

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

**REATIVIDADE DE TECIDOS NEOPLÁSICOS CANINOS À  
PROTEÍNA ASSOCIADA À RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS  
DROGAS-1 (MRP1), À GLUTATIONA-S-TRANSFERASE pi  
(GSTpi) E À PROTEÍNA p53**

**Daniel Guimarães Gerardi**

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2008

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

**REATIVIDADE DE TECIDOS NEOPLÁSICOS CANINOS À  
PROTEÍNA ASSOCIADA À RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS  
DROGAS-1 (MRP1), À GLUTATIONA-S-TRANSFERASE pi  
(GSTpi) E À PROTEÍNA p53**

**Daniel Guimarães Gerardi**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mirela Tinucci Costa**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
2008

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**DANIEL GUIMARÃES GERARDI** - nascido em 16 de fevereiro de 1978, em Ribeirão Preto, São Paulo, é Médico Veterinário formado pela Universidade Federal de Lavras – UFLA, Minas Gerais, em 27 de janeiro de 2001. Em 1º de fevereiro de 2001 ingressou no Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária, na área de Clínica Médica de Pequenos Animais junto ao Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Jaboticabal, o qual concluiu em 31 de janeiro 2003, sob a orientação da Profª Drª Mirela Tinucci Costa. Em 16 de fevereiro de 2005, recebeu o título de Mestre em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica Médica, junto a FCAV, UNESP, Campus de Jaboticabal, sob a orientação da Profª Drª Mirela Tinucci Costa. No dia 1º de março de 2005, após concurso de seleção, iniciou o curso de Doutorado em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica Médica junto a FCAV-UNESP, Campus Jaboticabal, sob a orientação da Profª Drª Mirela Tinucci Costa.

**Aos meus pais Luiz Eduardo e Nilma, por todo o carinho, suporte, incentivo, amor  
incondicional e proteção.  
À memória de minha avó Jovenilha e de minha tia Maria Madalena.**

**DEDICO.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por nos dar um mundo tão intrigante e cheio de mistérios, fazendo com que a cada dia possamos evoluir e aprender com ele.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mirela Tinucci Costa, pela orientação em mais uma etapa da minha formação profissional, por sempre ter confiado e incentivado mesmo nos momentos mais difíceis, pela paciência, compreensão e amizade. Obrigado pelos conselhos, orientações e ensinamentos, que serão sempre lembrados nos momentos importantes da minha vida.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi, pela contribuição na obtenção dos espécimes que foram utilizados neste estudo.

Aos Professores Doutores Aparecido Antonio Camacho, Aureo Evangelista Santana, Cintia Lúcia Maniscalco e Laura Satiko Okada Nakaghi, por todas as contribuições e correções feitas no exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira, pela valiosa contribuição na análise estatística dos resultados deste estudo.

Ao grande amigo Pedro Paulo Vissoto Diniz, pela grande e valiosa ajuda na interpretação das análises estatísticas. Obrigado pela paciência.

Ao Prof. Dr. Felipe Ruiz Sueiro, pela realização da classificação imunofenotípica dos linfomas empregados neste estudo.

Aos irmãos e irmãs de pós-graduação Ana Cláudia Conte Dune, Joice Lara Pereira, Carolina João, Tiago Munoz e Giovani Vargas pela amizade e colaboração durante todo o período de experimento.

À funcionária Marilde, pelo grande auxílio e companhia durante a realização das reações de imunoistoquímica.

Às funcionárias do Departamento de Patologia Veterinária, Francisca da Assis Ardisson e Maria Inês Yamazaki de Campos, pelo processamento dos espécimes utilizados neste estudo.

À minha querida mãe, Prof<sup>a</sup> Nilma B. G. Gerardi, pela revisão ortográfica e gramatical desta tese.

Aos grandes amigos e irmãos de república: Andriago Barboza de Nardi, Roberto Thiesen, Daniel Orlato, Daniel Paulino, Marco Antonio G. Silva, Luis Gustavo Gosuen, Alexandre Brum, João Paulo da Exaltação Pascon, Sergio Vitaliano, André Escobar, Alexandre Ribeiro, Luis Guilherme de Oliveira, Thiago Sá Rocha, Marcio Antonio Brunetto, por todos os momentos de alegria inesquecíveis, companheirismo, paciência e amizade verdadeira.

Aos meus irmãos e irmãs de Brasília, Anderson Farias, Sandro Alex Stefanos, Ricardo Miyasaka, Carlos Eduardo Vasconcelos, Rita Campebell, Carlos Henrique Saquetti, Helvécio Santos Júnior, Samara, Nara Benato e Carlos Henrique Checoli, pelo apoio incondicional, incentivo e amizade.

À querida Paula Ansaloni, por todo o apoio, companheirismo incondicional, paciência, compreensão e incentivo.

À coordenação, professores, residentes e alunos da UPIS - DF, pela compreensão, apoio, incentivo e amizade.

Aos amigos de Descalvado, Francisco Cláudio Dantas Mota, Roberta Cassale, Luciano Melo, Fabio Mazzoneto, Adriana Gradela, Marco Belo, Antonio Carlos Turcati, pela amizade, apoio e confiança.

Aos amigos de Jaboticabal: Marlos Gonçalves Sousa, Roberta Carareto, Sabrina Rodigheri, Sabryna Calazans, Sabrina Santos Costa, Jane Cesar, Rosana Zanatta, Lígia Miyazato, Tatiana Champion, Gláucia Bueno, Bianca Martins, Emílio Rodrigues, Juan Pablo Ortiz, Tiago Mineo, Guilherme Godoy, Eliana Teshima, Gustavo Oliveira, James Andrade, Aline Bolzan, Gabriela Covizzi, Maria Lígia, Carla Braga, Wanderson Pereira, Tathiana Motheo, Caroline Pigato, Marcy Lancia, Andrea Higa, Sandra Nogueira, pela agradável convivência, incentivo e amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do auxílio pesquisa.

Ao programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – Campus de Jaboticabal, por ter me acolhido.

A todos que de alguma forma auxiliaram para que este estudo fosse realizado.

## SUMÁRIO

Página

|                                                                                  |      |
|----------------------------------------------------------------------------------|------|
| LISTA DE ABREVEATURAS.....                                                       | x    |
| LISTA DE TABELAS.....                                                            | xii  |
| LISTA DE QUADROS.....                                                            | xiii |
| LISTA DE FIGURAS.....                                                            | xiv  |
| 1- INTRODUÇÃO .....                                                              | 20   |
| 2- REVISÃO DE LITERATURA.....                                                    | 23   |
| 2.1- Proteína associada à resistência a múltiplas drogas.....                    | 23   |
| 2.1.1- MRP1.....                                                                 | 24   |
| 2.1.1.1- Características estruturais da MRP1.....                                | 24   |
| 2.1.1.2- Distribuição e função fisiológica da MRP1.....                          | 26   |
| 2.1.1.3- Regulação da expressão do gene <i>MRP1</i> .....                        | 28   |
| 2.1.1.4- Substratos .....                                                        | 29   |
| 2.1.1.5- Mecanismos de resistência a múltiplas drogas mediada pela<br>MRP1 ..... | 30   |
| 2.1.1.6- Expressão da MRP1 nas neoplasias humanas .....                          | 33   |
| 2.1.1.7- MRP1 na medicina veterinária .....                                      | 35   |
| 2.2- Glutathiona S-transferase .....                                             | 35   |
| 2.2.1- Função .....                                                              | 35   |
| 2.2.2- Substratos .....                                                          | 37   |
| 2.2.3- Glutathiona S-transferase e resistência a múltiplas drogas .....          | 37   |
| 2.3- Proteína p53 .....                                                          | 38   |

