possível isolar estas moléculas íntegras e não degradadas a partir de tecidos fixados e embebidos em parafina.

Tabela 1 – Quantidade de DNA e RNA extraídos e grau de pureza destas moléculas (relação A260/280) de tumores palpebrais de cães.

Amostra	DNA		RNA	
	[] µg/mL	Relação 260/280	[] µg/mL	Relação 260/280
1	4,70	1.90	0,90	1.43
2	13,80	1.75	2,10	1.29
3	0,80	1.80	1,40	1.34
4	12,20	1.79	3,40	1.56
5	140,00	1.46	4,20	1.25
6	0,60	1.42	1,00	1.45
7	1,20	1.95	2,80	1.35
8	0,70	1.68	0,90	1.43
9	1,00	1.60	1,20	1,39
10	2,20	1.74	5,00	1.54

2.3.3 Presença dos genes supressores de tumor p53 e c-Myc por eletroforese em gel de agarose e PCR ELISA

O gene supressor p53 foi identificado em oito das nove amostras de tumores analisadas em gel de agarose (Figura 3) e PCR-ELISA (Tabela 2). A amostra três (carcinoma de células escamosas da terceira pálpebra) não revelou produto amplificado em ambas as técnicas utilizadas.

A presença do gene supressor c-Myc foi detectada em apenas três amostras (2, 3 e 5) em gel de agarose e 5 no PCR-ELISA. As demais amostras (1, 4, 6, 7, 8 e 9) não revelaram produtos amplicados para o c-Myc em gel de agarose. Dentre elas, as amostras 1, 4, 6 e 7 estiveram com valores de produto amplificado abaixo do ponto de corte no PCR-ELISA. No entanto, nas amostras 1, 8 e 9 que não foram identificadas em gel de agarose, tiveram suas densidades ópticas acima do ponto de corte (0,123nm).

No fragmento de tumor de mama utilizado como controle encontraram ambos os genes pelas técnicas empregadas. Na figura 3 mostra os resultados das corridas eletroforéticas para ambos os genes estudados. Na amostra controle (carcinoma complexo de mama) foram encontrados produtos amplificados para ambos os genes estudados em gel de agarose e densidades ópticas acima do ponto de corte na técnica de ELISA.

2.3.4 Expressão dos genes supressores de tumor p53 e c-Myc pelas técnicas eletroforese em gel de agarose e RT-PCR ELISA

A expressão do gene p53 foi positiva em quatro amostras em gel de agarose (2, 5, 8 e 9) e negativa nesta técnica para as demais amostras. No entanto, as amostras 1 e 6 revelaram a sua expressão na técnica de RT-PCR-ELISA empregada totalizando, desta forma, seis amostras positivas para o p53. Observou-se a expressão do c-Myc em todas as amostras estudadas em gel de agarose (n=5, amostras 1, 2, 3, 5 e 9) e RT-PCR-ELISA (n=6, amostras 1, 2, 3, 5, 8 e 9). O fragmento de tumor de mama utilizado como controle foi positivo para ambos os genes supressores estudados pelas técnicas empregadas. A Figura 3 e Tabela 2 estão representadas as bandas e os valores dos produtos amplicados em gel de agarose e ELISA, respectivamente, dos tumores estudados. O Quadro 2 mostra todos os resultados obtidos pelas técnicas empregadas para detecção da presença e expressão dos genes p53 e c-Myc dos tumores palpebrais e de terceira pálpebra estudados.

