

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRARIAS E VETERINÁRIA
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**RELAÇÃO DA CICLOOXIGENASE-2 COM O VEGF E A
CASPASE-3 NAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CADELAS**

BRUNO ROQUE LIMA

**JABOTICABAL – SP
2012**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRARIAS E VETERINÁRIA
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**RELAÇÃO DA CICLOOXIGENASE-2 COM O VEGF E A
CASPASE-3 NAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CADELAS**

BRUNO ROQUE LIMA

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus Jaboticabal, para obtenção do título de Mestre.
Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Daleck
Co-orientador: Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi

JABOTICABAL – SP

2012

“Algumas vezes um pepino é somente um pepino”

Sigmund Freud

*Dedico este trabalho a minha mãe Vera,
por ter acreditado, incentivado e me apoiado sempre
na realização deste sonho.*

AGRADECIMENTOS:

Agradeço a Deus pela minha vida, família e amigos. Sem estes, nada disso faria sentido.

Agradeço a Nossa senhora Aparecida por ouvir minhas orações nos momentos de angústia e medo.

Agradeço a minha família. Mesmo longe vocês sempre estiveram perto nas horas que realmente importavam.

Agradeço a Ellen pelo carinho, apoio e por todos os momentos felizes e tristes que você compartilhou comigo.

Agradeço ao Professor Daleck por ter me aceito como orientado e pelos ensinamentos não só na área de oncologia mas também aos ensinamentos da vida.

Agradeço ao Professor Andrigo, pela ajuda incondicional na realização deste trabalho.

Agradeço a Professora Reneé pela ajuda na realização das preparações imunoistoquímicas e pela paciência em me ensinar e tirar todas minhas dúvidas relacionadas à técnica.

Agradeço a Professora Débora Zuccari por me receber em seu laboratório em Rio Preto e por ter ajudado a enriquecer este trabalho.

Agradeço a Fapesp e ao CNPq pelo auxílio financeiro e pela bolsa de mestrado sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

Agradeço a Unesp/Jaboticabal, seus professores, funcionários e colaboradores pela oportunidade de fazer parte dessa instituição ao longo desses dois anos.

Agradeço meus cachorros Skank, Marmota, Jhuana, Chaves, Shine e Anakin (in memoriam) por sempre fazerem festa para mm mesmo quando estava cansado e sem paciência para eles.

Faço homenagem ao amigo Marcos (in memoriam), sua coragem e determinação servem e sempre servirão como espelho em todos os momentos da minha vida.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABP AVIDINA BIOTINA PEROXIDASE

CNPq CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO

COX-2 CICLOOXIGENASE-2

DAB DIAMINOBENZIDINA

FAPESP FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

FCAV FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

OMS ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE

TNM TUMOR/ NÓDULO/ METÁSTASE

TRIS TRIZMA BASE

UNESP UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

VEGF FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR

CASPASE-3 CYSTEINE ASPARTIC ACID PROTEASE

µm MICRÔMETRO

mRNA RNA MENSAGEIRO

PIGF FATOR DE CRESCIMENTO PLACENTÁRIO

SPLICING PROCESSO QUE REMOVE OS INTRONS E JUNTA OS EXONS DURANTE A TRANSCRIÇÃO DO RNA

INTRONS SEGMENTOS DE DNA DE UM GENE QUE NÃO CODIFICAM PROTEÍNA E SÃO RETIRADOS NO PROCESSO DE TRANSCRIÇÃO

EXONS SEGMENTOS DE DNA DE UM GENE QUE CODIFICAM PROTEÍNAS APÓS A TRANSCRIÇÃO

MEC MATRIX EXTRACELULAR

VEGFR RECEPTOR DE FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR

PG PROSTAGLANDINA

FMVZ FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

IMAGEJ SOFTWARE DE ANÁLISE DE IMAGENS

FAMERP FACULDADE DE MEDICINA DE RIO PRETO

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Figura 01: Exemplo de fotomicrografia de preparação imunoistoquímica convertida em preto e branco pelo programa Image J. Em A - Notar a seleção do campo a ser analisado (seta vermelha). Em B – Mesma imagem sendo analisada pelo programa e gerando um valor correspondente a intensidade de marcação (seta vermelha). FAMERP – São José do Rio Preto, SP, 2011.....18
- FIGURA 2** - Em A - Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de uma metástase pulmonar em cadela. Observar intensa marcação das células epiteliais para a atividade da ciclooxigenase-2. Aumento: 400 vezes (seta vermelha). Em B - Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um adenoma mamário cadela. Observar fraca marcação no componente epitelial do tumor para atividade da ciclooxigenase-2 (seta vermelha). Contra-coloração: Hematoxilina de Mayer. Aumento: 1000 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2011.....21
- FIGURA 3** - Em A - Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de carcinoma inflamatório em cadela, na qual se observa fraca marcação das células neoplásicas (seta vermelha), para atividade da ciclooxigenase-2. Em B - Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um carcinoma de prognóstico ruim em cadela. Observar moderada marcação no componente epitelial do tumor (seta vermelha) para atividade da ciclooxigenase-2 (Aumento 400 vezes). Contra-coloração: Hematoxilina de Mayer. UNESP – Botucatu, SP, 2011.....22
- FIGURA 4** - Em A - Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um carcinoma de prognóstico ruim em cadela. Observar moderada marcação nuclear das células tumorais (seta vermelha) para a atividade da caspase-3. Aumento: 400 vezes. Em B - Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um carcinoma inflamatório em cadela. Observar fraca marcação nuclear das células tumorais (seta vermelha) para

atividade da caspase-3. Contra-coloração: Hematoxilina de Mayer. Aumento: 1000 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2011.....24

FIGURA 5 - Em A - Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de parênquima mamário (controle) em cadela. Observar fraca marcação nuclear das células tumorais (seta vermelha) para a atividade da caspase-3. Aumento: 1000 vezes. Contra-coloração: Hematoxilina de Mayer. UNESP – Botucatu, SP, 2011.....25

FIGURA 6 - Em A - Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um adenoma mamário em cadela. Observar intensa marcação das células epiteliais (seta vermelha) para a atividade do VEGF. Aumento: 400 vezes (seta vermelha). Em B - Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um carcinoma de prognóstico bom. Observar moderada marcação do componente epitelial do tumor (seta vermelha) para atividade do VEGF. Contra-coloração: Hematoxilina de Mayer. Aumento: 400 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2011.....28

FIGURA 7 - Em A - Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de carcinoma de prognóstico ruim em cadela. Observar intensa marcação das células epiteliais (seta vermelha) para a atividade do VEGF. Aumento: 400 vezes. Contra-coloração: Hematoxilina de Mayer. UNESP – Botucatu, SP, 2011.....28

FIGURA 8 - Em A - Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um carcinoma primário metastático em cadela. Observar forte marcação para a atividade do VEGF das células epiteliais nos vasos (seta vermelha) caracterizando embolos neoplásicos. Aumento: 400 vezes (seta vermelha). Em B - Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um carcinoma inflamatório. Observar moderada marcação do componente epitelial do tumor (seta vermelha) para atividade do VEGF. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento: 400 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2011.....29

RESUMO-

Nas cadelas, os tumores de mama representam em média 40% de todos os tumores, e sua carcinogênese é atribuída a interação complexa de fatores individuais da paciente. A enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) apresenta-se como um marcador potencial para o câncer de mama, uma vez que é expressa em resposta a processos inflamatórios, que frequentemente acompanham as neoplasias e alterando o seu prognóstico. A caspase-3 é foco de estudos relacionados ao mecanismo da apoptose, tornando-se peça-chave no entendimento dos mecanismos de morte celular. O VEGF está envolvido na angiogênese e linfangiogênese, apresentando papel importante na progressão do câncer. O objetivo deste trabalho foi investigar a imunorreatividade da ciclooxigenase-2, do VEGF e da Caspase-3 nas neoplasias mamárias de cadelas, e correlacionar a expressão da COX-2 com o VEGF e com a Caspase-3, nesses tumores. Para a realização deste estudo foram selecionadas 60 amostras de tumores mamários de cadelas e 10 amostras de tecido mamário livre de malignidade que foram divididas em seis grupos compostos por 10 tumores de mesma classificação histológica cada grupo, e um grupo composto por 10 amostras de tecido mamário livre de malignidade. Os grupos foram denominados Adenomas, Carcinomas de prognóstico bom, Carcinomas de prognóstico ruim, Carcinomas primários metastáticos, Metástases pulmonares, Carcinomas inflamatórios e Controle. Os 7 grupos foram agrupados em micro-arranjo tecidual em lâmina de microscopia, e analisados através de imunistoquímica pela técnica *estreptavidina-biotina-peroxidase*. A avaliação da intensidade de marcação foi obtida por densitometria com auxílio do programa *ImageJ*. A intensidade da marcação da Cox-2 foi maior nos casos de metástase pulmonar e fraca nos casos de adenoma. Na avaliação da marcação da Caspase-3, houve uma correlação significativa entre os grupos controle e carcinoma prognóstico ruim ($p < 0,001$) Ainda, houve diferença significativa na intensidade de marcação da Caspase-3 entre os grupos controle e carcinoma primário metastático ($P < 0,05$) e controle versus metástase pulmonar ($p < 0,05$) Na avaliação da intensidade de marcação do VEGF houve uma correlação significativa do grupo adenoma versus carcinoma de prognóstico ruim ($P < 0,001$),

adenoma versus metástase pulmonar ($P < 0,01$), adenoma versus Carcinoma primário metastático ($P < 0,01$) e adenoma versus carcinoma de prognóstico bom ($P < 0,01$). O presente estudo conclui que a Cox-2 apresenta-se como bom marcador preditivo, a Caspase-3 apresenta-se como bom marcador prognóstico e o VEGF-A apresenta alta sensibilidade e baixa especificidade como um marcador tumoral nas neoplasias mamárias de cadelas, havendo forte correlação do VEGF com a Cox-2 nessa neoplasia.

Palavras-chave: Cadela, Caspase-3, Cox-2, Neoplasia Mamária, VEGF.