|                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3.1- Papel biológico e função da p53 .....                        | 38 |
| 2.3.2- Mutação do gene P53 .....                                    | 39 |
| 2.3.3- Expressão da p53 e resistência a quimioterapia .....         | 40 |
| 3- MATERIAL E MÉTODOS.....                                          | 44 |
| 3.1- Grupos experimentais .....                                     | 44 |
| 3.2- Imunofenotipagem dos linfomas.....                             | 46 |
| 3.3- Estudo imunoistoquímico .....                                  | 46 |
| 3.4- Análise estatística.....                                       | 48 |
| 4- RESULTADOS .....                                                 | 49 |
| 4.1- Dados dos animais.....                                         | 49 |
| 4.2- Expressão da MRP1, GSTpi e p53.....                            | 50 |
| 4.2.1- Expressão da MRP1.....                                       | 50 |
| 4.2.2- Expressão da GSTpi.....                                      | 52 |
| 4.2.3- Expressão da p53 .....                                       | 52 |
| 4.3- Co-expressão da MRP1, GSTpi e p53 .....                        | 59 |
| 4.4- Avaliação da porcentagem de células neoplásicas marcadas ..... | 59 |
| 5- DISCUSSÃO .....                                                  | 62 |
| 6- CONCLUSÃO.....                                                   | 69 |
| 7-REFERÊNCIAS.....                                                  | 70 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                               |                                                           |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| <b><math>\gamma</math>GCS</b> | $\gamma$ -GLUTAMILCISTEÍNA SINTETASE                      |
| <b>ABC</b>                    | ATP BINDING CASSETTE                                      |
| <b>ABC</b>                    | ESTREPTOAVIDINA-BIOTINA                                   |
| <b>ACNU</b>                   | NIMUSTINA                                                 |
| <b>ARA</b>                    | RESISTÊNCIA ASSOCIADA ÀS ANTRACICLINAS                    |
| <b>ATP</b>                    | ADENOSINA TRIFOSFATO                                      |
| <b>CanMRP1</b>                | MRP1 CANINA                                               |
| <b>CAR</b>                    | CARCINOMAS                                                |
| <b>CARH</b>                   | CARCINOMAS DE GLÂNDULAS HEPATÓIDES                        |
| <b>CARM</b>                   | CARCINOMAS MAMÁRIOS                                       |
| <b>CCNPP</b>                  | CARCINOMA DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS DE PULMÃO               |
| <b>c-MOAT</b>                 | MOAT CANICULAR                                            |
| <b>FCAV</b>                   | FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS             |
| <b>GP-P</b>                   | GLICOPROTEÍNA-P                                           |
| <b>GS-4HNE</b>                | CONJUGADOS GLUTATIÔNICOS DO 4-HIDROXINONENAL              |
| <b>GSH</b>                    | GLUTATIONA                                                |
| <b>GS-PGA<sub>2</sub></b>     | CONJUGADOS GLUTATIÔNICOS DA PROSTAGLANDINA A <sub>2</sub> |
| <b>GSSG</b>                   | CONJUGADOS GLUTATIÔNICOS DA GLUTATIONA OXIDADA            |
| <b>GST</b>                    | GLUTATIONA S-TRANSFERASE                                  |
| <b>GSTpi</b>                  | GLUTATIONA-S-TRANSFERASE pi                               |
| <b>kDa</b>                    | QUILODALTONS                                              |
| <b>LINF</b>                   | LINFOMAS                                                  |
| <b>LINFB</b>                  | LINFOMAS DE CÉLULAS B                                     |
| <b>LINFT</b>                  | LINFOMAS DE CÉLULAS T                                     |
| <b>LMA</b>                    | LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA                              |
| <b>LTC<sub>4</sub></b>        | CISTEINIL-LEUCOTRIENO                                     |
| <b>MAST</b>                   | MASTOCITOMAS                                              |
| <b>MASTI</b>                  | MASTOCITOMAS GRAU I                                       |

|                               |                                                     |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------|
| <b>MASTIII</b>                | MASTOCITOMAS GRAU III                               |
| <b>MLP-1</b>                  | PROTEÍNA SEMELHANTE A MRP-1                         |
| <b>MOAT</b>                   | TRANSPORTADORES DE ÂNIONS ORGÂNICOS MULTIESPÉCIES   |
| <b>MRP1</b>                   | PROTEÍNA ASSOCIADA A RESISTÊNCIA A MULTIPLAS DROGAS |
| <b>MRP1</b>                   | GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA MRP1                   |
| <b>MSD</b>                    | DOMÍNIO TRANSMEMBRÂNICO                             |
| <b>NBD</b>                    | DOMÍNIO LIGANTE DE NUCLEOTÍDEO CITOSÓLICO           |
| <b>P53</b>                    | GENE P53                                            |
| <b>p53</b>                    | PROTEÍNA p53                                        |
| <b>PBS</b>                    | TAMPÃO SALINO COM FOSFATO                           |
| <b>PCNM</b>                   | PORCENTAGEM DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS MARCADAS         |
| <b>PCR</b>                    | REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE                      |
| <b>RMD</b>                    | RESISTÊNCIA À MULTIPLAS DROGAS                      |
| <b>RNA<sub>m</sub></b>        | ÁCIDO RIBONUCLEICO MENSAGEIRO                       |
| <b>ROS</b>                    | ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO                       |
| <b>RT-PCR</b>                 | REVERSE TRANSCRIPTASE PCR                           |
| <b>TNF<math>\alpha</math></b> | FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA                       |
| <b>TVT</b>                    | TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL                         |
| <b>TVTC</b>                   | TVT CANINO                                          |
| <b>TVTR</b>                   | TVT RESISTENTE À QUIMIOTERAPIA                      |
| <b>UNESP</b>                  | UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA                      |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                      | Página    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabela 1. Número de espécimes tumorais distribuídos por grupos e subgrupos. Jaboticabal, SP, 2008.....</b>                                                                                                                                                        | <b>44</b> |
| <b>Tabela 2. Especificações dos anticorpos empregados nas reações de imunoistoquímica neste estudo. Método ABC. Jaboticabal, SP, 2008.....</b>                                                                                                                       | <b>46</b> |
| <b>Tabela 3. Anticorpos primários e seus respectivos métodos e tampões de recuperação antigênica, bloqueio das ligações não imunes e anticorpos secundários empregados nas reações de imunoistoquímica neste estudo, pelo método ABC. Jaboticabal, SP, 2008.....</b> | <b>47</b> |
| <b>Tabela 4. Expressão e co-expressão da MRP1, GSTpi e p53 nos subgrupos experimentais pela técnica de imunoistoquímica. Jaboticabal,SP,2008.....</b>                                                                                                                | <b>51</b> |

## LISTA DE QUADROS

|                                                                                                                                                                                                      | Página    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Quadro 1. Família das proteínas associadas à resistência a múltiplas drogas (MRP) em humanos e alguns dos nomes alternativos encontrados na literatura (adaptado de SUZUKI et al., 2001).....</b> | <b>24</b> |
| <b>Quadro 2. Substratos transportados pela MRP1 (adaptado de DEELEY &amp; COLE, 2006).....</b>                                                                                                       | <b>30</b> |
| <b>Quadro 3. Relação dos agentes antineoplásicos que estão associados com o aumento dos níveis da GST e resistência (adaptado de TOWNSEND &amp; TEW, 2003).....</b>                                  | <b>37</b> |

## LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Representação esquemática da topologia dos membros da família MRP. (A) Modelo topográfico da MRP1. (B) Organização dos domínios da proteína. Achuriados, domínio transmembrânico; em branco, alças citoplasmáticas localizadas entre MSD0 e MSD1, NBD1 e MSD2 e o C-terminal; negro, dobra ligante de nucleotídeo (adaptado de KRUTH & BELINSKY, 2003)..... 26
- Figura 2.** Representação esquemática da barreira hemato-testicular: localização da MRP1 e MDR1 (glicoproteína-P) no túbulo testicular e no capilar sanguíneo, respectivamente. A barreira física entre a membrana plasmática luminal e basal é formada pelas junções oclusivas, indicadas por  $\otimes$  (adaptado de BORST et al., 2000)..... 27
- Figura 3.** Representação esquemática do modelo da resistência às drogas mediada pela MRP1. Após entrar na célula, a MRP1 previne que a droga atinja seu alvo por meio de (1) sequestro dentro de vesículas intracelulares ou (2) exportação com ou sem o auxílio da GSH. Os metabólitos das drogas podem ser desintoxicados pela conjugação com a GSH seguido do transporte para fora da célula mediado pela MRP1 (3) (Adaptado de RENES et al., 2000)..... 32
- Figura 4.** Representação esquemática da conjugação da glutathione como um xenobiótico (X) via GST resultando na formação do S-conjugado de glutathione (adaptado de TOWNSEND & TEW, 2003)..... 36
- Figura 5.** Representação esquemática da proteína p53 do tipo selvagem em contraste com a p53 mutante. A meia-vida e a habilidade de se ligar especificamente ao DNA são as características mais marcantes que distinguem uma da outra (adaptado de STRANO

|           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|           | et al., 2007).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 41 |
| Figura 6. | Fotomicrografias de cortes histológicos dos espécimes neoplásicos caninos empregados neste estudo: (A) Tumor venéreo transmissível canino (x400); (B) Mastocitoma cutâneo grau I (x400); (C) Mastocitoma cutâneo grau III (x400); (D) Linfoma (x400); (E) Carcinoma mamário (x100); (F) Carcinoma de glândula hepatóide (x200). Coloração pela Hematoxilina & Eosina. Imagem captada por equipamento digital Sony® DSC-W70 acoplado a microscópio triocular Nikon® Eclipse E200. Jaboticabal,SP, 2008.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 45 |
| Figura 7. | Fotomicrografias de espécimes neoplásicos caninos submetidos à reação de imunoistoquímica, empregando o anticorpo anti-MRP1. (A e B) Mastocitoma grau I e grau III respectivamente, observam-se marcações citoplasmáticas granulares e difusas, de coloração castanha e intensidade forte (x400). (C) Carcinoma de glândula hepatóide, observam-se marcações nas células neoplásicas delimitadas por tecido conjuntivo com marcação discreta (x200). (D) Mesmo espécime de carcinoma de glândula hepatóide exibido em C, em maior aumento (x400), evidenciando marcações citoplasmáticas granulares e difusas com intensidade de coloração variando entre moderada e intensa. (E) Carcinoma mamário, mostrando marcações citoplasmáticas granulares, de coloração castanha e intensidade forte (setas verdes) a moderada (setas vermelhas) (x400). (F) Tumor venéreo transmissível, onde se observam células do infiltrado inflamatório mononuclear marcadas de coloração castanha e ausência de marcação nas células neoplásicas (x400). Método ABC. Contracoloração pela Hematoxilina de Harris. Imagem captada por equipamento digital Sony® DSC-W70 acoplado a microscópio triocular Nikon® Eclipse E200. Jaboticabal, SP, 2008..... | 53 |

**Figura 8.** Fotomicrografias de tecidos neoplásicos caninos submetidos à reação de imunoistoquímica, empregando o anticorpo anti-GSTpi. (A) Tumor venéreo transmissível, mostrando marcações citoplasmáticas granulares e nucleares, de coloração castanha e intensidade forte (x400). (B) Linfoma B, com marcações citoplasmáticas granulares, de coloração castanha e intensidade moderada (x400). (C) Mastocitoma grau I, observam-se marcações citoplasmáticas granulares e nucleares de coloração castanhas e intensidade forte (x400). (D) Mastocitoma grau III, observam-se marcações citoplasmáticas granulares e nucleares das células neoplásicas e das paredes dos vasos (setas) de coloração castanha e intensidade moderada (x400). (E) Carcinoma mamário, onde se nota marcações citoplasmáticas granulares e nucleares das células tumorais e dos fibroblastos (x400). (F) Carcinoma mamário, notam-se marcações citoplasmáticas granulares de coloração castanha e intensidade forte nas células do infiltrado inflamatório mononuclear (x400). Método ABC. Contracoloração pela Hematoxilina de Harris. Imagem captada por equipamento digital Sony® DSC-W70 acoplado a microscópio triocular Nikon® Eclipse E200. Jaboticabal, SP, 2008.....

55

**Figura 9.** Fotomicrografias de tecidos neoplásicos caninos submetidos à reação de imunoistoquímica, empregando o anticorpo anti-p53. (A) Tumor venéreo transmissível, observam-se marcações nucleares de coloração castanha e intensidade forte e discreta marcação citoplasmática das células neoplásicas (x800). (B) Linfoma B, observam-se marcações nucleares de coloração castanha e intensidade forte (x400). (C e D) Mastocitoma grau I e carcinoma de glândula hepatóide respectivamente, notam-se marcações nucleares de coloração castanhas e intensidade

forte e discreta marcação citoplasmática (x400). (E) Carcinoma mamário, onde se nota marcações nucleares de coloração castanhas e intensidade forte e marcações citoplasmáticas discretas(x400). (F) Carcinoma mamário, notam-se marcações nucleares de coloração castanha e intensidade forte e discreta marcação citoplasmática das células neoplásicas e mioepiteliais (setas) (x400). Método ABC. Contracoloração pela Hematoxilina de Harris. Imagem captada por equipamento digital Sony® DSC-W70 acoplado a microscópio triocular Nikon® Eclipse E200. Jaboticabal, SP, 2008.....

57

**Figura 10.** Porcentagens mínimas e máximas de células neoplásicas marcadas nos subgrupos experimentais com os anticorpos anti-GSTpi, MRP1 e p53. As linhas horizontais contínuas representam os valores das medianas. As caixas representam os intervalos interquartis (25º ao 75º percentil). As hastes representam os valores mínimos e máximos das porcentagens de células neoplásicas marcadas. A linha horizontal tracejada representa o limite para considerar a expressão positiva para determinado marcador. Jaboticabal, SP, 2008.....

60

**Figura 11.** Representação gráfica da análise de correlação entre as PCNM para a MRP1 e GSTpi no subgrupo LINFT ( $P=0,0123$ ). As linhas tracejadas horizontal e vertical representam o limite para considerar a expressão positiva.....

61

**REATIVIDADE DE TECIDOS NEOPLÁSICOS CANINOS À PROTEÍNA  
ASSOCIADA À RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS-1 (MRP1), À  
GLUTATIONA-S-TRANSFERASE pi (GSTpi) E À PROTEÍNA p53**

**RESUMO** – Tendo em vista a expressão da proteína associada à resistência a múltiplas drogas (MRP1), da enzima glutathione-S-transferase pi (GSTpi) e da proteína p53 com o desenvolvimento da resistência a múltiplas drogas (RMD) nas células neoplásicas, objetivou-se neste estudo avaliar a expressão desses três marcadores, pela imunohistoquímica, em 68 espécimes de neoplasias caninas, incluindo tumores venéreos transmissíveis (TVTC), mastocitomas, carcinomas mamários e de glândula hepatóides e linfomas. Os espécimes foram subdivididos em: TVT, Tumor venéreo transmissível (n=9); TVTR, TVTs resistentes à quimioterapia (n=5); MASTI, mastocitomas cutâneos grau I (n=8); MASTIII, mastocitomas cutâneos grau III (n=8); CARM, carcinomas mamários (n=14); CARH, carcinomas de glândulas hepatóides (n=8); LINFB, linfomas de células B (n=9); LINFT, linfomas de células T (n=7). Resultados mostraram que as expressões da MRP1, GSTpi e p53 foram observadas em 38 (55%), 43 (62,3%) e 50 (72,4%) espécimes, respectivamente. Em 27 (39,1%) espécimes houve co-expressão dos três marcadores. A expressão da MRP1, GSTpi e p53 isoladas ou associadas pôde ser observada em todos os grupos experimentais, exceto o grupo TVTC que não expressou a MRP1. A localização da marcação nas células tumorais foi citoplasmática para MRP1 e nuclear e/ou citoplasmática para a GSTpi e p53. Não foi observada diferença na expressão dos marcadores de resistência a quimioterapia em relação à resistência a quimioterapia (TVT e TVTR), gradação histológica (MASTI e III) e imunofenótipo (LINFB e T). Há relação direta entre o aumento da expressão da MRP1 e da GSTpi nos linfomas T.