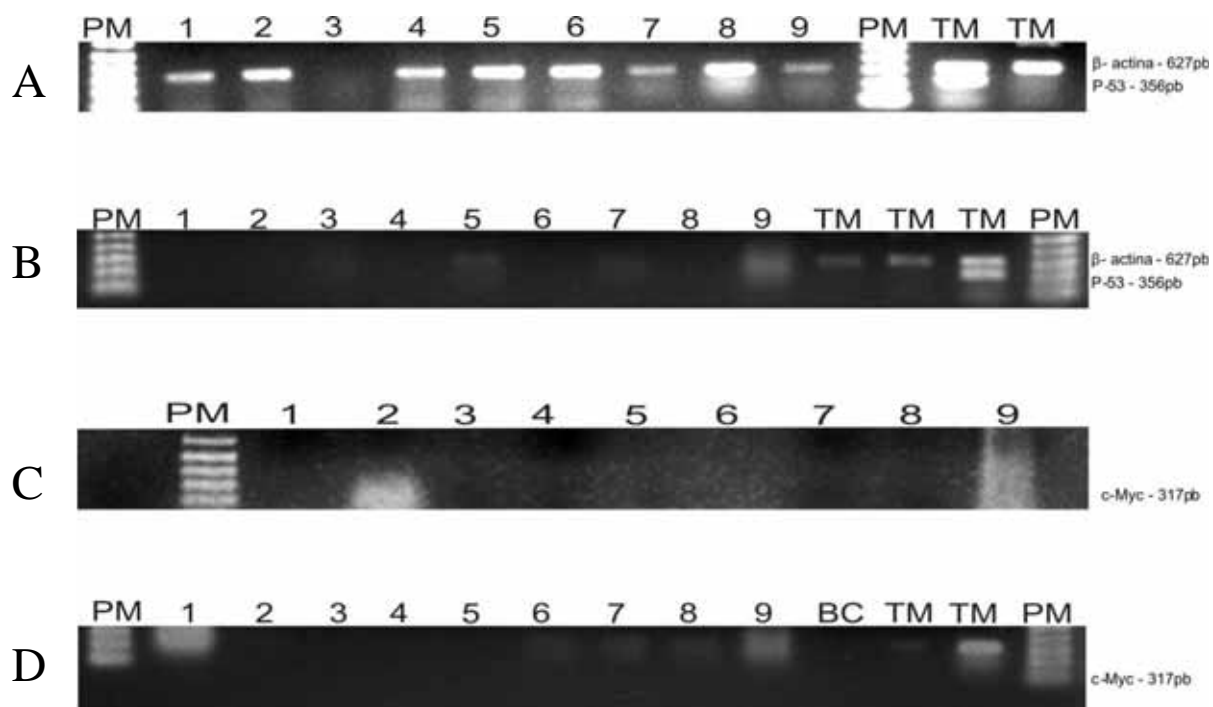


Figura 3 – Imagens fotográficas dos géis de agarose dos produtos amplificados da detecção e expressão dos genes supressores p53 e c-Myc de tumores palpebrais e da terceira pálpebra de cães. A. PCR para o p53; amostras 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 amplificadas. B. RT-PCR para o p53; amostras 2, 5, 8, 9 e TM amplificadas. C. PCR para o c-Myc; amostras 2, 3, 5, 8 e 9 amplificadas. D. RT-PCR para o c-Myc; amostras 1, 2, 3, 5 e 9 amplificadas. PM: Peso Molecular; TM: Tumor de Mama; BC: Branco (sem amostra).

Tabela 2 – Valores médios individuais da leitura do ELISA dos produtos amplificados para o p53 e c-Myc pelas técnicas de PCR e RT-PCR de tumores palpebrais de cães.

Amostra	Detecção P53 (PCR-ELISA)	Expressão P53 (RT-PCR-ELISA)	Detecção c-Myc (PCR-ELISA)	Expressão c-Myc (RT-PCR-ELISA)
1	0,240	2,380	0,108	1,140
2	0,150	0,642	0,213	0,150
3	0,060	0,080	0,223	0,480
4	0,185	0,049	0,115	0,050
5	0,198	0,173	0,400	0,146
6	0,180	0,150	0,100	0,060
7	0,185	0,049	0,101	0,049
8	1,039	0,147	0,225	0,147
9	1,220	0,138	0,425	0,146
10	0,680	0,833	0,510	0,178

Quadro 2 – Diagnóstico anatomopatológico, detecção e expressão dos genes supressores de tumor p53 e c-Myc em gel de agarose, PCR-ELISA E RT-PCR ELISA, de tumores palpebrais de cães.

Amostra	Diagnóstico Anatomopatológico	Detecção P53		Expressão P53		Detecção c- Myc		Expressão c- Myc	
		GA	ELISA	GA	ELISA	GA	ELISA	GA	ELISA
1	Carcinoma de células escamosas	+	+	-	+	-	-	+	+
2	Carcinoma de células escamosas	+	+	+	+	+	+	+	+
3	Carcinoma de células escamosas	-	-	-	-	+	+	+	+
4	Melanoma	+	+	-	-	-	-	-	-
5	Acrocordon	+	+	+	+	+	+	+	+
6	Carcinoma de células escamosas	+	+	-	+	-	-	-	-
7	Epitelioma sebáceo	+	+	-	-	-	-	-	-
8	Epitelioma sebáceo	+	+	+	+	-	+	-	+
9	Tricoblastoma	+	+	+	+	-	+	+	+
10	Carcinoma complexo mamário (controle)	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: GA=gel de agarose

2.4 Discussão

O diagnóstico das neoplasias oculares é freqüentemente determinado por exames anatomopatológico e/ou imunoistoquímica. O mesmo fora realizado aqui empregando a imunoistoquímica como ferramenta para confirmação que se tratavam de tumores de origem epitelial, pois foi observada intensa imunoreatividade para as citoqueratinas AE1/AE3 e ausência da imunomarcagem para vimentina (V9).

Atualmente, os avanços biotecnológicos têm permitido demonstrar a presença e a expressão de genes envolvidos na carcinogênese, o que facilita uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares dos diversos tipos de câncer (MIES et al., 1994; HAMATANI et al., 2006). Para tanto, foi necessário extrair DNA e RNA dos tumores que foram fixados e incluídos em parafina. Encontraram inúmeros obstáculos para obtê-los e foram necessários muitos ensaios a fim de se padronizar as técnicas de extração. A utilização do método do acetato de amônio 4 M para obtenção do DNA foi mais eficaz, pois a relação A260/280 na espectrofotometria mostrou valores superiores de material extraído (COX et al., 2006). O método do Trizol® (COX et al., 2006) também se mostrou eficaz para obtenção do RNA dos tumores que foram analisados.