ABSTRACT-

In bitches, breast tumors represent an average of 40% from all tumors, and its carcinogenesis is attributed to a complex interaction of individual patient's factors. The enzyme cyclooxygenase-2 (COX-2) is presented as a potential marker for breast cancer, since it is expressed in response to inflammation, which are often associated with neoplasms, changing its prognosis. Caspase-3 has been investigated as a key-protein associated with the mechanism of apoptosis, becoming a key part in understanding the mechanisms of cell death. VEGF is involved in angiogenesis and lymphangiogenesis, presenting important role in cancer progression. The objective of this study was to investigate the immunoreactivity of cyclooxygenase-2, VEGF and Caspase-3 in mammary neoplasms in bitches, and correlate the expression of COX-2 and VEGF and the Caspase-3 in these tumors. For this study we selected 60 samples of bitches's mammary tumors and 10 samples of breast tissue malignancy's free, which were divided into six groups of 10 tumors of the same histological grade of each group and one group of 10 breast tissue samples malignancy's free. The groups were called adenomas, carcinomas good prognosis, carcinomas with poor prognosis, metastatic primary carcinomas, lung metastases, inflammatory carcinomas and Control. The seven groups were grouped into tissue micro-array on a microscope slide, and analyzed by immunohistochemistry technique streptavidin-biotin-peroxidase. The evaluation of the intensity of staining was obtained by densitometry using the program ImageJ. The intensity of COX-2 labeling was higher in cases of pulmonary metastasis and poor in cases of adenoma. In the assessment of marking of Caspase-3, there was a significant correlation between the control and carcinoma with poor prognosis ($p < 0.001$) Furthermore, there was significant difference in the intensity of marking the Caspase-3 between the control and primary carcinoma metastatic ($P < 0.05$) and control versus lung metastases ($p < 0.05$) in assessing the intensity staining of VEGF was a significant correlation of adenoma versus carcinoma group with poor prognosis ($P < 0.001$), adenoma versus lung metastases ($P < 0.01$), adenoma, primary versus metastatic carcinoma ($P < 0.01$) versus adenoma and carcinoma of good prognosis ($P < 0.01$). This

study concludes that Cox-2 is presented as a good predictive marker, the Caspase-3 is presented as a good prognostic marker and VEGF-A has high sensitivity and low specificity as a tumor marker in mammary neoplasms, which are highly correlation of VEGF with the Cox-2 in this neoplasm.

Key-words: Bitch, Caspase-3, Cox-2 Mammary Neoplasia, VEGF

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
RESUMO	X
ABSTRACT	XII
I.	
INTRODUÇÃO	14
II. REVISÃO DA LITERATURA	2
II.1- NEOPLASIA MAMÁRIA.....	2
II.2- ENZIMA CICLOOXIGENASE-2.....	4
II.3- CASPASE-3.....	6
II.4- VEGF.....	8
II.4.1- VEGF E SUAS ISOFORMAS.....	8
II.4.2 - VEGF E SEUS RECEPTORES.....	10
III. OBJETIVOS	12
IV. MATERIAL E MÉTODOS	13
IV.1- ESCOLHA DOS TUMORES.....	13
IV.1.1 - ADENOMA, CARCINOMA DE PROGNÓSTICO BOM E CARCINOMA DE PROGNÓSTICO RUIM.....	13
IV.1.2 - CARCINOMA PRIMÁRIO METASTÁTICO, METÁSTASE PULMONAR E CARCINOMA INFLAMATÓRIO	15
IV.2- ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO.....	16
IV.3- DENSITOMETRIA.....	18
IV.4- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
V. RESULTADOS	20
V.1- IMUNORREATIVIDADE PARA A COX-2.....	20
V.2- IMUNORREATIVIDADE PARA CASPASE- 3.....	2233
V.3- IMUNORREATIVIDADE PARA A VEGF.....	24
V.4- CORRELAÇÕES.....	27
VI.- DISCUSSÃO	28
VII- CONCLUSÕES	31
VIII- REFERÊNCIAS	32
IX- ANEXOS	40
IX.1- TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA	40

IX.2- SOLUÇÕES UTILIZADAS NA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....43

I. INTRODUÇÃO

Os tumores de mama em cadelas apresentam comportamento epidemiológico, clínico, biológico e genético, semelhante ao da espécie humana (MISDORP, 2002), por isso, as neoplasias mamárias em cadelas têm sido propostas como modelo adequado para pesquisa e na área de oncologia comparada (CASSALI et al., 2011).

A carcinogênese dos tumores de mama é determinada por uma interação complexa de fatores individuais da paciente como o perfil hormonal, estado nutricional e imunológico, com fatores relacionados ao tumor, como modulação da resposta inflamatória, aumento da proliferação celular, inibição da apoptose e modulação da angiogênese, alterando a resposta imunológica à agressão (ZUCCARI et al., 2008).

A inibição da apoptose celular apresenta papel importante no crescimento tumoral e seu mecanismo é alvo de muita pesquisa. A caspase-3 é considerada a principal enzima envolvida na regulação da apoptose. Segundo um estudo conduzido por DEVARAJAN et al. (2002) a perda da função ou não expressão da caspase-3 é observada em linhagens de celulares de neoplasias mamárias de comportamento agressivo. Já a angiogênese favorece a disseminação tumoral à medida que vasos novos atuam como rotas para metástases à distância. Os principais marcadores envolvidos neste fenômeno são a cicloxigenase-2 (COX-2), expressa por diferentes tipos celulares, e que modula a resposta inflamatória e o microambiente tumoral, e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que se liga a receptores de membrana no endotélio de vasos sanguíneos linfáticos, modulando a angiogênese e a linfangiogênese (HICKLIN & ELLIS, 2005; SINGH et al. 2011).

II. REVISÃO DA LITERATURA

II.1- NEOPLASIA MAMÁRIA

O câncer de mama é o tumor mais freqüente nas fêmeas, principalmente em mulheres (INCA, 2012) e cadelas (MISDORP, 2002), e na espécie canina, representam aproximadamente 52% de todas as neoplasias, sendo que, no momento do diagnóstico metade delas já possui caráter maligno (DE NARDI, 2007).

Sua etiologia é multifatorial, contudo, a participação de componentes genéticos, ambientais, nutricionais e principalmente hormonais (UVA et al., 2009; ANDRADE et al., 2010), predispõe alterações celulares que darão origem à formação tumoral (SILVA et al., 2004). O risco de desenvolvimento do câncer de mama em cadelas aumenta significativamente com a idade, acometendo com maior frequência a faixa etária entre nove e onze anos, sendo baixa a ocorrência em cadelas com menos de cinco anos e rara quando inferior a dois anos (MISDORP, 2002). Outros fatores relacionados com a incidência destes tumores incluem o tratamento com progestágenos, a obesidade nos primeiros anos de vida e a dieta com comida caseira (ZUCCARI et al., 2008). Aparentemente não existe predisposição racial para o desenvolvimento de tumores mamários na espécie canina (DALECK et al., 1998; CAVALCANTI & CASSALI, 2006).

Os tumores mamários apresentam-se frequentemente como nódulos únicos ou múltiplos, podendo ocorrer diferentes tipos histológicos em uma ou mais glândulas mamárias de forma sincrônica (CAVALCANTI & CASSALI, 2006). Os tumores benignos apresentam-se geralmente como nódulos únicos ou múltiplos, bem circunscritos e firmes à palpação. Os tumores mamários malignos caracterizam-se por apresentarem diâmetro superior a 5 cm, podendo estar aderidos à musculatura adjacente, ou mesmo ulcerados (FERREIRA et al., 2009).

A avaliação inicial da neoplasia mamária deve considerar a idade, o histórico reprodutivo, sinais clínicos como presença de massa mamária e aumento de volume em linfonodos regionais. Alguns sinais sistêmicos como dispnéia, tosse e claudicações também podem ocorrer devido à presença de metástases desses tumores

(JONHNSTON, 1993). Essas metástases podem ocorrer por via linfática ou venosa (QUEIROGA et al., 2005), acometendo principalmente linfonodos regionais, pulmões e menos frequentemente fígado, útero, vesícula urinária ou ossos (NOWAK et al., 2007).

O diagnóstico definitivo do tumor baseia-se na análise histopatológica da biópsia, fornecendo informações importantes sobre a natureza, o tipo histológico, índice mitótico, êmbolos tumorais em vasos linfáticos e comprometimento de linfonodos adjacentes (CASSALI et al., 2011). A radiografia de tórax é um procedimento rotineiro na veterinária como auxílio no diagnóstico e a ultrassonografia abdominal é realizada quando há suspeita de possíveis metástases a distância (CAVALCANTI & CASSALI, 2006).

A remoção cirúrgica completa de tumores localizados sem metástases à distância é o tratamento que mais apresenta chances de cura, exceto nos casos de carcinomas inflamatórios que não tem indicação cirúrgica e apresentam piores prognósticos (CASSALI et al., 2011).

O exame histopatológico é o método de eleição para identificar as características de uma neoplasia (CASSALI et al., 2011). A classificação dos tumores mamários em cadelas é realizada segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) descrita por MISDORP et al. (1999).

II.2- ENZIMA CICLOOXIGENASE-2 (COX-2)

A enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) apresenta-se como um marcador potencial para o câncer de mama, uma vez que é expressa em resposta a processos inflamatórios, que frequentemente acompanham as neoplasias e alteram o seu prognóstico (DE NARDI, 2007). A ciclooxigenase-2 tem sido descrita por sua expressão aumentada em diversas neoplasias incluindo câncer de mama, além de estar envolvida nos passos críticos da carcinogênese (ROZICK, 2001; SINGH, 2002).

Trata-se de um mediador da inflamação, expressado pelo epitélio glandular da mama em condições pré-malignas e malignas, onde atua como papel principal na progressão e metástase do câncer de mama (HOWE, 2007; SINGH-RANGER, 2008).

As prostaglandinas (PG) são mediadores lipídicos de processos fisiológicos normais. A maioria das células tem a capacidade de sintetizá-las, sendo o primeiro passo a hidrólise de fosfolípidos para produzir ácido araquidônico livre, pela ação catalisadora da fosfolipase A2. O próximo passo desta via metabólica depende da ação catalisadora da COX, que insere uma molécula de oxigênio no ácido araquidônico, produzindo a Prostaglandina G2, sendo que esta é rapidamente convertida em Prostaglandina H2, pela ação peroxidativa da COX. A Prostaglandina H2 é, então, convertida por isomerasas tecido-específicas em outras Prostaglandinas (PGE2, PGD2, PGF2 α , PGI2), assim como em tromboxano e prostaciclina (FOSSILIEN, 2000).

A expressão da ciclooxigenase-2 é mediada por citocinas envolvidas no processo inflamatório como interleucina-1, fator de necrose tumoral, fatores de crescimento e oncogenes. Inúmeras pesquisas relacionam a atividade da COX-2 com o desenvolvimento e progressão tumoral em diversos tipos de câncer incluindo o câncer de mama. Ainda, a expressão da COX-2 é mais frequente e intensa nas células epiteliais dos tumores malignos, e sua super expressão induz instabilidade genômica, sugerindo uma ação potencial da COX-2 na carcinogênese mamária da cadela (DORÉ et al., 2003; DE NARDI, 2007), a semelhança do que tem sido observado em mulheres (ZUCCARI et al., 2008).

Segundo MILLANTA et al. (2006), a super expressão da *cox-2* implicaria na ativação de mecanismos associados à promoção tumoral, angiogênese sustentada, inibição da apoptose, modulação da resposta imune, maior capacidade de invasão e metástase.