**Palavras-chave:** Cães, neoplasia, resistência à múltiplas drogas, proteína associada à resistência a múltiplas drogas-1, Glutathione-S-transferase pi, p53.

**REACTIVITY OF CANINE NEOPLASIC TISSUES TO MULTIDRUG  
RESISTANCE PROTEIN-1 (MRP1), GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE pi AND  
p53 PROTEIN.**

**ABSTRACT** – Multidrug resistance in tumors involves the expression of multidrug resistance protein-1 MRP1, enzyme glutathione-S-transferase pi (GSTpi), and p53 protein. Therefore, this study aimed at evaluating the expression of these three markers, by immunohistochemistry, in neoplastic cells. Sixty-eight canine tumor samples, including transmissible venereal tumor (TVTC), cutaneous mast cell tumor, mammary carcinoma, hepatoid gland carcinoma, and lymphoma were studied. Samples were assigned into one of the following subgroups: TVT, transmissible venereal tumor (n=9); TVTR, chemoresistant TVT (n=5), MASTI, grade-I cutaneous mast cell tumor (n=8); MASTIII, grade-III cutaneous mast cell tumor (n=8); CARM, mammary carcinoma (n=14); CARH, hepatoid gland carcinoma (n=8); LINFB, B-cell lymphoma (n=9); LINFT, T-cell lymphoma (n=7). We observed that 38 (55%), 43 (62.3%), and 50 (72.4%) samples expressed MRP1, GSTpi, and p53, respectively. Co-expression of the three markers was present in 27 (39.1%) samples. Expression of MRP1, GSTpi, and p53 alone or associated could be observed in all experimental groups, except for TVT group which did not express MRP1. Staining in the tumor cells was cytoplasmatic to MRP1, and both nuclear and cytoplasmatic to GSTpi and p53. No significant difference in the expression of the markers could be observed with relation to chemoresistance (TVT and TVTR), histological grade (MASTI and MASTIII) and immunophenotype (LINFB and LINFT). A direct relation was present between the raise of the expression of MRP1 and GSTpi in T cells lymphoma.

**Keywords:** Dogs, neoplasia, multidrug resistance, multidrug resistance protein-1, glutathione-S-transferase pi, p53.

## 1 – INTRODUÇÃO

A prevalência das neoplasias em cães vem aumentando consideravelmente nos últimos anos, constituindo umas das principais causas de óbito na espécie canina (MICHELL, 1999; PROSCHOWSKY et al., 2003; BENTUBO et al., 2007). A crescente incidência dessas afecções tem várias razões, dentre elas a maior longevidade observada nestes animais. A maior expectativa de vida é resultado de uma melhor nutrição, protocolos de imunoprofilaxia, aprimoramento dos métodos de diagnóstico, novas modalidades terapêuticas e, possivelmente, uma maior devoção dos proprietários para com os seus animais (De NARDI et al., 2002; WITHROW, 2007).

No Brasil, alguns estudos envolvendo dados de incidência de neoplasias em cães foram realizados. Sanches et al. (2000) revisaram 535 casos de neoplasias em cães provenientes do atendimento do Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Jaboticabal/SP. Destes, o observado com maior frequência foi o tumor mamário (40%), seguido pelo tumor venéreo transmissível (25%), carcinoma espinocelular (5%), mastocitoma (4%) e linfoma (4%). Os tumores de mama também foram os mais frequentes (45,52%) no estudo realizado por De Nardi et al. (2002) no Estado do Paraná, seguido pelo mastocitoma (11,7%), tumor venéreo transmissível e linfoma (3,3%).

Nos últimos anos, a quimioterapia tem alcançado êxito acentuado no combate às neoplasias. Algumas neoplasias podem ser curadas com o uso dessa modalidade terapêutica, e em outras se consegue um efeito paliativo importante no aumento da sobrevida (ÁGUILA et al., 1998). Embora o tratamento quimioterápico de certas neoplasias seja bem sucedido e encorajador, a sua efetividade pode ser limitada devido à resistência tumoral às drogas (TSURUO et al., 2003).

A resistência tumoral é um fenômeno comum encontrado por médicos e veterinários que tratam de pacientes com neoplasias (BERGMAN & OGILVIE, 1995; Di PIETRO et al., 1999; BERGMAN, 2003). Mesmo com os recentes avanços no tratamento das várias neoplasias em animais, muitos deles apresentam recidivas e

sucumbem à doença devido à resistência aos agentes quimioterápicos, diagnóstico tardio e deficiência profissional (BERGMAN & OGILVIE, 1995).

Células tumorais selecionadas para resistir a um único agente quimioterápico podem apresentar resistência cruzada a vários compostos não relacionados estrutural e funcionalmente (HARRISON, 1995; GERMANN, 1996; ALEXANDROVA, 1998; TSURUO et al., 2003; THOMAS & COLEY, 2003). Esse fenômeno é conhecido como resistência a múltiplas drogas (RMD) e é o maior obstáculo ao sucesso da quimioterapia no tratamento das neoplasias (ARCECI et al., 1993; GERMANN, 1996; PERSIDIS, 1999; MUNOZ et al., 2007).

A resistência a drogas está associada a mecanismos celulares e a fatores que afetam a biodisponibilidade e a eficácia do fármaco. Estes últimos incluem: método e protocolo de administração, dosagem, absorção, biotransformação, suprimento sanguíneo e oxigenação do tecido. O mecanismo celular é uma forma de resistência mais duradoura e complexa, e é classificado como intrínseco, quando as células são resistentes antes do início da terapia, e adquirido, quando, normalmente, surge após o início da quimioterapia (STAVROVSKAYA, 2000; GOTTESMAN et al., 2002; BERGMAN, 2003; FOJO & BATES, 2003; LEONARD et al., 2003; THOMAS & COLEY, 2003; TSURUO et al., 2003). Alguns tumores, incluindo o carcinoma de células não pequenas do pulmão e do cólon, possuem um fenótipo resistente, por definição, e respondem insuficientemente a drogas citotóxicas. Outros tumores, como os de mama, de ovário em estágios avançados e os linfomas humano (HARRINSON, 1995) e canino (BERGMAN & OGILVIE, 1995), freqüentemente recidivam após uma resposta inicial à quimioterapia e se tornam resistentes a um amplo espectro de drogas (ALEXANDROVA, 1998).

Dentre os mecanismos celulares de RMD, o que envolve a superexpressão da glicoproteína-P (gp-P) é o mais estudado e caracterizado. A gp-P atua como uma bomba de efluxo dependente de adenosina trifosfato (ATP), a qual expulsa ativamente as drogas das células neoplásicas e desta forma limita o efeito citotóxico das mesmas no seu local de ação (STAVROVSKAYA, 2000). Entretanto, parece estar claro que a resistência clínica à quimioterapia é multifatorial (LEHNERT, 1996).

A co-expressão de diferentes proteínas relacionadas à RMD pode ser observada em várias neoplasias em humanos e em algumas em animais, como nos linfomas (REZENDE, 2005) e mastocitomas (MIYOSHI et al., 2002). Na última década, muitos mecanismos celulares explicando a resistência a drogas foram caracterizados. Tais mecanismos incluem a ativação de proteínas transmembrânicas que reduzem as concentrações intracelulares de diferentes substâncias químicas; a ativação do sistema glutational/glutational-S-transferase; as alterações no alvo da droga; as alterações nos mecanismos de reparação celular; as alterações de genes e proteínas envolvidas no controle da apoptose (HARRISON, 1995; ÁGUILA et al., 1998; STAVROVSKAYA, 2000; BERGMAN, 2003; MUNOZ et al., 2007).