Optou-se em estudar os genes supressores de tumor p53 e c-Myc no envolvimento na carcinogênese de tumores palpebrais e da terceira pálpebra do cão em função de que até o momento tais aspectos não foram reportados. Acredita-se que mutações no gene p53 sejam as alterações genéticas mais comuns, e muitos estudos indicam que as mesmas estão associadas à

progressão da neoplasia (LEE et al., 2004). O gene supressor de tumor c-Myc tem sido apontado como peça central no processo tumorigênico em diversas neoplasias humanas. Recentes evidências reforçam a participação direta e indireta da proteína C-Myc na regulação do ciclo celular, e entre outros aspectos, dos genes alvo regulados por esta proteína (ROBBINS & COTRAN, 2005; FARIA, 2006).

Verificou-se a presença e a expressão dos genes nos tumores estudados. Pela ausência de estudos descritos na literatura referentes à expressão dos genes supressores p53 e c-Myc em tumores oculares em cães optou-se em utilizar um fragmento de tumor de mama como controle positivo das reações empregadas neste estudo, pois há relatos de que tais tumores expressam estes genes. Na amostra, verificou-se a presença e a expressão do p53 e c-Myc por todos os métodos de detecção empregados, embora Inoue e Shiramizu (1999), ao estudarem as suas expressões em tumores mamários de cães, verificaram imunoreatividade (intensa a moderada) da proteína P53 nuclear em cinco tumores com classificação histológica de osteossarcoma mamário e baixa imunorreatividade desta mesma proteína em adenocarcinomas e mioepiteliomas mamários, embora a mutação do p53 em adenocarcinomas mamários humanos tenha sido reportada (CATTORETTI et al., 1988; MAZARS et al., 1992). A super-expressão deste gene tem sido vista com um fator importante na progressão doença, embora não se tenha objetivado neste estudo investigar a relação entre a expressão dos genes supressores e a progressão da doença.

O gene supressor de tumor c-Myc é comumente amplificado em casos de tumores de mama humanos, (ROBBINS & COTRAN, 2005; INOUE, 1988) sendo considerado importante para progressão da doença sob o aspecto da malignidade do tumor, correlacionando-se com a sobrevida, (ROBBINS & COTRAN, 2005) porém não considerado essencial para os mecanismos que envolvem a metástase (INOUE, 1988).

Na maioria dos tumores palpebrais e da terceira pálpebra aqui estudados (88,8%, n=8) verificou-se a presença do p53, no entanto, entre as amostras positivas (n=8), ele estava expresso em 75 % deles no ELISA. O c-Myc estava presente em 55,5% (n=5) das amostras e, 100% (n=5) delas, expressaram tal gene (Quadro 2).

A técnica de PCR e RT-PCR é uma técnica particularmente fiel para detectar células neoplásicas ocultas no sangue, medula óssea e em linfonodos em pacientes com câncer de mama (GILBEY et al., 2004). Entretanto, a detecção e análise dos produtos do cDNA é crítica na interpretação dos resultados. O desenvolvimento de técnicas mais específicas, sensíveis, reproduzíveis e de fácil execução baseia-se na avaliação dos produtos amplificados pela técnica de ELISA (YIE et al., 2006). Com o intuito de se verificar possíveis amplificações que não foram visualizadas em gel de agarose, as técnicas de PRC ELISA e RT-PCR ELISA proporcionaram maior eficiência e sensibilidade para esta avaliação. Também permitiram verificar a presença de produtos amplificados para ambos os genes, que não foram visualizados sob a forma de bandas na corrida eletroforética. Salienta-se que

neste trabalho é reportada pela primeira vez a análise da presença e expressão de genes supressores de tumor em tumores palpebrais e da terceira pálpebra de cães por este método.

O fato de uma das amostras (amostra 3), cujo diagnóstico foi de carcinoma de células escamosas, não ter amplificado para o gene p53, contrariamente ao que se observou em outras como o mesmo diagnóstico (amostras 1, 2 e 6), pode ser explicado por: 1) problemas durante o anelamento na reação do PCR por mutação de algum par de base do DNA e cDNA; 2) devido ao fato do tumor não possuir a região conservada entre as seqüências disponíveis que reconhecessem os *primers* utilizados; 3) causado por alterações ou degradação do DNA ou RNA extraído que podem ocorrer após a fixação prolongada em formol ou período prolongado de inclusão em parafina; (CRONIN et al., 2004) e 4) a real ausência dos genes nesse fragmento, embora acredite-se ser a explicação menos provável.

2.5 Conclusão

Com base nos resultados e nas condições aqui adotadas conclui-se que:

1. É possível extrair DNA e RNA de amostras de tumores palpebrais a partir de fragmentos fixados em formol e embebidos em parafina pelos métodos do Acetato de Amônio 4 M e Trizol®, em quantidades suficientes que permitem estudos de genes supressores de tumor envolvidos na carcinogênese;

2. A maioria dos tumores palpebrais e da terceira pálpebra de cães expressam o p-53 e c-Myc, identificados pelas técnicas de PCR e RT-PCR. As técnicas de PCR ELISA e RT-PCR ELISA são mais eficazes e sensíveis para avaliação da presença e expressão dos genes estudados em relação ao gel de agarose.

2.6 Referências Bibliográficas

Amariglio, E.N., et al. Identity of rearranged LINE/c-MYC junctions sequences specific for the canine transmissible venereal tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.88, p.8136-8139, 1991.