Entretanto, o possível papel da COX-2 na linfangiogênese e nas metástases por via linfática é ainda pouco compreendido. Contudo há relatos que a COX-2 regula o VEGF-C e promove linfangiogenese em adenocarcinoma de pulmão em humano (SU et al.,2004).

Outros estudos também demonstraram a capacidade da COX-2 em promover a progressão de um carcinoma ductal *in situ* para um carcinoma mamário invasivo (HU et al., 2009) e que o gene COX-2 faz parte do grupo de genes responsáveis pela metástase nos pulmões e cérebro (MINN et al., 2005), além da COX-2 ser altamente expressada em carcinomas mamários inflamatórios (LEREBOURS et al., 2008).

II.3- CYSTEINE ASPARTIC ACID PROTEASE (CASPASE-3)

A adequada regulação da apoptose mostra-se importante para o desenvolvimento e manutenção dos tecidos normais (DEVERAUX et al., 2001; FISCHER, 2001; LUZ et al., 2009). Os distúrbios apoptóticos, considerados o primeiro evento em alguns tipos de câncer, permitem que células malignas tenham maior sobrevivência, contribuindo para que ocorra a expansão neoplásica (DEVERAUX et al., 2001; OHASHI et al., 2006).

A família das caspases caracteriza-se como a principal via de regulação da morte celular programada. Diferentes tipos de caspases são expressos na maioria das células vivas, localizadas no citosol, na sua forma inativa (SCHWERDT et al., 2005). A morte celular programada pode ocorrer através de duas vias principais, a via extrínseca e a intrínseca (FISHER, 2001). Pela via extrínseca, ocorrerá a ativação de receptores de membrana transmitindo sinais para o interior da célula e ativando, inicialmente a caspase-8 ou caspase-10. A via intrínseca, ativada por estresse celular, é mediada pela liberação do citocromo c pela mitocôndria, levando a ativação da caspase-9. Essas duas vias levam a ativação das caspases efetoras, as caspases-3, 6 e 7 (LORO et al., 2003).

A caspase-3, considerada a mais prevalente nas células, caracteriza-se como responsável pela maioria dos efeitos apoptóticos, como a quebra de muitas proteínas importantes na manutenção da homeostasia celular. No entanto, recebe suporte de outras, como a caspase-6 e caspase-7. Juntas, referidas como as caspases de execução ou efetoras, possuem importante função no controle da morte celular programada (OHASHI et al., 2006). A marcação da caspase-3, em imuno-histoquímica, tem sido utilizada para identificar células em apoptose, revelando fácil aplicabilidade e alta sensibilidade (LORO et al., 2003).

A caspase-3 vem sendo foco de estudos relacionados ao mecanismo da apoptose, tornando-se peça-chave no entendimento dos mecanismos de morte celular, uma vez que é ativada em resposta a vários estímulos, como os fármacos quimioterápicos, podendo sugerir que a marcação da caspase-3 possa ser usada no

controle da resposta aos tratamentos quimioterápicos quanto a possível resistência da droga (SUZUKI et al., 2002), e a diminuição da expressão possa indicar um mecanismo importante de sobrevivência celular em pacientes com câncer de mama (FURUKAWA et al., 2002).

O envolvimento da caspase-3 na indução da apoptose é descrito em muitos trabalhos, e a inibição da caspase-3 tem sido associada com a carcinogênese dos tumores de mama, sugerindo que a caspase-3 pode ser um biomarcador na prevenção e tratamento do câncer (DEVARAJAN et al., 2002).

A utilização desses marcadores de apoptose é considerada muito importante para caracterizar biologicamente o tumor, pois este fenômeno possui um papel fundamental na carcinogênese (SUZUKI et al., 2002).

II.4- VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)

O VEGF é um mitógeno específico para as células endoteliais, produzido por vários tipos celulares, como queratinócitos, macrófagos, mastócitos e fibroblastos (FERRARA, 2004). O mesmo também é conhecido por aumentar a permeabilidade vascular e estar envolvido na ocorrência e progressão do processo inflamatório e reparação tecidual (DVORAK, 2002). O VEGF é 50.000 vezes mais potente do que a histamina na habilidade de aumentar a permeabilidade vascular (DVORAK, 2002; HICKLIN & ELLIS, 2005).

Um aspecto relevante do VEGF é que o mesmo tem sua resposta altamente vinculada ao tipo de meio ambiente em que se encontra (POLVERINI, 2002). A tensão de oxigênio bem como fatores de crescimento e citocinas são reguladores importantes do VEGF (HICKLIN & ELLIS, 2005). Condições de hipóxia desempenham um papel importante na regulação da expressão de uma variedade de genes. A expressão do VEGF mRNA é induzida por exposição a baixa tensão de oxigênio. Esta condição desempenha a função de recrutar vasos sanguíneos para área de tecido isquêmico (FERRARA, 2002). Quando as condições de hipóxia predominam, como no caso de crescimento tumoral, a expressão de VEGF persiste, potencializando o processo de angiogênese e, conseqüentemente, a progressão tumoral (SHWEIKI et al., 2002).

FERRARA (1999) suporta a hipótese de que o VEGF é o maior mediador da angiogênese e seus inibidores constituem uma das melhores alternativas de tratamento para a inibição do crescimento de tumores.

II.4.1 – VEGF E SUAS ISOFORMAS

O gene VEGF está organizado em oito exons separado por sete introns (VICENTI et al., 1996). A família VEGF é composta de sete glicoproteínas diméricas conhecidas como VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F e fator de crescimento placentário (PIGF) (HOUBEN et al., 2004).

O VEGF-A, comumente referenciado como VEGF foi o primeiro a ser identificado por DVORAK et al., (1995), como um fator de indução da permeabilidade vascular secretado pelas células tumorais, sendo também referenciado como fator de permeabilidade vascular. O *splicing* alternativo do mRNA de um único gene envolvendo oito exons codifica inúmeras formas proteicas de VEGF com subunidades polipeptídicas contendo 121, 165, 189, 206 aminoácidos, respectivamente (HICKLIN & ELLIS, 2005).

A isoforma molecular mais predominantemente produzida por uma variedade de células normais, bem como células alteradas é o VEGF 165 (FERRARA, 1999), enquanto o VEGF 121 e o VEGF 189 são detectados na maioria das células e tecidos que expressam o gene VEGF. Em contraste, o VEGF 206 é uma forma rara. Já o VEGF 145 é encontrado em várias linhas celulares tumorais de órgãos reprodutores femininos (PARK et al., 1993).

A matriz extracelular (MEC) das células que expressam o VEGF 189 ou VEGF 206 auxilia o crescimento das células endoteliais. Em contraste, a proteína VEGF é bioquimicamente indetectável na MEC das células que expressam o VEGF 121 e VEGF 165. Entretanto, a MEC derivada das células que expressam o VEGF 165, é capaz de estimular o crescimento das células endoteliais, mesmo em pequenas quantidades aderidas à matriz extracelular. A explicação para isso se deve ao fato de o VEGF 165 ser mais potente que as demais isoformas (PARK et al., 1993).

O VEGF 121 é uma proteína livremente difusível; em contrapartida, o VEGF 189 e 206 são sequestrados na matriz extracelular e requerem a clivagem das proteases para a sua ativação (DVORAK, 2002).

Concluindo, temos duas formas possíveis de tornar as proteínas do VEGF disponíveis para células endoteliais: pelo *splicing* alternativo gerando glicoproteínas difusíveis como o VEGF 165 e VEGF 121, ou pela ativação de proteases e clivagem das isoformas mais longas (FERRARA, 2002).

O sistema linfático é uma importante rota para metástases na progressão do câncer, e a presença de tumor em linfonodos é considerado como fator prognóstico ruim em diversos tipos de câncer. Recentemente, a linfangiogenese associada à metástase, se tornou alvo de pesquisa depois da descoberta de dois promotores de

linfangiogene, o VEGF-C e VEGF-D, bem como seus receptores no endotélio linfático (STACKER, 2004).

O VEGF-C promove a linfangiogênese tumoral através da disseminação de células neoplásicas para linfonodos em vários modelos de câncer animal. (SKOBE et al., 2001; SAHARINEN et al., 2004). Além disso, a elevação do VEGF-C aparenta ter correlação com metástases em linfonodo em numerosos tipos de câncer em humanos, incluindo câncer de mama (STACKER et al., 2002).

II.4.2 – VEGF E SEUS RECEPTORES

Receptores do tipo tirosina-quinase para o VEGF foram identificados e se apresentam de três formas: VEGFR-1, VEGFR-2 e o receptor VEGFR-3 (FERRARA, et al., 2003; HOEBEN et al., 2004). VEGFR-1 e VEGFR-2 apresentam aproximadamente 44% de homologia. O VEGF se liga aos seus receptores utilizando quase que exclusivamente interações hidrofóbicas (FERRARA, 2002). O VEGFR-1 e o VEGFR-2 são expressos na superfície da maioria das células endoteliais vasculares, ao contrário do VEGFR-3 que se encontra restrito às células endoteliais linfáticas (FERRARA et al., 2003).

Cada isoforma da família VEGF possui diferentes especificidades de adesão a cada um dos receptores mencionados, auxiliando a elucidar a função de cada um neste contexto (HICKLIN & ELLIS, 2005). O VEGF-A se liga a ambos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2. Em contraste, PlGF e VEGF-B interagem somente com o receptor VEGFR-1. VEGF-E é seletivo ao VEGFR-2. VEGF-C e VEGF-D se ligam aos receptores VEGFR-2 e ao VEGFR-3. Este não reconhece o VEGF-A (FERRARA et al., 2003).

O VEGFR-2 é o receptor de maior importância no processo de angiogênese e aumento nos efeitos da permeabilidade do VEGF, estando o mesmo envolvido no processo de diferenciação, no processo de diferenciação das células endoteliais (NEUFELD et al., 1999; FERRARA, 1999), quimiotaxia e sobrevivência celular (FERRARA et al., 2003). O VEGFR-2 tem uma menor afinidade com o VEGF quando comparado ao VEGFR-1, porém uma maior atividade sinalizadora. O VEGFR-2 sofre

uma fosforilação da tirosina e media a mitogênese, a migração celular e a permeabilidade vascular em resposta ao VEGF, enquanto o VEGFR-1 apresenta fraca ou indetectável resposta (FERRARA et al., 2003).

O receptor VEGFR-3 está presente em todo o endotélio durante o processo de desenvolvimento, mas na fase adulta o mesmo restringe-se às células endoteliais. A expressão do VEGFR-3 é importante no início da formação dos vasos sanguíneos, tornando-se redundante tal função em vasos maduros (TAMELA et al., 2005). A ativação deste receptor estimula mitoses, migração, diferenciação e sobrevivência das células endoteliais linfáticas, mediando, desse modo, o processo de linfangiogênese (HOEBEN et al., 2004).