Portanto, objetivou-se com este estudo avaliar, por meio da imunoistoquímica, a expressão da proteína associada à resistência a múltiplas drogas (MRP1), da glutational-S-transferase isoenzima pi (GSTpi) e da p53 mutante no tumor venéreo transmissível (TVT), no mastocitoma cutâneo, nos carcinomas mamário e de glândula hepatóide e em linfoma. Mais especificamente, buscou-se (1) verificar a reatividade e a localização celular das proteínas MRP1 e p53, e da isoenzima GSTpi nos espécimes tumorais; (2) verificar se há diferença na expressão da MRP1, GSTpi e p53 nos subgrupos experimentais; (3) verificar se existe correlação entre as porcentagens de células neoplásicas marcadas pelos anticorpos MRP1, GSTpi e p53 nos subgrupos experimentais.

A seleção das neoplasias para este estudo baseou-se na importância clínica, visto que são as de maior frequência na rotina. Além disso, a quimioterapia é a principal modalidade terapêutica no combate dos linfomas e TVT, e um importante adjuvante na terapia dos carcinomas e mastocitomas.

## 2- REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1- Proteína associada à resistência a múltiplas drogas

A redução do acúmulo de drogas quimioterápicas nas células neoplásicas pode ser mediada por várias proteínas de membrana, as quais pertencem à família das proteínas transportadoras ABC (*ATP Binding Cassete*) (BOUMENDJEL et al., 2005). A gp-P foi o primeiro membro descoberto desta família envolvido na RMD (JULIANO & LING, 1976). A superexpressão da gp-P tem sido associada à resistência a múltiplas drogas em muitas linhagens celulares, e em alguns tumores humanos (LOE et al., 1996) e caninos (GINN, 1996; GERARDI, 2005). Entretanto, existem muitos exemplos de linhagens celulares e de neoplasias resistentes à múltiplas drogas nas quais a gp-P não está presente (KRISHNAMACHARY & CENTER, 1993; RENES et al., 2000).

Em 1992, Cole et al. descobriram um segundo tipo de proteína, que atua como uma bomba de efluxo de drogas em células isoladas de carcinoma de pequenas células de pulmão resistentes à doxorrubicina. Essa, denominada de proteína associada à resistência a múltiplas drogas (MRP) é o segundo mecanismo mais freqüente de RMD (BERGMAN, 2003).

A MRP é uma proteína de 190 quilodaltons (kDa), que assim como a gp-P, pertence à superfamília das transportadoras ABC. Apesar de fazerem parte da mesma família, estruturalmente, existe menos de 15% de homologia entre elas (COLE et al., 1992). Funcionalmente, a MRP também atua aumentando o efluxo das drogas, de forma dependente de energia, resultando na redução do acúmulo intracelular das mesmas (LOE et al., 1996). Embora o espectro de resistência da MRP seja equivalente ao da gp-P, visto que ambas têm afinidade para antraciclinas, alcalóides da vinca e epipodofilotoxina, ele não é exatamente o mesmo, pois existem drogas, como o taxol, em que a resistência é observada apenas para a gp-P (KRUH & BELINSKY, 2003). Outra diferença é que a MRP também atua no transporte de ânions orgânicos como conjugados de glutathione (GSH), glucuronídeos de bilirrubina e drogas conjugadas com sulfato, no interior da célula e na excreção dos mesmos para o meio extracelular (BERGMAN, 2003; PAREDES et al., 2006).

A MRP levou a pesquisas sobre outros membros desta família, resultando na descoberta de um total de 9 genes MRP (Quadro 1). Pelo menos 6 deles foram suficientemente caracterizados para indicar o transporte de compostos antineoplásicos e antivirais (GOTTESMAN et al., 2002).

**Quadro 1. Família das proteínas associadas à resistência a múltiplas drogas (MRP) em humanos e alguns dos nomes alternativos encontrados na literatura (adaptado de SUZUKI et al., 2001).**

| Família MRP | Família ABCC* | Outros nomes*         |
|-------------|---------------|-----------------------|
| MRP1        | ABCC1         | MRP                   |
| MRP2        | ABCC2         | cMOAT, cMRP, EBCR     |
| MRP3        | ABCC3         | cMOAT2, MOAT-D, MLP-2 |
| MRP4        | ABCC4         | MOAT-B                |
| MRP5        | ABCC5         | MOAT-C, pABC11        |
| MRP6        | ABCC6         | MOAT-E, MLP-1, ARA    |
| MRP7        | ABCC10        |                       |
| MRP8        | ABCC11        |                       |
| MRP9        | ABCC12        |                       |

\* A nomenclatura ABC provém do termo em inglês “adenosine trifosphate-binding cassette”; MOAT representa a categoria de transportadores de ânions orgânicos multiespecíficos (“multispecific organic anion transporter”); cMOAT, MOAT canalicular; ABCC refere-se ao grupo C das transportadoras ABC; MLP-1 refere-se ao termo proteína semelhante a MRP1 (“MRP-like protein1”); ARA, resistência associada às antraciclina (“antracyclines resistance associated”).

### 2.1.1- MRP1

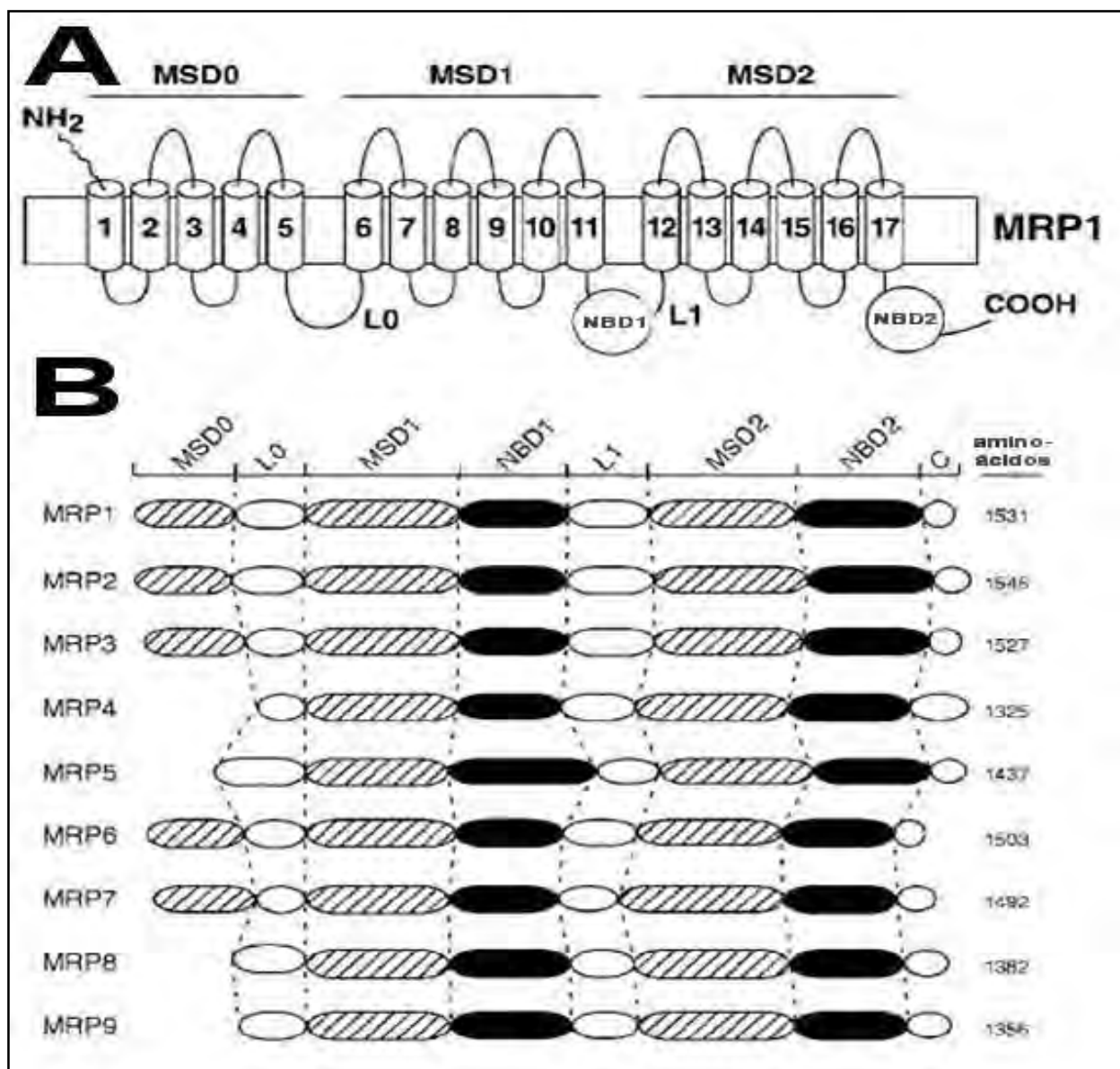
#### 2.1.1.1- Características estruturais da MRP1