Bhudevi, B., Weinstock D. Detection of bovine viral diarrhoea virus in formalin fixed paraffin embedded tissue sections by real time RT-PCR (Taqman). *Journal of Virological Methods*, v.109, p.25-30, 2003.

Bistner, S.I. Olho e órbita. In: Slatter: Manual de Cirurgia de Pequenos Animais, 2ª (ed. Saunders) São Paulo, v.2, n.158, p.2553-65, 1998.

Carlton, W.W., McGavin M.D. Patologia do olho e do ouvido. In: Patologia Veterinária Especial de Thomson, 2ª (ed. Artes Médicas Sul) Porto Alegre, v.14, p.625-630, 1998.

Cattoretti, G., et al. P53 expression in breast cancer. *Institute of Journal Cancer*, v.15, n.2, p.178-83, 1988.

Cox, M.L., et al. Assessment of fixatives, fixation, and tissue processing on morphology and RNA integrity. *Experimental and Molecular pathology*, v.80, p.183–191, 2006.

Cronin, M., et al. Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *American Journal of Pathology*, v.164, n.1, p.35-42, 2004.

Faria, M.H.G., Rabenhorst, S.H.B. Impacto do oncogene C-MYC no câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v.52, n.2, p.165-171, 2006.

Gilbey, A.M., et al. The detection of circulating breast cancer cells in blood. *Journal of Clinical Pathology*, v.57, n.9, p.903-11, 2004.

Hamatani, K., Eguchi, H., Takahashi, K. Improved RT-PCR amplification for molecular analyses with long-term preserved formalin-fixed, paraffin embedded tissues specimens. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v.54, n.7, p.773-780, 2006.

Inoue, M., Shiramizu, K. Immunohistochemical detection of p53 and c-myc proteins in canine mammary tumors. *Journal of Comparative Pathology*, v.120, p.169-175, 1999.

Johnson, A.S., Couto, C.G., Wegworst, M. Mutation of the P53 tumor suppressor gene in spontaneously occurring osteosarcomas of the dog. *Carcinogenesis*, v.19, n.1, p.213-217, 1998.

Kirkness, E.F., et al. The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. *Science*, v.26, n.301(5641), p.898-903, 2003.

Koenig, G.A., et al. Expression and significance of P53, Rb, P21/waf-1, p16/ink-4^a and PTEN tumor suppressors in canine melanoma. *Veterinary Pathology*, v.39, p.458-472, 2002.

Krehbiel, J.D., Langhan, R.F. Eyelid neoplasms of dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v.36, p.115-119. 1975.

Kumaraguruparan, R., et al. Humans and canines: a comparative evaluation of heat shock and apoptosis-associated proteins in mammary tumors. *Clinica Chimica Acta*, v.365, n.1-2, p.168-76, 2006.

Lee, C., et al. Mutation and overexpression of P53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Science*, v.5, n1, p.63-69, 2004.

Lee, C., Kweon, O. Mutations of P53 tumor suppressor gene in spontaneous canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Science*, v.3, n.4, p.321-325, 2002.

Levine, R.A. Overexpression of the sis oncogene in a canine osteosarcoma cell line. *Veterinary Pathology*, v.39, p.411-412, 2002.

Liao, K., et al. Identification of canine transmissible venereal tumor cells using in situ polymerase chain reaction and the stable sequence of the long interspersed nuclear element. *Journal of Veterinary Diagnostic Investimen*, v.5, p.399-406, 2003.

Mankoc, S., et al. Comparison of different molecular methods for assessment of equine arteritis virus (EAV) infection: A novel one-step MGB real-time RT-PCR assay, PCR ELISA and classical RT-PCR for detection of highly diverse sequences of Slovenian EAV variants. *Journal of Virological Methods*, v.146, p.341-354, 2007.

Mazars, R., et al. p53 mutations occur in aggressive breast cancer. *Cancer Research*, v.15, n.52(14), p.3918-23, 1992.

Mies, C. A simple, rapid method for isolating RNA from paraffin-embedded tissues for reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Journal Histochemical Cytochemical*, v.42, n.6, p.811-3, 1994.

Morgan, G. Ocular tumors in animals. *Journal of Small Animals Practice*, v.10, n.10, p.563-70, 1969.

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

Rivero, E.C., Neves, A.C., Silva-Valezuela, M.G. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathology Research and Practice*, v.202, p.523-529, 2006.

Robbins, S.L., Cotran, V. Neoplasias In: *Patologia – Bases Patológicas das Doenças*. Sétima edição, Ed. Saunders, cap.7, p.310 – 318, 2005.

Roberts SM. Severin GA. Lavach JD. Prevalence and treatment of palpebral neoplasms in the dog: 200 cases (1975-1983). *The Journal of American Veterinary Medical Association*, v.189, n.10, p.355-59, 1986.

Willis, A.M., Wilkie, D.A. Ocular Oncology. *Clinical Techniques of Small Animal Practice*, v.16, n.1, p.77-85, 2001.

Yie, S., et al. Detection of *Survivin*-expressing circulating cancer cells in the peripheral blood of breast cancer patients by RT-PCR ELISA. *Clinic Experimental Metastasis*, v.23, p.279-289, 2006.