As células endoteliais bem como alguns tumores expressam co-receptores para VEGF não tirosina quinase: neuropilina-1 (Nrp-1) e neuropilina-2 (Nrp-2) (HICKLIN & ELLIS, 2005) os quais ligam-se seletivamente à isoforma VEGF-165 (NEUFELD et al., 2002). Ambos estão envolvidos no processo imunológico e desenvolvimento neuronal, mas também assumem um papel importante no processo de angiogênese (TAMELA et al., 2005).

O Nrp-1 atua como co-receptor aumentando as interações VEGF-VEGFR-2, sendo sua expressão mais restrita as artérias, enquanto o Nrp-2 restringe-se as veias (TAMELA et al., 2005). O VEGFR-2 liga-se ao VEGF-165 mais eficientemente em células que expressam Nrp-1 (NEUFELD et al., 1999). O Nrp-2 é também expresso em células endoteliais linfáticas. Mutações no Nrp-2 podem induzir anormalidades durante a formação de pequenos vasos linfáticos (TAMELA et al., 2005). Evidências recentes sugerem que o VEGF pode diretamente interagir com co-receptores Nrp sem a utilização dos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 (HICKLIN & ELLIS, 2005).

III. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Investigar a imunorreatividade da ciclooxigenase-2, do VEGF e da Caspase-3 nas neoplasias mamárias de cadelas.
- Correlacionar à expressão da COX-2 com o VEGF e com a Caspase-3 em cada grupo deste estudo.
- Contribuir com o estudo da oncologia veterinária no entendimento da carcinogênese mamária.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

IV.1- ESCOLHA DOS TUMORES

Para a realização deste estudo foram selecionados 60 amostras de tumores mamários de cadelas. Estas amostras foram divididas em seis grupos, composto por 10 tumores em cada grupo, de acordo com a classificação histopatológica.

Para a escolha dos adenomas (Grupo 1), carcinomas com prognóstico bom (Grupo 2) e carcinomas com prognóstico ruim (Grupo 3) além da classificação histológica foi considerada a evolução clínica do tumor na seleção dos casos. As outras 30 amostras foram compostas por 10 casos de carcinoma primário metastático (Grupo 4), 10 de metástase pulmonar (Grupo 5) e 10 de carcinoma inflamatório (Grupo 6).

IV.1.1-ADENOMA, CARCINOMA COM PROGNÓSTICO BOM E CARCINOMA COM PROGNÓSTICO RUIM

Os casos de adenoma (Grupo 1), carcinoma com prognóstico bom (Grupo 2) e carcinoma com prognóstico ruim (Grupo 3) foram selecionados a partir de pacientes atendidas pelo Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário da Universidade Estadual Paulista campus Jaboticabal.

Procurou-se estabelecer o estadiamento clínico das neoplasias por meio da mensuração do tamanho do(s) tumor(es) com auxílio de um paquímetro, procedeu-se também à avaliação dos linfonodos quanto ao tamanho, mobilidade e envolvimento por células neoplásicas, por meio do exame citológico. A avaliação radiográfica do tórax e a

ultra-sonográfica do abdome objetivaram pesquisar a presença ou não de metástases nestas cavidades. O estadiamento clínico das neoplasias mamárias foi realizado segundo o sistema TNM (Tumor/ Linfonodo/ Metástase) proposto pela OMS (OWEN, 1980).

Após a realização do estadiamento da doença planejou-se a execução do procedimento cirúrgico. A mastectomia foi realizada com amplas margens de segurança, ressecando-se sempre 2 a 3 cm de tecido normal perineoplásico. Outros princípios da cirurgia oncológica foram seguidos, como por exemplo, a remoção dos linfonodos satélites.

Após a cirurgia adequada para cada caso específico efetuou-se a colheita das amostras contendo tecido neoplásico para a classificação da histogênese tumoral. Os fragmentos dos tumores foram fixados em solução de formol a 10%, tamponada com fosfato, pH 7,2. Após um período de fixação de aproximadamente oito horas, o material foi colocado em álcool 80, seguindo os procedimentos usuais para inclusão em parafina. Nos blocos obtidos realizaram-se cortes de cinco micrômetros de espessura, os quais foram corados pela Hematoxilina-eosina e utilizados para observação histológica, permitindo a confirmação do diagnóstico e classificação dos tumores, mediante os critérios estabelecidos por MISDORP et al. (1999). As 30 amostras foram então divididas em três grupos, de acordo com a classificação histopatológica e evolução clínica do tumor¹.

No período pós-operatório as pacientes foram avaliadas trimestralmente por exames físico e complementares, com o propósito de monitorar a evolução da afecção

neoplásica (presença ou ausência de recidiva e/ou metástase; paciente vivo ou morto), procedimento este que teve continuidade até o mês de dezembro de 2006.

IV.1.2- CARCINOMA PRIMÁRIO METASTÁTICO, METÁSTASE PULMONAR E CARCINOMA INFLAMATÓRIO

Dez animais submetidos à necropsia pelo Serviço de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Paraná foram contabilizados a este estudo. Em todos os casos os pacientes apresentavam metástases pulmonares de carcinoma mamário.

Durante a necropsia teve-se o cuidado de colher fragmentos da neoplasia mamária (carcinoma primário metastático – Grupo 4) e das metástases pulmonares (metástase pulmonar – Grupo 5). Para estes pacientes, não existem informações em relação à evolução clínica do tumor, pois inúmeros animais chegaram mortos ao Hospital Veterinário em virtude da progressão do processo neoplásico.

Além disto, utilizaram-se 10 casos de carcinoma inflamatório (Grupo 6) e 10 amostras de tecido mamário livre de malignidade (Grupo 7 – controle) provenientes do arquivo do Serviço de Oncologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Botucatu.

Os fragmentos de cada uma das amostras foram fixadas em formol 10%, recortados com o auxílio de micrótomo (5 μ m de espessura) e submetidos à coloração de Hematoxilina e Eosina. Após a confecção da lâmina, procedeu-se à avaliação

através da microscopia de luz, definindo-se assim o diagnóstico do tumor mamário, de acordo com a classificação proposta por MISDORP et al. (1999).

IV.2- ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

Para a realização da técnica de imuno-histoquímica, os blocos de parafina foram cortados em micrótomo, com espessura de 3 μ m e distendidos em lâminas histológicas devidamente preparadas com Poly-L-Lysina (Sigma P8920) com o objetivo de promover maior aderência dos cortes às lâminas de vidro, evitando assim a perda do material durante o processamento.

A técnica de imuno-histoquímica seguiu o protocolo do Laboratório de Imuno-histoquímica do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu, utilizando-se a técnica de estreptoavidina-biotina-peroxidase (Anexos 1 e 2). Os anticorpos utilizados estão descritos na quadro 01.

Quadro 01 Relação dos anticorpos primários, clone e código, marca do anticorpo, recuperação antigênica e diluição utilizada nos cortes de neoplasias mamárias de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da UFPR, câmpus de Curitiba, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004. UNESP – Botucatu, SP, 2006.

Anticorpo 1°	Clone e código	Marca do anticorpo	Recuperação antigênica	Diluição
COX-2	CX-294 M3617	Dako	Citrato* em banho- maria**	1:50
VEGF(A-20)	sc-152	SantaCruz Biotechnology	Citrato* em banho- maria**	1:50
Caspase-3 clivada	Policlonal (Asp175)	Neomarkers	Citrato* em banho- maria**	1:100

* Citrato: 10 milimolar, pH 6,0.

** Banho-maria: solução pré-aquecida 96,5°C. As lâminas foram incubadas durante 25 minutos em banho-maria.

O percentual de positividade para COX-2, VEGF e Caspase-3 foi obtido pela análise de células imunorreativas com o auxílio de um equipamento analisador de imagens Image J.

IV.3 – DENSITOMETRIA

Após a obtenção da imagem através da câmera LAS EZ acoplada ao microscópio, estas foram submetidas à densitometria onde a marcação variou de acordo com a intensidade da luz captada pelo programa Image J.

A imagem foi convertida em preto e branco e cinco campos de cada imagem foram analisados (Figura. 03-A). O valor da intensidade da marcação de cada campo corresponde à subtração do valor da intensidade máxima da luz pela média obtida da análise do programa (Figura. 03-B), pelo valor máximo de luz captada pelo programa equivalente a 255.

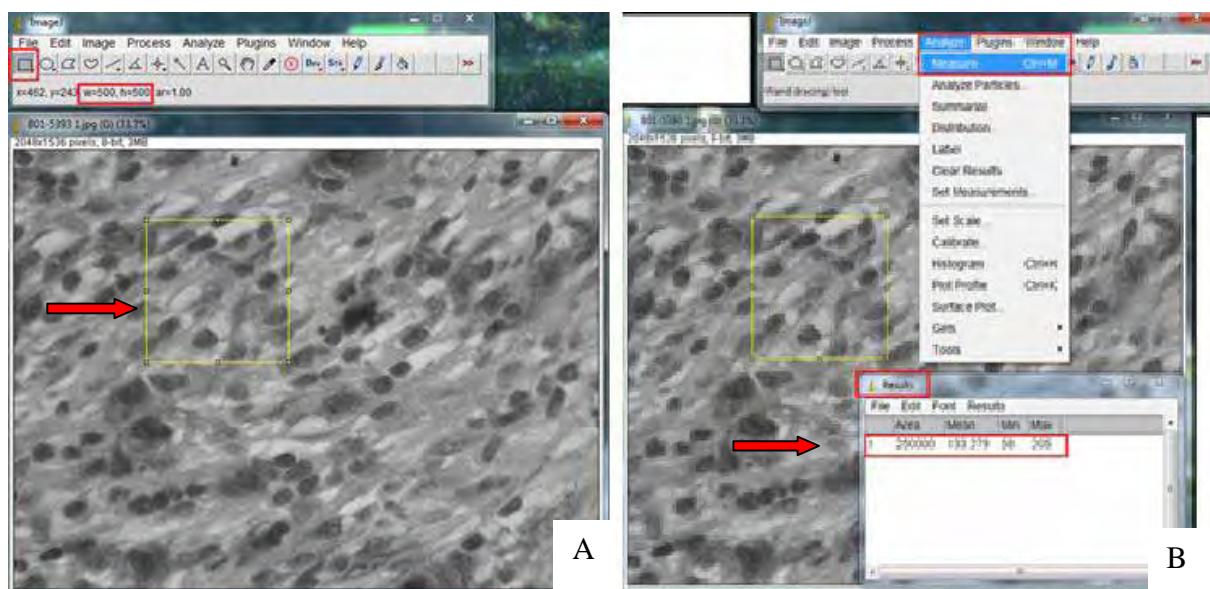


Figura 03: Em A – Exemplo de fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica convertida em preto e branco pelo programa *Image J*. Notar a seleção do campo a ser analisado (seta vermelha). Em B – Mesma imagem sendo analisada pelo programa e gerando um valor correspondente a intensidade de marcação (seta vermelha). FAMERP – São José do Rio Preto, SP, 2011.