A superfamília de transportadoras ABC, a qual a MRP1 e a gp-P pertencem, está entre as maiores e mais difundidas famílias de proteínas conhecidas (DEELEY et al., 2006). Seus membros são responsáveis pelo transporte de uma ampla variedade de substratos, incluindo íons, fosfolípidos, esteróides, polissacarídeos, aminoácidos e peptídeos, através das membranas biológicas (HIGGINS, 2007).

As transportadoras ABC possuem dois tipos de domínios estruturais: um hidrofóbico, o domínio transmembrânico (MSD); e outro hidrofílico, o domínio ligante de

nucleotídeo citosólico (NBD). A transportadora ABC típica tem dois MSDs e dois NBDs, e nos eucariotos, a maioria é composta por pares de subunidades arranjados em seqüência (MSD-NBD ou NBD-MSD), expressos como um polipeptídeo contínuo ou dois separados (LOE et al., 1996). Acredita-se que na maioria das transportadoras ABC, a ligação e a hidrólise subsequente do ATP pelos NBDs seja responsável pela ligação e fornecimento de energia para a realização do transporte de substrato (HIPFENER et al., 1999).

A seqüência dos aminoácidos da MRP1 se assemelha à da gp-P apenas em uma pequena extensão (15%). A MRP1 é composta de um grande segmento “nuclear” que é semelhante à gp-P (MSD1 – C-terminal), entretanto, possui a mais, uma região N-terminal que é composta de um terceiro domínio transmembrânico (MSD0) no qual residem cinco hélices transmembrânicas, uma alça intracelular (L0) e um N-terminal extracelular (Figura 1A). Portanto, presume-se que a MRP1 possui um domínio hidrofóbico no N-terminal (MSD0) ligado por uma alça citoplasmática (L0) ao núcleo semelhante ao da gp-P. A região do núcleo possui dois NBDs, dois MSDs, cada um composto por seis hélices transmembrânicas e uma região de ligação (L1) localizada entre o NBD1 e MSD2 (LOE et al., 1996; HIPFENER et al., 1999; KRUH & BELINSKY, 2003; BOUMENDJEL et al., 2005; DEELEY et al., 2006). Análises das estruturas das demais MRPs conhecidas indicaram que nem todas apresentam o MSD0 extra (RENES et al., 2000). A MRP4, MRP5 e as recentemente identificadas MRP8 e MRP9 não possuem o terceiro MSD, mas apresentam o domínio L0, enquanto a MRP2, MRP3, MRP6 e MRP7 (Figura 1B) se assemelham a MRP1 (RENES et al., 2000; KRUH & BELINSKY, 2003).



**Figura 1 – Representação esquemática da topologia dos membros da família MRP. (A) Modelo topográfico da MRP1. (B) Organização dos domínios da proteína. Achuriados, domínio transmembrânico; em branco, alças citoplasmáticas localizadas entre MSD0 e MSD1, NBD1 e MSD2 e o C-terminal; negro, dobra ligante de nucleotídeo (adaptado de KRUH & BELINSKY, 2003).**

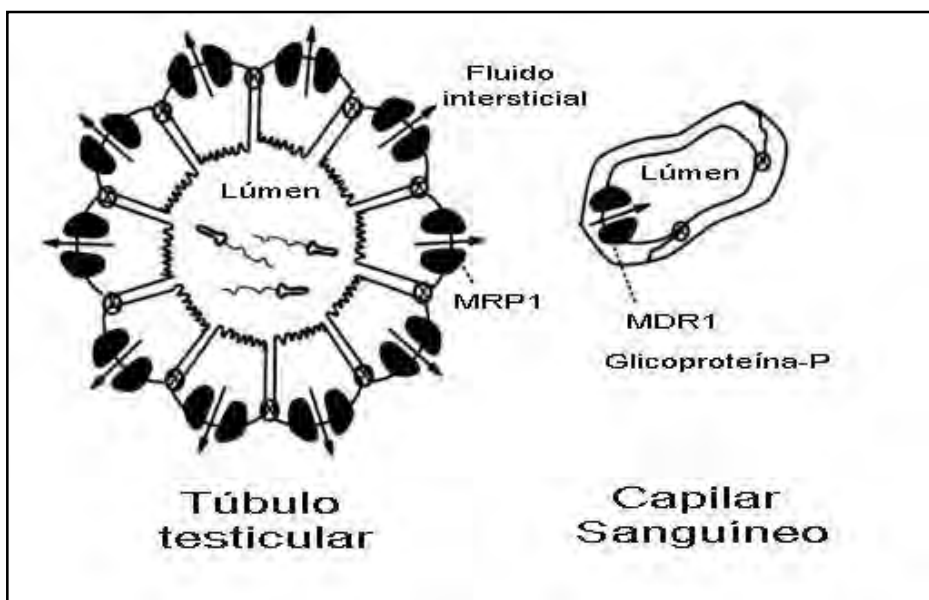
#### 2.1.1.2- Distribuição e função fisiológica da MRP1

A distribuição da MRP1 nos tecidos normais humanos é bastante semelhante à da gp-P (PAREDES et al., 2006). É expressa em altos níveis nos testículos, pulmões, rins, musculatura cardíaca e esquelética e placenta. Em contraste, a MRP1 é

pobremamente detectada no fígado humano adulto. Todavia, nos hepatócitos em proliferação e nas linhagens celulares neoplásicas hepáticas, a expressão é consideravelmente alta (DEELEY et al., 2006).

A expressão da MRP1 é amplamente difundida pelo organismo, entretanto, ela é primariamente encontrada em tipos celulares específicos, incluindo as células do epitélio bronquial e nos pneumócitos hiperplásicos do tipo II; células de Paneth em proliferação no cólon; células de Leydig e Sertoli no testículo; sinciciotrofoblastos placentários e células epiteliais do saco vitelínico; mastócitos, eosinófilos, células T auxiliares e eritrócitos no sistema circulatório (DEELEY et al., 2006).

A MRP1 se localiza predominantemente na membrana plasmática basolateral das células (EVERS et al., 1996; WRIGHT et al., 1998), o que difere da localização na membrana apical de outras bombas de efluxo como a gp-P. Isto indica, que a MRP1 expulsa seus substratos para um compartimento diferente que a gp-P, o interstício (Figura 2). Isto por sua vez pode ser um fator de proteção importante, por exemplo, para as células germinativas nos túbulos testiculares, ou para prevenir a entrada de tóxicos no líquido cefalorraquidiano através dos plexos coróides (BORST et al., 2000; PAREDES et al., 2006).



**Figura 2-** Representação esquemática da barreira hemato-testicular: localização da MRP1 e MDR1 (glicoproteína-P) no túbulo testicular e no capilar sanguíneo, respectivamente. A barreira física entre a membrana plasmática luminal e basal é formada pelas junções oclusivas, indicadas por ⊗ (adaptado de BORST et al., 2000).