APÊNDICES

Tabela 1 – Identificação das amostras estudadas, bem como, seu Registro Geral no Hospital Veterinário (RGHV), Registro Geral no Serviço de Patologia (RG Histopatológico), Idade em anos, Raças, Sexo, Localização do tumor, diâmetro, Evolução e Diagnóstico Anatomo-patológico.

Amostra	RG	RG Histológico	Idade (anos)	Raça	Sexo	Localização	Diâmetro	Evolução	Diagnóstico
1	9910	Pc-83/98	2,6	SRD	M	Protrusão gl. da 3ª. Pálpebra	---	6 meses	Carcinoma de células escamosas cornificado, processo infl. da glândula
2	13.466	Pc-25/01	5	SRD	M	Pálpebra inferior, recidiva de cirurgia há 1 ano	2 cm	1 mês	Carcinoma de células escamosas
3	---	Pc-35/01	6	SRD	F	Terceira pálpebra esquerda	---	2 meses	Carcinoma de células escamosas queratinizado
4	14.527	Pc-51/01	9	Poodle	M	3ª. Pálpebra e pálpebra inferior direita	2 cm	2 meses	Melanoma
5	---	Pc-108/01	8	Fox	F	Terceira pálpebra, nódulo firme, marrom escuro	5 cm	---	Acrocordon
6	----	Pc-146/04	7	SRD	F	Pele periocular esquerdo, próximo comissura interna	---	---	Carcinoma células escamosas
7	22.094	Pc-155/04	---	Weimaraner	F	Pálpebra superior esquerda	1 cm	Desde filhote	Epitelioma Sebáceo
8	23.126	Pc-55/05	5	Rottweiler	F	Pálpebra superior esquerda	0,5 cm	1 mês	Epitelioma Sebáceo
9	23.899	Pc-100/05	10	Sheepdog	F	Face interior da pálpebra Superior direita	1 cm	--	Tricoblastoma
10	---	Pc-25/07				Tumor de Mama			Carcinoma complexo

Legenda: Pc: peça cirúrgica; M: macho; F: fêmea; 3º: terceira; cm: centímetros

IMAGENS FOTOGRÁFICAS DE ALGUNS CASOS AQUI ESTUDADOS. COLORAÇÕES DE HEMATOXILINA-EOSINA E IMUNOMARCAÇÃO PARA CITOQUERATINA AE1/AE3 E VIMENTINA (V9).

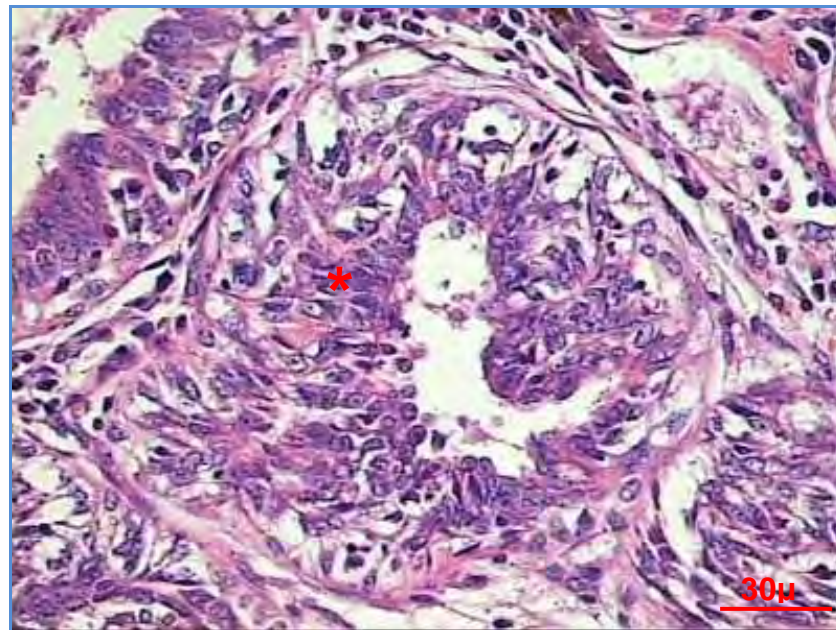


Figura 1 – Fotodocumentação da microscopia óptica de carcinoma mamário usado no estudo como controle das reações. Nota-se proliferação neoplásica da células do epitélio do ácino da glândula mamária (*). HE 40X.