IV.4- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos ao programa GraphPad Prisma versão 4.0. A independência dos resultados (expressão para os anticorpos COX-2, Caspase-3 e VEGF) assim como a correlação das expressões COX-2 x Caspase-3; COX-2 x VEGF; Caspase-3 x VEGF foram analisados, utilizando-se o teste de Análise de Variância (ANOVA) seguido do *post test Student Newman keuls* para a independência dos resultados e o *teste de Pearson* para as correlações.

V. RESULTADOS

V.1- IMUNORREATIVIDADE PARA A COX-2

A avaliação da intensidade de marcação da Cox-2 variou entre o número de células marcadas e a classificação histopatológica, havendo um aumento gradativo na sua expressão nos tumores malignos. O grupo metástase pulmonar foi o grupo que mais expressou COX-2 (Figura 02), seguido do carcinoma primário metastático. O grupo adenoma apresentou a menor imunomarcação, seguido do grupo controle e do grupo carcinoma inflamatório (Quadro 02 A-B). A imunorreatividade para a Cox-2 foi inteiramente confinada ao componente epitelial das neoplasias, sendo que o mesmo foi visto no grupo controle (Figura 03).

Quadro 02: Valores correspondentes a imunomarcação da COX-2 nos grupos de tumores e no grupo controle. Em A – observar a média e o erro padrão da intensidade de marcação da COX-2 em cada grupo. Em B - observar os grupos que apresentaram diferenças significativas entre si.

A	Adenoma	Carcinoma de prognóstico bom	Carcinoma de prognóstico ruim	Carcinoma primário metastático	Metástase pulmonar	Carcinoma inflamatório	Controle
Média	73,68	80,07	88,38	93,15	97,98	88,04	85,44
Erro Padrão	2,818	4,032	2,314	2,852	1,805	3,002	2,412

B	Comparações	p-valor
	Adenoma vs. Metástase pulmonar	p<0,001
	Adenoma vs. Carcinoma primário metastático	p<0,001
	Adenoma vs. Carcinoma de prognóstico ruim	p<0,01
	Adenoma vs. Carcinoma inflamatório	p<0,01
	Adenoma vs. Controle	p<0,05
	Carcinoma de prognóstico bom vs. Metástase pulmonar	p<0,01
	Carcinoma de prognóstico bom vs. Carcinoma primário metastático	p<0,05
	Controle vs. Metástase pulmonar	p<0,05

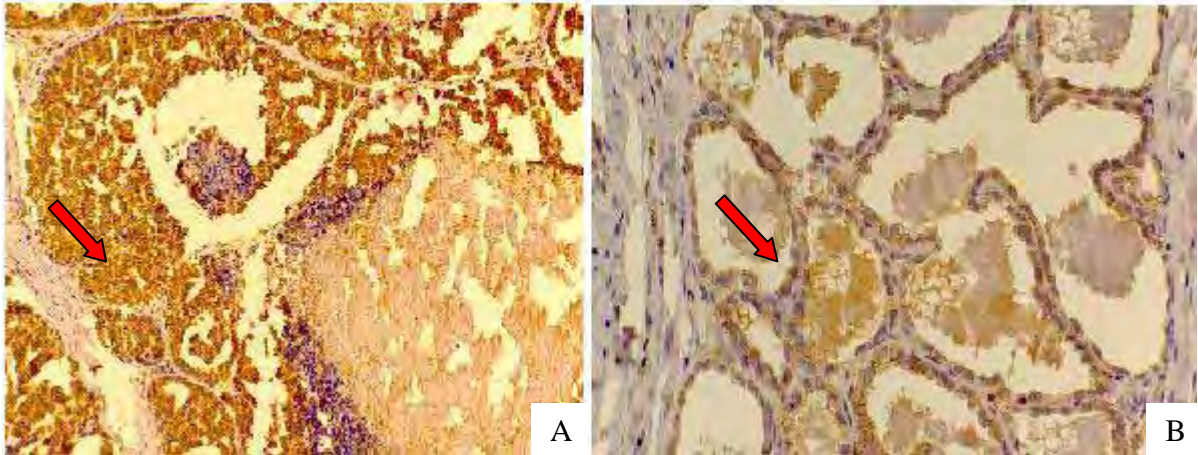


Figura 02: Em A - Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de uma metástase pulmonar em cadela. Observar intensa marcação das células epiteliais para a atividade da ciclooxigenase-2. Aumento: 400 vezes (seta vermelha). Em B - Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica de um adenoma mamário em cadela. Observar fraca marcação no componente epitelial do tumor para atividade da ciclooxigenase-2 (seta vermelha). Contra-coloração: Hematoxilina de Mayer. Aumento: 1000 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2011.

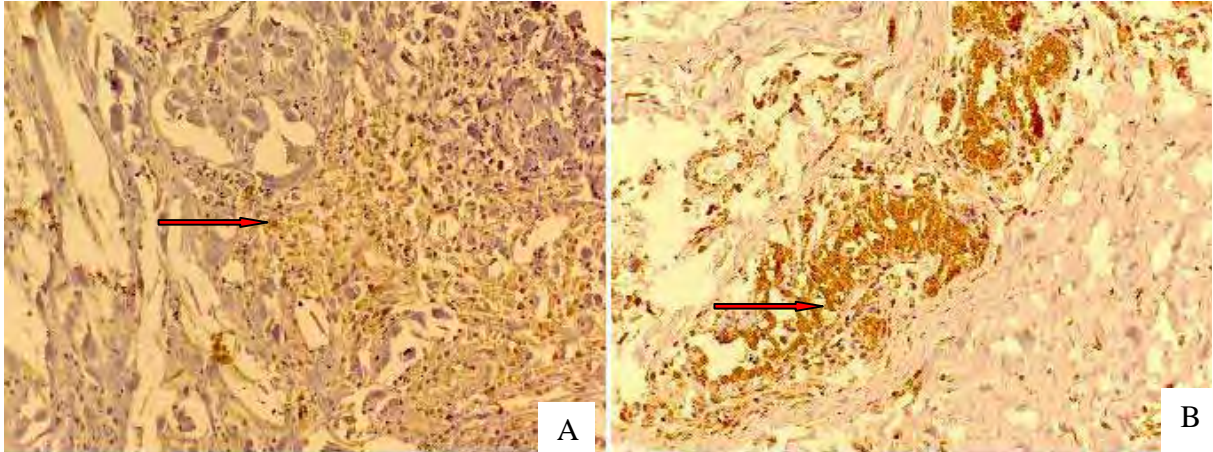


Figura 03: Em A - Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica de carcinoma inflamatório em cadela, na qual se observa fraca marcação das células neoplásicas (seta vermelha), para atividade da ciclooxigenase-2. Em B - Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica de um carcinoma de progóstico ruim em cadela. Observar moderada marcação no componente epitelial do tumor (seta vermelha) para atividade da ciclooxigenase-2 (Aumento 400 vezes). Contra-coloração: Hematoxilina de Mayer. UNESP – Botucatu, SP, 2011.

V.2- IMUNORREATIVIDADE PARA A CASPASE-3

A avaliação da intensidade de marcação da Caspase-3 variou entre o número de células marcadas e a classificação histopatológica, havendo uma moderada expressão em todos os grupos de tumores, sendo o grupo Adenoma o que mais expressou a Caspase-3 seguido dos grupos Carcinoma de prognóstico ruim (Figura 04) e Carcinoma de prognóstico bom. O grupo que menos expressou foi o Controle (Figura 05) (Quadro 03 A-B).

Quadro 03: Valores correspondentes a imunomarcação da Caspase-3 nos grupos de tumores e no grupo controle. Em A – observar a média e o erro padrão da intensidade de marcação da Caspase-3 em cada grupo. Em B - observar os grupos que apresentaram diferenças significativas entre si.

A	Adenoma	Carcinoma de prognóstico bom	Carcinoma de prognóstico ruim	Carcinoma primário metastático	Metástase pulmonar	Carcinoma inflamatório	Controle
Média	63,82	62,52	63,43	57,55	56,74	59,52	47,39
Erro Padrão	1,795	3,185	3,664	1,651	2,216	1,531	1,962

B

Controle vs. Adenoma	p<0,001
Controle vs. Carcinoma de prognóstico ruim	p<0,001
Controle vs. Carcinoma de prognóstico bom	p<0,01
Controle vs. Carcinoma inflamatório	p<0,01
Controle vs. Carcinoma primário metastático	p<0,05
Controle vs. Metástase pulmonar	p<0,05

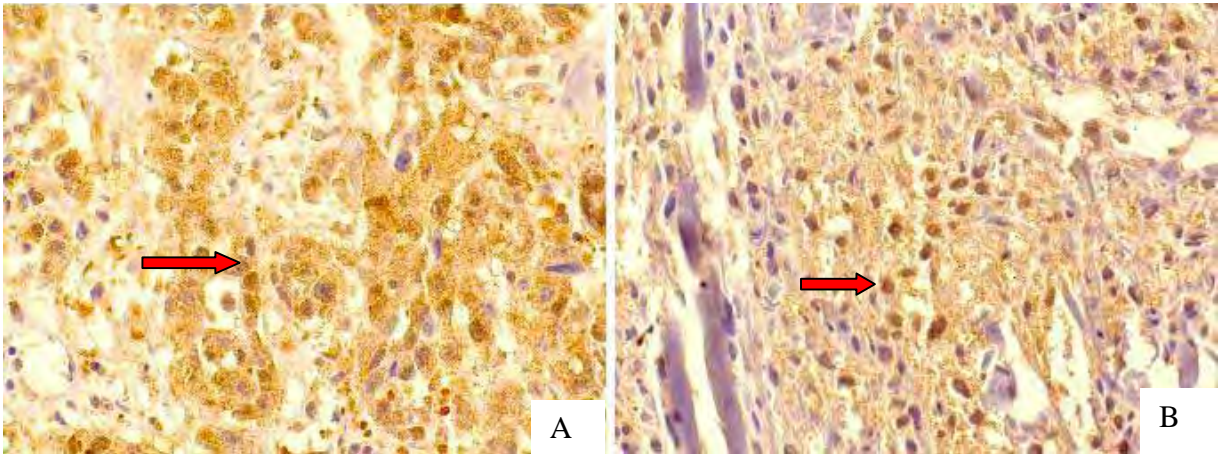


Figura 04: Em A - Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um carcinoma de prognóstico ruim em cadela. Observar moderada marcação nuclear das células tumorais (seta vermelha) para a atividade da caspase-3. Aumento: 400 vezes. Em B - Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica de um carcinoma inflamatório em cadela. Observar fraca marcação nuclear das células tumorais (seta vermelha) para atividade da caspase-3. Contra-coloração: Hematoxilina de Mayer. Aumento: 1000 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2011.