Embora a função fisiológica precisa da MRP1 ainda não esteja totalmente definida, essa proteína transportadora é importante em conferir proteção às células contra o estresse oxidativo (BORST et al., 2000). Ela foi primeiramente caracterizada como transportadora de conjugados aniônicos, preferivelmente sulfatos conjugados (S-conjugados) de glutathione (LOE et al., 1996). A glutathione (GSH) é onipresente nas células do organismo humano e participa de uma função importante na desintoxicação das espécies reativas de oxigênio (ROS), eletrófilos e oxianions, por redução ou conjugação (WANG & BALLATORI, 1998). Os S-conjugados de glutathione são substratos com alta afinidade para a MRP1 e esta aumenta de acordo com o comprimento da cadeia alquil. Baseado na sua expressão onipresente e na especificidade dos seus substratos foi proposto que a expulsão dos produtos de desintoxicação endógenos dependentes de GSH é a função fisiológica da MRP1 (MÜLLER et al., 1996). De fato, a MRP1 transporta o cisteinil-leucotrieno ( $\text{LTC}_4$ ) (LOE et al., 1996), os conjugados glutatínicos da prostaglandina  $\text{A}_2$  (GS-PGA $_2$ ) (ISHIKAWA et al., 1998) e do 4-hidroxinonenal (GS-4HNE) e da glutathione oxidada (GSSG) (LEIER et al., 1996). O  $\text{LTC}_4$  e a PGA $_2$  estão envolvidos na inflamação e na interrupção do ciclo celular, enquanto o GSSG e GS-4HNE são produtos de desintoxicação gerados sob condições de um “status redox” alterado. Portanto, a expulsão dos metabolitos acima mencionados, pela MRP1, pode ser necessária para conservar a resposta contra o estímulo inflamatório e para prevenir o dano celular (RENES et al., 2000; DEELEY et al., 2006).

#### **2.1.1.3- Regulação da expressão do gene *MRP1***

A MRP1 é codificada por um gene RNA mensageiro (*MRP1*) que se encontra no cromossomo 16 (banda p13.13-13.12) (LOE et al., 1996). Atualmente sabe-se pouco sobre as vias de sinalização que controlam a função e a expressão da MRP1, entretanto, existem evidências que a última seja acionada pelo estresse oxidativo. No câncer de cólon humano, a expressão do gene *MRP1* é induzida pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) (STEIN et al., 1997). Um dos mecanismos pelo qual o TNF exerce seus efeitos intracelulares é a formação das ROS. Os compostos que sabidamente

geram as ROS, induzem a expressão dos genes que codificam a MRP1 e a  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetase ( $\gamma$ GCS). A  $\gamma$ GCS é a enzima reguladora na síntese da GSH, e esta por sua vez, participa na proteção contra os metabólitos do estresse oxidativo. O aumento dos níveis da GSH produzido pela transfecção da  $\gamma$ GCS reduz a expressão do *MRP1*. Além disso, os compostos desintoxicados pela GSH, como os metais pesados e a nimustina (ACNU) tem a capacidade de induzir a expressão da MRP1 (GOMI et al., 1997). Esses resultados sugerem que a GSH é um fator crítico na regulação da MRP1 (RENES et al., 2000).

Outro fator de transcrição, o Sp1, parece também participar da regulação da expressão da MRP1 (ZHU et al., 1994). A atividade promotora do *MRP1* está diminuída quando os sítios de ligação do Sp1 sofrem deleção ou mutação, enquanto que a superexpressão das proteínas Sp1 induzem à essa atividade. O tipo selvagem da p53, uma proteína envolvida principalmente no controle do ciclo celular, forma complexos com o Sp1 e estes podem inibir a atividade promotora do *MRP1* (SCOTTO, 2003). Em neoplasias prostáticas, Hait e Yang (2006) mostraram que o tipo selvagem do p53 suprime a expressão do gene *MRP1*, produzindo alterações no RNAm e na proteína, enquanto que a sua inativação está correlacionada com o aumento da proteína transportadora. Observações semelhantes foram feitas em melanoma e câncer de cólon humano (WANG & BECK, 1998; FUKUSHIMA et al., 1999; SULLIVAN et al., 2000). Por fim, Sullivan et al. (2000) observaram que a mutação da p53 e a superexpressão da MRP1 levaram a um aumento na função dessa última.

#### **2.1.1.4- Substratos**

Desde que foi estabelecida a relação da MRP1 com o desenvolvimento da RMD clínica em vários tipos de neoplasias humanas, uma variedade ampla de substratos tem sido identificada (DEELEY & COLE, 2006; MUNOZ et al., 2007). Apesar da semelhança nos perfis de resistência da gp-P e da MRP1, a seletividade dos substratos dessas bombas diferem significativamente, considerando que os substratos da gp-P são compostos lipofílicos neutros ou levemente positivos e a MRP1 é capaz de transportar ânions lipofílicos. Os substratos mais completamente caracterizados incluem a

glutathione estruturalmente distinta, glucuronatos, sulfatos conjugados, como o LTC<sub>4</sub>, glucuronídeos de estrógenos e ácidos biliares sulfatados (KRUH & BELINSKY, 2003; BOUMENDJEL et al., 2005). A proteína também tem se mostrado capaz de transportar uma variedade ampla de xenobióticos (Quadro 2) (DEELEY & COLE, 2006; MUNOZ et al., 2007).

**Quadro 2 – Substratos transportados pela MRP1 (adaptado de DEELEY & COLE, 2006).**

| <b>Classe/Substratos</b>                        | <b>Exemplos</b>                                                                                                                                                                |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><i>Drogas/Xenobióticos</i></b>               |                                                                                                                                                                                |
| Antineoplásicos                                 | Metotrexato, edatrexato, doxorrubicina, daunorrubicina, epirubicina, idarrubicina, etoposídeo, vincristina, vimblastina, paclitaxel, irinotecan, flutamida, hidroxiflutamida   |
| Antivirais                                      | Saquinavir, ritonavir                                                                                                                                                          |
| Antibióticos                                    | Difloxacina, grepafloxacina                                                                                                                                                    |
| Metalóides                                      | Arsenito de sódio, arsenato de sódio, antiamoniato de potássio, tartarato antimônio de potássio                                                                                |
| Sondas fluorescentes                            | Caliceína, Fluo-3,                                                                                                                                                             |
| Tóxicos                                         | Aflatoxina B <sub>1</sub> , metoxiclor, fenitroton, clorprofam                                                                                                                 |
| <b><i>Drogas/ xenobióticos conjugados</i></b>   |                                                                                                                                                                                |
| Conjugado glutatínicos                          | 2,4-Dinitrofenil-GSH, biman-GSH, N-etilmaleimida-GSH, doxorrubicina-GSH, tiotepa-GSH, ciclofosfamida-GSH, melfalan-GSH, clorambucil-GSH, vincristina-GSH, ácido etacrínico-GSH |
| Conjugados glucuronídeos                        | Etoposídeo-Gluc, 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol (NNAL)-3 $\beta$ -O-Gluc, 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-Gluc, SN                                                |
| <b><i>Metabolitos de ocorrência natural</i></b> |                                                                                                                                                                                |
| Conjugados glutatínicos                         | Leucotrieno C <sub>4</sub> , prostagladina A <sub>2</sub> -GSH, 15-deoxi- $\Delta$ <sup>12,14</sup> prostaglandina J <sub>2</sub> -GSH, hidroxinonenal-GSH                     |
| Conjugados glucuronídeos                        | 17 $\beta$ -Estradiol-17- $\beta$ -D-Gluc, glucuronosil bilirrubina, bisglucuronosil bilirrubina                                                                               |
| Sulfatos conjugados                             | Estrona 3-sulfato, sulfato dihidroepiandrosterona                                                                                                                              |
| Folatos                                         | Ácido fólico, L-leucovorin                                                                                                                                                     |
| Peptídeos                                       | Glutathione, glutathione oxidada                                                                                                                                               |
| Outros                                          | Bilirrubina                                                                                                                                                                    |