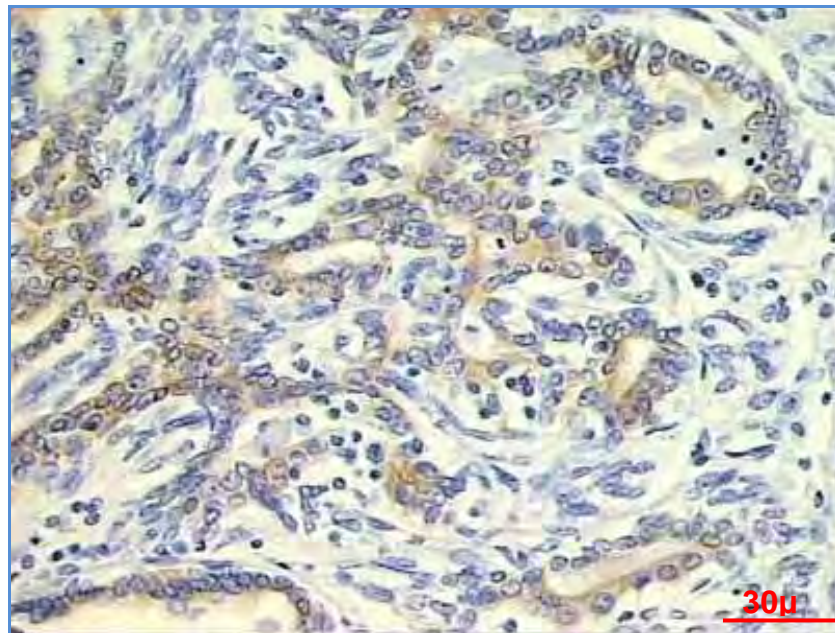


Figura 2 – Fotodocumentação da imunomarcação positiva para citoqueratina AE1/AE3 no carcinoma mamário. Nota-se marcação positiva de colora o acastanhada das células epiteliais dos acinos glandulares. Aumento de 40X.

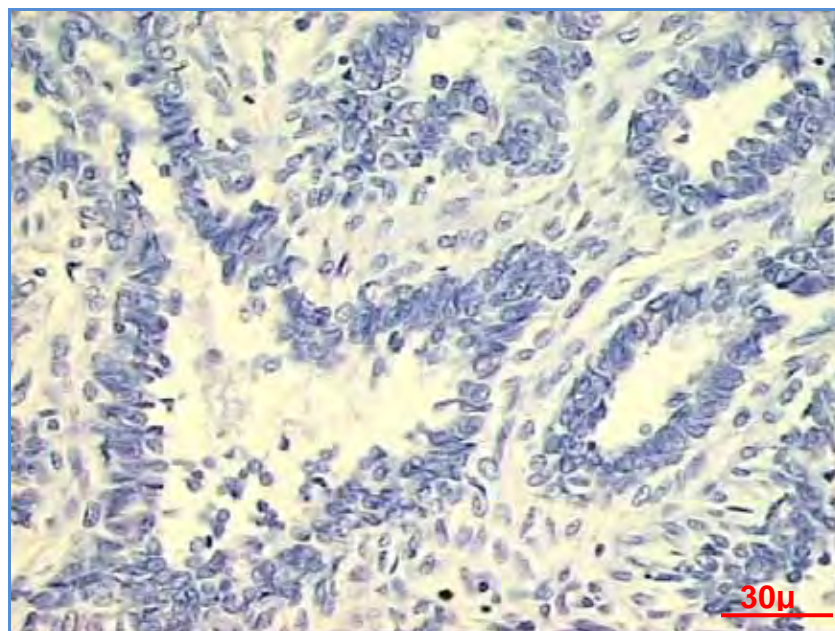


Figura 3 – Fotodocumenta o da imunomarca o negativa para vimentina (V9) do carcinoma mamário. Aumento de 40X.

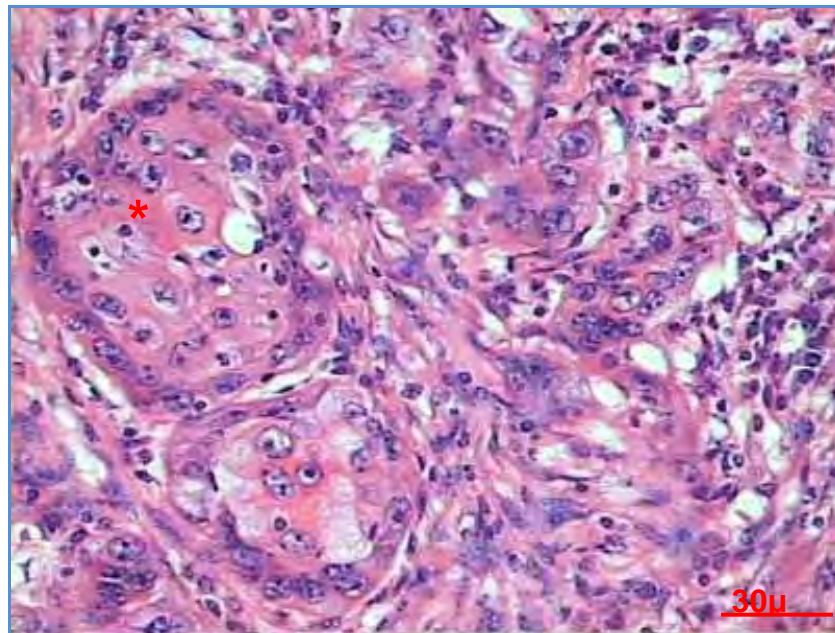


Figura 4 – Fotodocumentação da microscopia óptica de carcinoma de células escamosas da terceira pálpebra. Nota-se proliferação neoplásica das células do epitélio escamoso (*). HE, 40X.