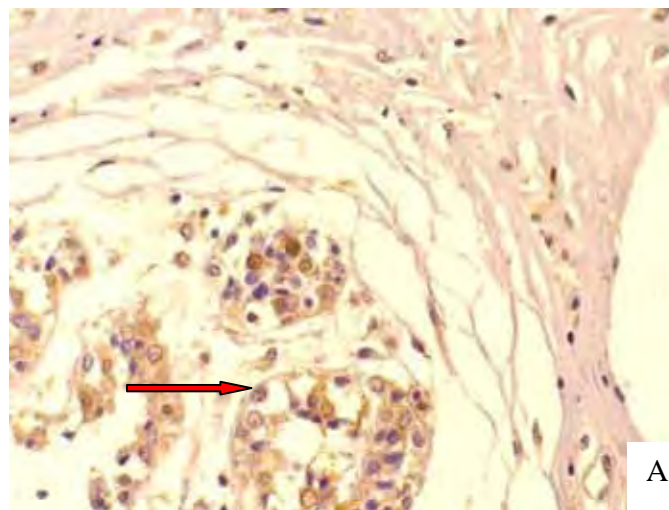


Figura 05: Em A - Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica de parênquima mamário (controle) em cadela. Observar fraca marcação nuclear das células tumorais (seta vermelha) para a atividade da caspase-3. Aumento: 1000 vezes. Contra-coloração: Hematoxilina de Mayer. UNESP – Botucatu, SP, 2011.

V.3-IMUNORREATIVIDADE PARA VEGF

A avaliação da intensidade de marcação da Cox-2 variou entre o número de células marcadas e a classificação histopatológica, havendo um aumento gradativo na sua expressão nos tumores malignos. O grupo Carcinoma de prognóstico ruim foi o grupo que mais expressou VEGF seguido do grupo Metástase pulmonar e Carcinoma primário metastático (Figura 07). O grupo Adenoma apresentou a menor imunomarcação (Figura 06), seguido do grupo Controle e do grupo Carcinoma inflamatório (Figura 08). A imunorreatividade para o VEGF foi interiramente confinada ao componente epitelial das neoplasias e do grupo controle. As médias dos grupos e as diferenças significativas são descritas abaixo (Quadro 04 A-B)

Quadro 04: Valores correspondentes a imunomarcação do VEGF nos grupos de tumores e no grupo controle. Em A – observar a média e o erro padrão da intensidade de marcação do VEGF em cada grupo. Em B - observar os grupos que apresentaram diferenças significativas entre si.

A	Adenoma	Carcinoma de prognóstico bom	Carcinoma de prognóstico ruim	Carcinoma primário metastático	Metástase pulmonar	Carcinoma inflamatório	Controle
Média	88,5	122,4	133.4	125.5	127.5	105.2	108.4
Erro Padrão	12.92	1,276	4,254	4487	4,21	5.92	5,171

B		
	Adenoma vs. Carcinoma de prognóstico ruim	p< 0,001
	Adenoma vs. Metástase pulmonar	p< 0,01
	Adenoma vs. Carcinoma primário metastático	p< 0,01
	Adenoma vs. Carcinoma de prognóstico bom	p< 0,01
	Carcinoma inflamatório vs. Carcinoma de prognóstico ruim	p< 0,05

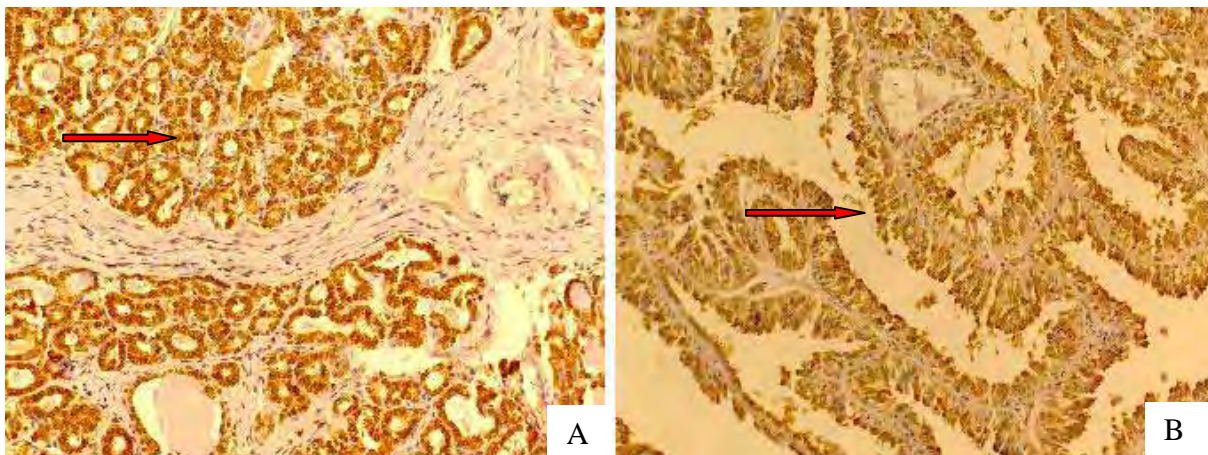


Figura 06: Em A - Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica de um adenoma mamário em cadela. Observar intensa marcação das células epiteliais (seta vermelha) para a atividade do VEGF. Aumento: 400 vezes (seta vermelha). Em B - Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica de um carcinoma de prognóstico bom. Observar moderada marcação do componente epitelial do tumor (seta vermelha) para atividade do VEGF. Contra-coloração: Hematoxilina de Mayer. Aumento: 400 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2011.

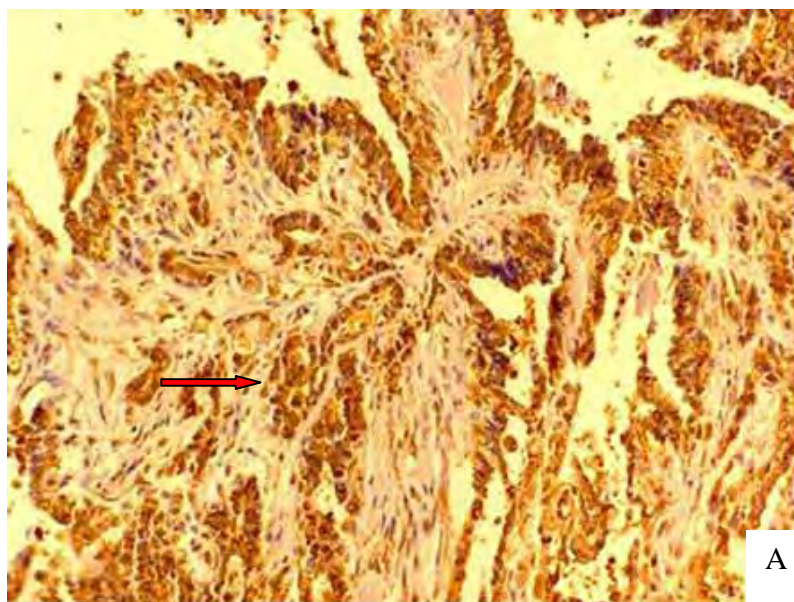


Figura 07: Em A - Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica de carcinoma de prognóstico ruim em cadela. Observar intensa marcação das células epiteliais (seta vermelha) para a atividade do VEGF. Aumento: 400 vezes. Contra-coloração: Hematoxilina de Mayer. UNESP – Botucatu, SP, 2011.

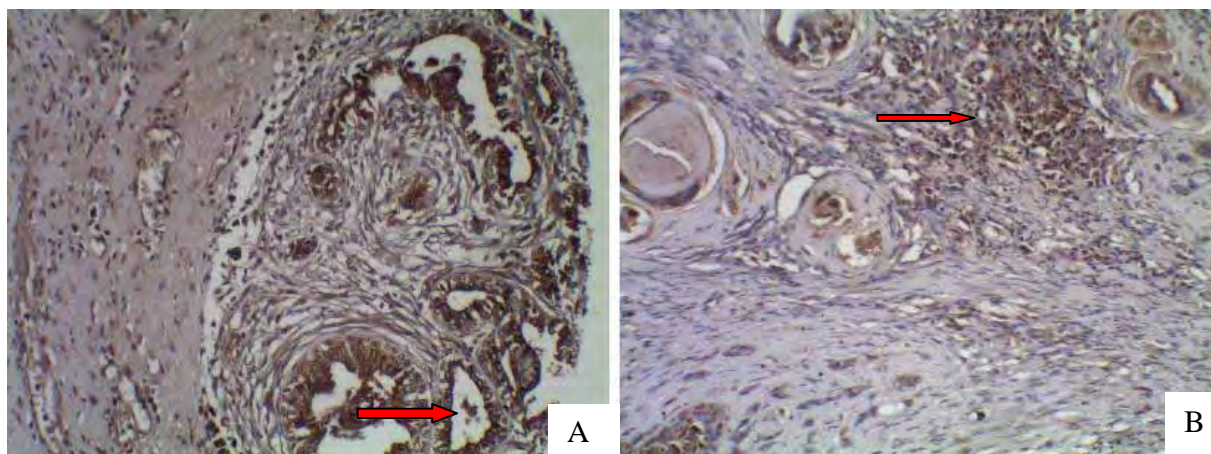


Figura 08: Em A - Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica de um carcinoma primário metastático em cadela. Observar forte marcação para a atividade do VEGF das células epiteliais nos vasos (seta vermelha) caracterizando embolos neoplásicos. Aumento: 400 vezes (seta vermelha). Em B - Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica de um carcinoma inflamatório. Observar moderada marcação do componente epitelial do tumor (seta vermelha) para atividade do VEGF. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento: 400 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2011.

V.4 CORRELAÇÕES

A correlação da expressão da COX-2 com a Caspase-3 e o VEGF variou de acordo com os grupos, apresentando no grupo adenoma, correlação negativa com a expressão da Caspase-3 e positiva com a expressão do VEGF. No grupo Carcinoma de prognóstico bom a correlação da expressão da COX-2 foi negativa com a Caspase-3 e VEGF. No grupo Carcinoma de prognóstico ruim houve correlação positiva com a Caspase-3 e negativa com o VEGF. No grupo Carcinoma primário metastático foi observado correlação negativa da COX-2 com a Caspase-3 e positiva com o VEGF. Já no grupo Metástase pulmonar a correlação foi positiva na expressão dos dois anticorpos. A mesma correlação foi observada no grupo Carcinoma inflamatório. No grupo Controle foi observada uma correlação negativa da expressão da COX-2 com as expressões da Caspase-3 e VEGF (Quadro 05).

Quadro 05 – Correlação da expressão da COX-2 com a Caspase-3 e o VEGF em cada grupo tumoral e no grupo controle.

	Caspase-3	VEGF
Adenoma (COX-2)	r= -0,8740	r= 0,2611
Carcinoma de prognóstico bom (COX-2)	r= -0,3219	r= -0,7089
Carcinoma de prognóstico ruim (COX-2)	r= 0,6196	r= -0,6771
Carcinoma primário metastático (COX-2)	r= -0,3303	r= 0,3616
Metástase pulmonar (COX-2)	r= 0,1038	r = 0,3768
Carcinoma inflamatório (COX-2)	r= 0,5776	r= 0,4928
Controle (COX-2)	r= -0,9124	r= -0,4217

VI – DISCUSSÃO

O estudo dos tumores mamários em cadelas tem demonstrado um excelente modelo para pesquisa de novos marcadores tumorais prognósticos e preditivos tanto para esta espécie como para a espécie humana, devido à elevada similaridade do comportamento biológico que esta neoplasia apresenta em ambas as espécies (ZUCCARI et al., 2008; CASSALI et al., 2011). A utilização da técnica imuno-histoquímica contribui para um diagnóstico e prognóstico mais preciso, complementando o diagnóstico histopatológico (ZUCCARI et al., 2008).

A análise de imagens de preparações imuno-histoquímicas utilizando o software ImageJ, apresenta vantagens quando comparada a avaliação visual por um observador, pois permite uma melhor acurácia na obtenção dos valores correspondentes a imunomarcção (VREKOUSSIS et al., 2009).

A expressão da COX-2 foi superior nos grupos correspondentes as neoplasias malignas quando comparado ao grupo de adenomas. Estes achados suportam os resultados obtidos por QUEIROGA et al. (2011) que associaram a alta expressão da COX-2 em tumores que apresentam um comportamento mais agressivo, com crescimento infiltrativo, alto pleomorfismo nuclear e alto índice mitótico.

A expressão para COX-2 se restringiu ao componente epitelial das neoplasias. Nenhuma imunomarcção foi observada no componente mesenquimal corroborando os achados de De NARDI (2007).

No grupo controle foi observado uma moderada imunomarcção da enzima COX-2. Podemos considerar que esta enzima também é expressa em condições fisiológicas por células não neoplásicas. Neste caso, as células do sistema imunológico atuam em seu microambiente, secretando citocinas com propriedades pró e anti inflamatórias responsáveis por manter a homeostasia celular (RIBATTI & CRIVELLATO, 2009).

As alterações moleculares observadas em células neoplásicas de pacientes oncológicos relacionadas a apoptose celular fornecem informações importantes relacionadas ao comportamento tumoral. A Caspase-3, principal caspase envolvida neste fenômeno, apresentou níveis elevados em todos os grupos tumorais quando

comparada ao grupo controle, neste estudo. A este fato podemos atribuir que durante o crescimento tumoral, há um equilíbrio entre a proliferação e morte celular onde a apoptose está envolvida (PEREIRA et al., 2003). Em um estudo conduzido por PEREIRA et al. (2003) a presença de um alto índice apoptótico foi correlacionada com uma maior agressividade de neoplasias mamárias em cadelas, conferindo um pior prognóstico.

Em outro estudo conduzido por NAKOPOULOU et al. (2001) onde, através da imuno-histoquímica, a CASPASE-3 foi marcada em amostras de neoplasias mamárias, foi observado alta expressão deste marcador em câncer de mama quando comparado ao tecido mamário não neoplásico. Estes resultados do presente trabalho suportam os achados destes autores.

O processo de angiogênese é um processo dinâmico extremamente complexo, regulado por diversos fatores pró e anti angiogênicos. O fator de crescimento endotelial vascular é o principal regulador deste processo (HICKLIN & ELLIS, 2005). No presente estudo, a imunomarcagem do VEGF foi alta no grupo carcinoma de prognóstico bom, carcinoma de prognóstico ruim, carcinoma primário metastático e metástase pulmonar. No grupo adenoma foi observada uma expressão menor quando comparado aos outros grupos, apresentando uma diferença significativa ($p < 0,001$) quando confrontada ao grupo carcinoma de prognóstico ruim. O anticorpo utilizado neste experimento é capaz de marcar três isoformas do VEGF-A: VEGF-121, VEGF-165, e VEGF-189. Essas três isoformas são as principais formas moleculares produzidas por células e tecidos em condições fisiológicas. De acordo com HICKLIN & ELLIS (2005), o VEGF-A tem papel importante na embriogênese, na cicatrização de ferimentos, na ovulação, manutenção da gravidez e no controle da pressão arterial. Dessa forma, caracteriza-se um anticorpo de baixa especificidade na marcação da angiogênese tumoral. A este fato podemos explicar a expressão alta de VEGF no grupo controle.

No presente estudo, o grupo carcinoma inflamatório apresentou baixa expressão de VEGF quando comparado aos demais grupos de tumores malignos. A este fato, podemos dizer que o anticorpo utilizado é capaz de marcar a variante VEGF-A. principal responsável pela angiogênese tumoral, contudo, o carcinoma inflamatório utiliza com

principal rota de disseminação tumoral e metástases à distância, a linfangiogênese. Segundo VERMEULEN et al. (2010) a variante responsável pela linfangiogênese é o VEGF-C.

Em um estudo conduzido por QUEIROGA et al. (2011) a participação da COX-2 na progressão das neoplasias mamárias de cadelas é descrita por estar expressa em tumores malignos e benignos, e sua super-expressão tem sido associada ao aumento na produção do VEGF e ao aumento na densidade da microvasculatura intra-tumoral. Os autores do presente estudo observaram uma correlação significativa entre a expressão de COX-2 e VEGF em neoplasias mamárias malignas em cadelas. Além disto, o VEGF tem sido proposto como um fator de sobrevivência, protegendo células neoplásicas da apoptose (BARR et al., 2008), e a COX-2 atua estimulando o gene bcl-2, responsável pela produção de proteínas anti-apoptóticas. (GATELY & LI, 2004).

As correlações observadas no presente trabalho suportam os resultados obtidos pelos estudos supra-citados a medida que foram observadas correlações positivas entre COX-2 e VEGF em todos os grupos deste experimento.

VII – CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir:

- ✓ A enzima ciclooxigenase-2 apresenta alta expressão nos tumores de mama e sua expressão é maior nos tumores de pior prognóstico;
- ✓ A enzima Caspase-3 apresenta expressão significativa nos tumores mamários de cadelas e baixa expressão em tecido mamário livre de malignidade;
- ✓ O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A) apresenta alta sensibilidade e baixa especificidade na imunomarcação das neoplasias mamárias de cadelas;
- ✓ Existe forte correlação do VEGF com a Cox-2 nas neoplasias mamárias de cadelas.

VIII. REFERÊNCIAS

Andrade FHE; Figueiroa FC; Bersano PRO; et al. Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. *Diagnostic Pathology*. 2010; 45:1-5.

Barr MP; Bouchier-Hayes DJ; Harmey JJ. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for breast tumour cells under hypoxia. *International Journal of Oncology*. 2008; 32: 41–48.

Cassali GD; Lavalle GE; De Nardi; et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 2011; 4(2): 153-180.

Cavalcanti MF; Cassali GD. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas - revisão. *Clínica Veterinária*. 2006; 61: 56- 63.

Daleck CR; Franceschini PH; Alessi AC; et al. Aspectos clínicos e cirúrgicos do tumor mamário canino. *Ciência Rural*. 1998; 28(1): 95- 100.

De Nardi AB. Correlação da cicloxigenase-2, com Ki67, P53 e CASPASE-3, nas neoplasias de mama em cadelas. [Tese]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista; 2007.

Devarajan E; Sahin AA; Chen JS; et al. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene*. 2002; 21: 8843–8851.

Deveraux QL; Schendl SL; Reed JC. Antiapoptotic proteins. The bcl-2 and inhibitor of apoptosis protein families. *Cardiology Clinics*. 2001; 19(1): 57-74.

Dore M; Lanthier I; Sirois J. Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*. 2003; 40(2): 207-212.

Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2002; 20(21): 4368-80.

Dvorak HF; Brown LF; Detmar M; Dvorak A. Vascular permeability factor/ Vascular endothelial growth factor, microvascular hypermeability, and angiogenesis. *The American Journal of Pathology*. 1995; 146(5): 1029-35.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews*. 2004; 25(4): 581-611.

Ferrara N; Gerber HP; Le Couter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*. 2003; 9(6): 669-676.

Ferrara N. VEGF and quest for tumor angiogenesis factors. *Nature Reviews Cancer*. 2002; 2(10): 795-803.

Ferrara N. VEGF: molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *Journal of Molecular Medicine*. 1999; 77(7): 527-43.

Ferreira E; Bertagnolli AC; Cavalcanti MF; Schmitt FC, Cassali GD. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*. 2009; 7: 1-6.

Fischer DE. Pathways of apoptosis and the modulation of cell death in cancer. *Hematology and Oncology Clinics of North American*. 2001; 15(5): 51-55.

Fosslien E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Annals of Clinical and Laboratory Science*. 2000; 30(1): 3-21.

Furukawa Y; Nishimura N; Satoh M; et al. Apaf-1 is a mediator of E2F-1-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277: 39760-68.

Gately S; Li WW. Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy. *Seminars in Oncology*. 2004; 31: 2–11.

Gown AM; Bacchi CE. *Diagnostic Immunohistochemistry of Solid Tumors*. United States and Canadian Academy of Pathology. 2005. Disponível em [http// www.uscap.org](http://www.uscap.org)

Harris RE. Cyclooxygenase-2 (cox-2) and the inflammogenesis of cancer. *Subcellular Biochemistry*. 2007; 42:93.

Hicklin D; Ellis LM. Role of vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology*. 2005; 23(5): 1011-27.

Hoeben A; Landuyt B; Highley MS; et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacological Reviews*. 2004; 56(4): 549-80.

Howe LR. Inflammation and breast cancer. Cyclooxygenase/prostaglandin signaling and breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2007; 9: 210.

Hu M; Peluffo G; Chen H; et al. Role of COX-2 in epithelial-stromal cell interactions and progression of ductal carcinoma in situ of the breast. *Proceedings of the National Academy of Science*. 2009; 106: 3372.

Jacobs EL; Haskell MC. Clinical use of tumor markers in oncology. *Current Problems in Cancer*. 1991; 15(6): 299-360.