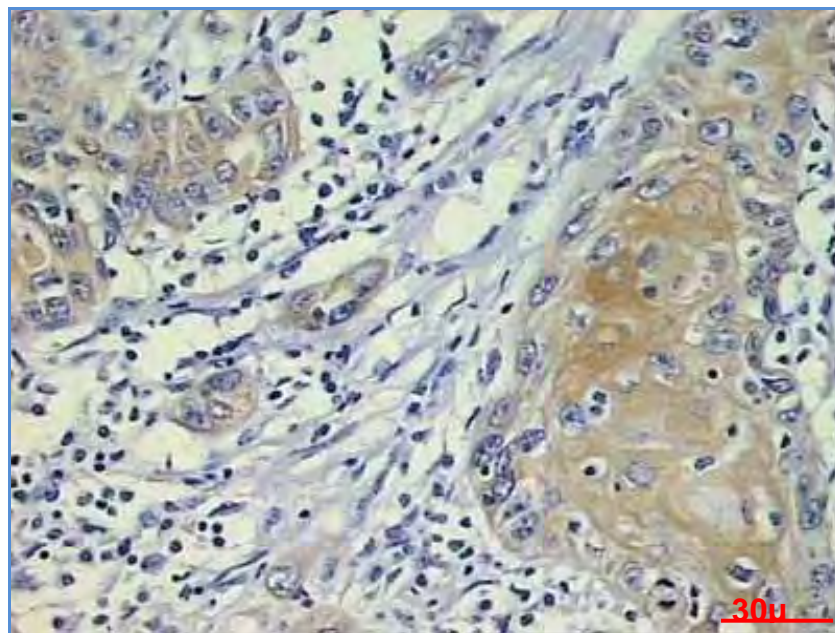


Figura 5 – Fotodocumentação da imunomarcagem positiva para citoqueratina AE1/AE3 em carcinoma de células escamosas de terceira pálpebra. Nota-se marcação positiva de coloração acastanhada do epitélio escamoso. Aumento de 40X.

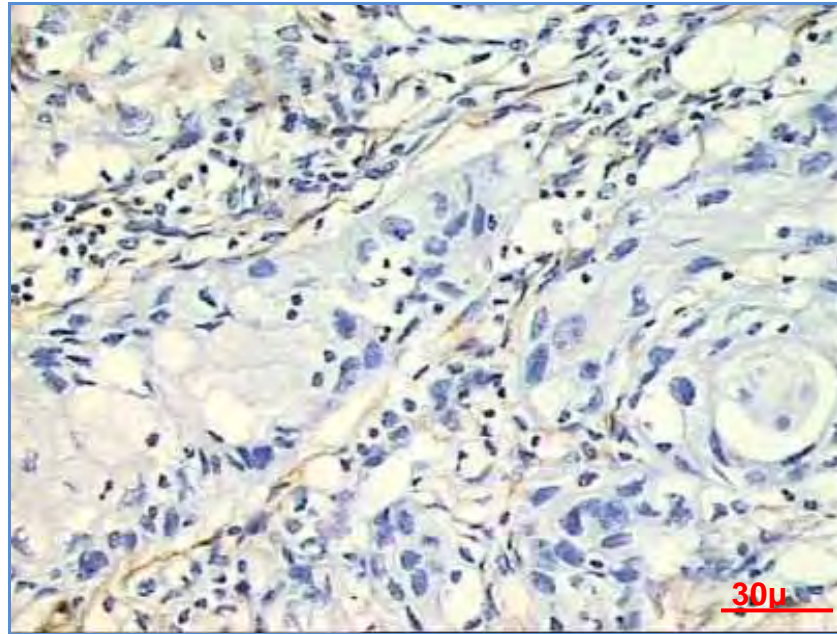


Figura 6 – Fotodocumentação da imunomarcagem negativa para vimentina (V9) de carcinoma de células escamosas de terceira pálpebra. Aumento de 40X.