Johnston SD. Reproductive systems. In: Slatter D. Textbook of small animal surgery. 2 ed. Philadelphia: Sanders; 1993. p. 2177-2192.

Lerebours F, Vacher S, Andrieu C, et al. NF-kappa B genes have a major role in inflammatory breast cancer. *BioMed Central Cancer*. 2008; 8: 41.

Liu CH; Chang SH; Narko K; et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276: 18563-69.

Loro LL; Vintermyr OK; Johannessen AC. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2003; 32: 125-138.

Luz MR; Cesario MD; Binelli M; Lopes MD. Canine corpus luteum regression: apoptosis and caspase-3 activity. *Theriogenology*. 2009; 66(6-7): 1448-53.

Millanta F; Citi S; Della Santa D; et al. COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2006; 98(1): 115-20.

Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. 2005; 436: 518

Misdorp W; Else RW; Hellmen E. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. *Armed Forces Institute of Pathology*. 1999; 7(1): 1-59.

Misdorp W. Malignant Mammary tumors in the dog and cat. In: Mouton DJ. *Tumors in Domestic Animals*. 4.ed. Iowa State press; 2002. p. 589-606.

Nakopoulou L; Alexandrou P; Stefanaki K; et al. Immunohistochemical expression of caspase-3 as an adverse indicator of the clinical outcome in human breast cancer. *Pathobiology*. 2001; 69: 266-73.

Neufeld G; Kessler O; Herzog Y. The interaction of neuropilin-1 and neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2002; 515: 81–90.

Neufeld G; Cohen T; Gengrinovitch S; Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1999; 13(1): 9-22.

Nowak M; Madej JP; Rossowska J; et al. Involvement of CD8+ cells in protective mechanisms in canine mammary adenocarcinomas. *Bull Veterinary Institute Pulawy* 2007; 51:445-448.

Ohashi E; Miyajima N; Nakagawa T; et al. Retinoids induce growth inhibition and apoptosis in mast cell tumor cell lines. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2006; 68(8): 797-802.

Park JE; Keller GA; Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform: Differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Molecular Biology of the Cell*. 1993; 4(12): 1317-26.

Pereira KS; Zuccari DAPC; Cury PM; Cordeiro JA. Apoptosis as a prognostic marker in canine mammary tumors by TUNEL. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2003; 40: 359-365.

Polverini, PJ. Angiogenesis in health and disease insights into mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of Dental Education*. 2002; 66(8): 962-75.

Queiroga FL; Perez-Alenza MD; Silvan G; et al. Cox-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological features and prognostic significance. *Anticancer Research*. 2005; 25(6B): 4269-75.

Queiroga FL; Pires I; Parente M; et al. COX-2 over-expression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer. *The Veterinary Journal*. 2011; 189: 77–82.

Ribatti D; Crivellato E. The contribution of immune cells to angiogenesis in inflammation and tumour growth. *Journal of Cellular Molecular Medicine*. 2009; 13(9).

Rozic JG, Chakraborty C, Lala PK. Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis. *Internal Journal of Cancer*. 2001; 93(4): 497-506.

Saharinen P; Tammela T; Karkkainen MJ; Alitalo K; Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends in Immunology*. 2004; 25(7): 387-395.

Schwerdt G; Freudinger R; Schuster C; et al. Cisplatin-induced apoptosis is enhanced by hypoxia and by inhibition of mitochondria in renal collecting duct cells. *Toxicology Science*. 2005; 85(1) 735-42.

Shweiki D; Itin A; Soffer D; Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 2002; 359(6396): 843-5.

Silva AE; Serakides R; Cassali GD. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. *Ciência Rural*. 2004; 34(2): 625- 633:

Singh B; Lucci A. Role of cyclooxygenase-2 in breast cancer. *Journal of Surgical Research*. 2002; 108(1):173-179.

Singh-Ranger G; Salhab M; Mokbel K. The role of cyclooxygenase-2 in breast cancer: Review. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2008; 109: 189.

Singh B; Cook KR; Vincent L; et al. Role of COX-2 in Tumorspheres Derived from a Breast Cancer Cell Line. *Journal of Surgery Research*. 2011; 168: 39-49.

Sleeman JP; Thiele W. Tumor metastasis and the lymphatic vasculature. *Internal Journal of Cancer*. 2009; 125: 2747–2756.

Stacker AS; Hughes RA; Achen MG. Molecular targeting of lymphatics for therapy. *Current Pharmaceutical Design*. 2004; 10(1): 65-74.

Stacker AS; Achen MG; Jussila L; Baldwin ME; Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nature Reviews Cancer*. 2002; 2(8):573-583.

Skobe M; Hawighorst T; Jackson DG; et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nature Medicine*. 2001; 7(2):192-198.

Soslow RA; Dannenberg AJ; Rush D; et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer*. 2000; 89: 2637–45.

Su JL; Shih JY; Yen ML; et al. Cyclooxygenase-2 induces EP1- and HER-2/Neu-dependent vascular endothelial growth factor-C up-regulation: a novel mechanism of lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma. *Cancer Research*. 2004; 64(2): 554-564.

Suzuki K; Koike H; Matsui H; et al. Genistein, a soy isoflavone, induces glutathione peroxidase in the human prostate cancer cell lines LNCaP and PC-3, *International Journal of Cancer*. 2002; 99: 846–852.

Tammela T; Enholm B; Alitalo K; Paavonen. The biology of vascular endothelial growth factor. *Journal of Cardiovascular Research*. 2005; 65(3): 550-63.

Uva P; Aurisicchio L; Watters J; et al. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BioMed Central Genomics*. 2009; 135(10): 1-20.

Vermeulen PB; Van Golen KL; Dirix LY. Angiogenesis, Lymphangiogenesis, Growth Pattern, and Tumor Emboli in Inflammatory Breast Cancer. *Cancer*. 2010; 116(11): 2748–54.

Vicenti V; Cassano C; Rocchi M; Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*. 1996; 93(8): 1493-95.

Vrekoussis T; Chaniotis V; Navrozoglou I; et al. Image Analysis of Breast Cancer Immunohistochemistrained Sections Using ImageJ: An RGB-based Model. *Anti Cancer Research*. 2009; 29: 4995-4998.

Wan WH; Fortuna MB; Furmanski P. A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously. *Journal of Immunological methods*. 1987; 103(1): 121-9.

Zuccari DAPC. Estudo imunocitoquímico de marcadores diagnósticos e prognósticos em neoplasias mamárias caninas. [tese]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista; 2001.

Zuccari DAPC; Berton CR; Terzian ACT; Ruiz CM. Prognostic and predictive factors in mammary neoplasias –immunohistochemical markers importance in human and canine species –comparative study. *Arquivos de Ciências da Saúde*. 2008; 15(4):189-98.

IX- ANEXOS

IX.1 - TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

A técnica de imuno-histoquímica, conforme descrita na sequência, foi realizada de acordo com o protocolo do Laboratório de Imuno-histoquímica do Serviço de Patologia da FMVZ – UNESP – Botucatu, as soluções e reagentes utilizados estão descritos no anexo 2.

1- Desparafinização:

- 30 minutos no xilol, em temperatura ambiente;
- 20 minutos no xilol, em temperatura ambiente.

2- Hidratação dos cortes:

- álcool absoluto I / II / III – 3 minutos em cada etapa;
- álcool 95 – 3 minutos;
- álcool 85 – 3 minutos;
- Lavar em água destilada (10 vezes).

3- Recuperação Antigênica:

- Conforme tabela 1 (página 17);
- Deixar esfriar 20 minutos em temperatura ambiente;
- Lavar em água destilada (10 vezes).

4- Bloqueio da peroxidase endógena:

- Deixar durante 20 minutos em água oxigenada 10 volumes;
- Lavar em água destilada (10 vezes)

5- Lavar duas vezes, durante 5 minutos, em solução tampão de TRIS (Trizma base – Sigma – código T1503 - pH 7,4).

6- Incubação com BSA 5% (Albumina Sérica Bovina – Sigma – código A7906, diluída em solução de TRIS), durante uma hora, em temperatura ambiente. Contribuindo assim para diminuição das marcações inespecíficas (“fundo”).

7- Incubação com o Anticorpo primário

- Diluir o anticorpo primário em solução diluidora de anticorpos fornecida pelo fabricante;
- Cobrir os cortes com o anticorpo, deixar as lâminas sempre em câmara úmida. Tempo: “overnight” (18hs a 4°C - geladeira);
- Posteriormente, lavar com TRIS;
- Remover o excesso de TRIS.

8- Incubação com anticorpo secundário e peroxidase (Kit ABC – Avidina Biotina Peroxidase - Dako - código K0492)

- Anticorpo secundário biotilado (anti-camundongo e anti-coelho), diluído conforme informações do fabricante. Incubado por 30 minutos, a temperatura ambiente.
- Lavar com solução TRIS. Tempo: 10 minutos;
- Complexo avidina, biotina, peroxidase: preparada meia hora antes do uso, de acordo com informações do fabricante. Incubado por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar em solução TRIS. Tempo: 10 minutos.

9- Revelação com o substrato cromogênico (Diaminobenzidina – DAB, pronto para uso – Dako - código K34466)

- Tempo de DAB: 5 minutos;
- Passar em solução TRIS;
- Lavar em água destilada (10 vezes).

10- Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer

- Tempo: 3 minutos;

- Lavar em água corrente durante 10 minutos;
- Lavar em água destilada (uma vez).

11- Desidratação dos cortes e montagem das lâminas:

- Passagem em álcool 85° e 95°;
- Passagem em álcool absoluto I / II / III – 3 minutos em cada etapa;
- Passagem em xilol I e II – 3 minutos em cada etapa;
- Montar as lâminas com resina sintética (Permount – Fisher Scientific – SP 15-500) e lamínulas.

IX.2- SOLUÇÕES UTILIZADAS NA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Solução tampão utilizadas na recuperação antigênica

Citrato 10 mM:

- 1000 ml de água destilada
- 1,921g de ácido cítrico monohidratado de peso molecular 192.13
- pH 6,0 (ajustar em medidor com hidróxido de sódio hipersaturado)

TRIS solução tampão:

- 1000ml de água destilada
- 6,0g Trizma base
- 8,5g cloreto de sódio
- pH em 7,4 (pode variar entre 7,4 a 7, 6),o pH é acertado com ácido clorídrico diluído em água destilada na proporção de 1:1.

Solução de BSA a 5%

Solução A

- 10 ml de água deionizada
- 500 mg de albumina bovina – Sigma – A – 7906

Solução B

- 10 ml de água deionizada
- 500 mg de azida sódica (NaN₃) – Merck – 1.06688.0100

Solução de BSA para uso (5%)

- 59 ml de TRIS pH 7,4
- 1,25ml solução A
- 2,5ml solução B