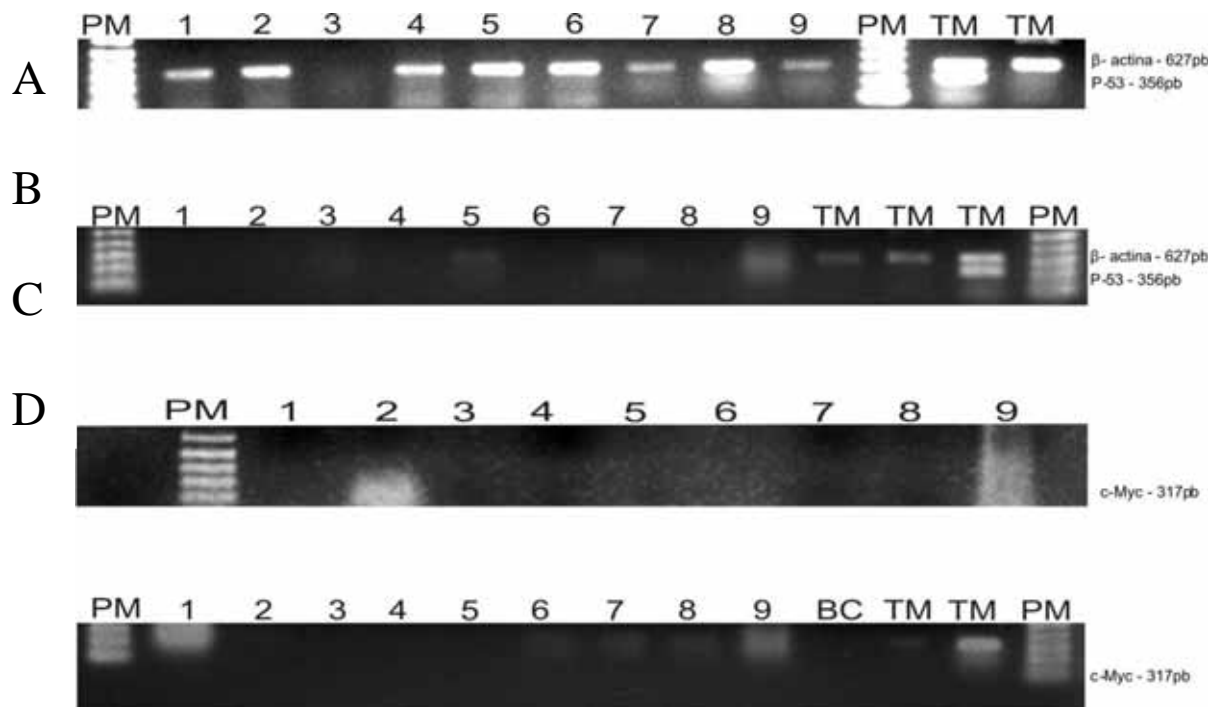


Figura 10 – Imagens fotográficas dos géis de agarose dos produtos amplificados da detecção e expressão dos genes supressores de tumor p53 e c-Myc de tumores palpebrais e da terceira pálpebra de cães. A. PCR para o p53; amostras 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e TM amplificadas. B. RT-PCR para o p53; amostras 3, 5, 7, 9 e TM amplificadas. C. PCR para o c-Myc; amostras 2, 3 e 5 amplificadas. D. RT-PCR para o c-Myc; amostras 1, 6, 7, 8, 9 e TM amplificadas. PM: Peso Molecular; TM: Tumor de Mama; BC: Branco (sem amostra).

Quadro 2 – Diagnóstico anatomopatológico, detecção e expressão dos genes supressores de tumor p53 e c-Myc em gel de agarose, PCR-ELISA E RT-PCR ELISA, de tumores palpebrais de cães.

Amostra	Diagnóstico Anatomopatológico	Detecção P53		Expressão P53		Detecção c-Myc		Expressão c-Myc	
		GA	ELISA	GA	ELISA	GA	ELISA	GA	ELISA
1	Carcinoma de células escamosas	+	+	-	+	-	-	+	+
2	Carcinoma de células escamosas	+	+	+	+	+	+	+	+
3	Carcinoma de células escamosas	-	-	-	-	+	+	+	+
4	Melanoma	+	+	-	-	-	-	-	-
5	Acrocordon	+	+	+	+	+	+	+	+
6	Carcinoma de células escamosas	+	+	-	+	-	-	-	-
7	Epitelioma sebáceo	+	+	-	-	-	-	-	-
8	Epitelioma sebáceo	+	+	+	+	-	+	-	+
9	Tricoblastoma	+	+	+	+	-	+	+	+
10	Carcinoma complexo mamário (controle)	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: GA=gel de agarose

**LISTA DE MATERIAIS, SOLUÇÕES E REAGENTES UTILIZADOS NA
COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA-EOSINA E IMUNOISTOQUÍMICA**

- Lâminas de vidro com polilisina
- Xilol, álcool, álcool metílico e álcool-xilol
- Hematoxilina – Eosina
- Tampão Citrato pH 6.0
- Leite desnatado (6g/100ml H₂O)
- Anticorpo Anti-Pan-Citoqueratina (AC1/AC3)
- Anticorpo Anti-Vimentina (V9)
- Soro Fetal Bovino
- Tampão PBS (1X)
- Streptoavidina (HRP)
- DAB – Diaminobenzidina

LISTA DE MATERIAIS, SOLUÇÕES E REAGENTES UTILIZADOS NA PCR e

RT-PCR

- Microtubos estéreis (*DNA e RNA free*)
- Ponteiros descartáveis com filtro
- RMix
- Oligonucleotídeos iniciadores (Quadro 1 no capítulo 2, Artigo)
- Enzima Polimerase (Taq Platinun®)
- H₂O ultrapura
- Agarose
- TBE 1X (Tris – Borato – EDTA)
- Brometo de Etídeo
- Tampão de corrida (eletroforese)
- Peso molecular (1Kb plus)
- H₂O DEPEC
- Termociclador Eppendorf®

LISTA DE MATERIAIS, SOLUÇÕES E REAGENTES UTILIZADOS NO PCR-ELISA E RT-PCR-ELISA

- Placa de ELISA, Nunc®
- Microtubos estéreis
- Tampão Carbonato-Bicarbonato pH 9.66
- PBS 1X, Tween 0,5%
- Leite desnatado (Molico) 10%
- Streptoavidina
- OPD – Ortofenilenodiamina
- Tampão Citrato-Fosfato pH 5.0
 - Solução A: Na_2HPO_4
 - Solução B: Ácido Cítrico
- HCL 2M
- Leitor de ELISA – Filtro Peroxidase (492nm).