#### **2.1.1.5- Mecanismos de resistência a múltiplas drogas mediada pela MRP1**

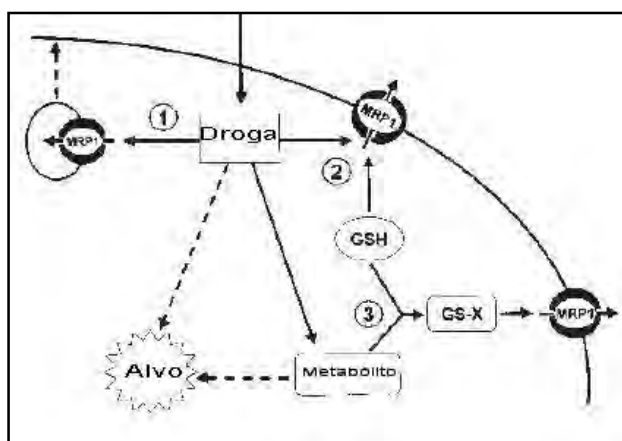
A relação entre a superexpressão da MRP1 e resistência à drogas é bem estabelecida em neoplasias humanas (LOE et al., 1996; HIPFNER et al., 1999; KRUH &

BELINSKY, 2003). A superexpressão da MRP1 leva ao aumento do efluxo de drogas ATP-dependente, resultando na diminuição das suas concentrações intracelulares. Entretanto, frequentemente, o nível da superexpressão da MRP1 não está correlacionado com a quantidade de drogas exportadas das células e, às vezes, as células que a superexpressam não demonstram um aumento de seu efluxo. Comparadas com suas contrapartes sensíveis, as células que superexpressam a MRP1, resistentes à drogas, mostram distribuição diferente, com acúmulo de doxorrubicina ou daunorrubicina fluorescentes dentro de vesículas intracelulares. Nas células sensíveis a doxorrubicina se acumulou no núcleo, enquanto que nas que superexpressaram a MRP1, a distribuição foi exclusivamente citoplasmática (RENES et al., 2000). Isso sugere que a MRP1 previne a entrada de drogas para dentro do núcleo onde vários agentes antineoplásicos exercem sua atividade citotóxica. Além da sua localização na membrana plasmática, a MRP1 é também encontrada em membranas intracelulares de vesículas secretórias, supostamente derivadas do aparelho de Golgi (van LUYN et al., 1998). Isso demonstra que o seqüestro de drogas em vesículas intracelulares fornece outro mecanismo, além do efluxo, para a resistência às drogas mediada pela MRP1 (RENES et al., 2000).

Até recentemente, o mecanismo pelo qual a MRP1 poderia transportar agentes quimioterápicos não foi definido. A idéia inicial foi que a MRP1, semelhante à gp-P, poderia ser uma translocadora de drogas inalteradas. De fato, se estas drogas forem compostos aniônicos, elas serão transportadas pela MRP1 sem alterações. Por outro lado, drogas antineoplásicas básicas inalteradas por si não são transportadas pela MRP1 (RENES et al., 1999).

Com base na sua função de transporte de conjugados glutatiônicos, glucurônicos e sulfatos, foi proposto que a MRP1 poderia conferir resistência à drogas por meio da exportação das drogas conjugadas (JEDLITSCHKY et al., 1996). A MRP1 é capaz de transportar os conjugados glutatiônicos dos agentes alquilantes clorambucil e melfalan, embora não esteja definido se ela é capaz de conferir resistência a esses agentes. Por outro lado, muitas drogas quimioterápicas que a MRP1 confere resistência não são substratos para conjugação com a GSH, glucuronídeos ou sulfatos (O'BRIEN & TEW, 1996). Contudo, experimentos com membranas vesiculares das células que

superexpressam a MRP1, demonstraram que esta proteína é transportadora de drogas antineoplásicas inalteradas, como a vincristina e a daunorrubicina, mas somente na presença de quantidades fisiológicas de GSH (HIPFNER et al., 1999). Este resultado corrobora com o anteriormente observado, que indica que a GSH é um fator crítico para resistência à drogas mediada pela MRP1 (Figura 3) (DEELEY & COLE, 2006).



**Figura 3. Representação esquemática do modelo da resistência às drogas mediada pela MRP1. Após entrar na célula, a MRP1 previne que a droga atinja seu alvo por meio de (1) sequestro dentro de vesículas intracelulares ou (2) exportação com ou sem o auxílio da GSH. Os metabólitos das drogas podem ser desintoxicados pela conjugação com a GSH seguido do transporte para fora da célula mediado pela MRP1 (3) (Adaptado de RENES et al., 2000).**

Os níveis relativos de resistência às drogas variam de acordo com a linhagem celular. Embora o fenótipo de resistência conferido pela expressão da MRP1 possa ser influenciado pelo tipo da célula, muito dessa variabilidade é sem dúvida o resultado da complexidade das respostas celulares à seleção da droga. Curiosamente, a superexpressão da MRP1 e gp-P não são mutuamente exclusivas. Não está claro qual fator determina que mecanismo(s) de resistência predominará após a seleção. Contudo, a análise de vários grupos de linhagens celulares selecionadas a partir de níveis crescentes de resistência à drogas sugeriu que a MRP1 pode estar envolvida nas concentrações de drogas mais baixas, enquanto que a superexpressão da gp-P geralmente emerge dos níveis mais altos de resistência (HIPFNER et al., 1999).

Conforme determinado a partir de análises de linhagens celulares transfectadas, a MRP1 é capaz de conferir resistência às antraciclinas, aos alcalóides da vinca, às epipodofilotoxinas, camptotecinas e ao metotrexato, mas não aos taxanos, que é um

componente importante do perfil de resistência da pg-P (HIPFNER et al., 1999; BORST et al., 2000; KRUH & BELINSKY, 2003). Nenhuma das duas proteínas confere resistência às drogas contendo platina ou metais pesados como o  $\text{Cd}^{2+}$ . Além disso, a superexpressão da MRP1 está associada com a resistência em nível baixo aos oxianions arsenicais e antimônias (HIPFNER et al., 1999).

#### **2.1.1.6- Expressão da MRP1 nas neoplasias humanas**

A expressão da MRP1 disseminada nos tecidos normais fornece um desafio adicional na avaliação de sua presença nas amostras clínicas. Isto é um problema particular quando se utilizam técnicas como a RT-PCR e “imunoblot” com amostras de tumores que possam conter quantidades variadas de tecido normal (BECK et al., 1996). Todavia, essas técnicas associadas à imunoistoquímica, empregando anticorpos monoclonais específicos para MRP1 (FLENS et al., 1994; WRIGHT et al., 1998) fornecem evidências convincentes da expressão da MRP1 elevada em uma variedade de tumores sólidos, incluindo neoplasias de pulmão, mama e próstata (DEELEY et al., 2006).

Carcinoma de células não pequenas de pulmão (CCNPP) é responsável por mais de 75% dos casos de neoplasias pulmonares. O CCNPP, ao contrário da neoplasia de pequenas células do pulmão, é inerentemente resistente à múltiplas drogas, e níveis de expressão da MRP1 de moderados a altos foram encontrados em uma grande proporção de tumores não tratados (LEE et al., 1998). Além disso, a expressão da MRP1 foi considerada um indicador altamente significativo de resposta insatisfatória à quimioterapia e de redução da sobrevida no CCNPP (BERGER et al., 2005).

A expressão da MRP1 também constitui um marcador de prognóstico negativo nas neoplasias mamárias nos estágios iniciais, com vários estudos revelando uma associação forte entre o nível de expressão e a redução do tempo de recidiva e de sobrevivência (NOOTER et al., 1997; RUDAS et al., 2003). Aumentos da expressão da MRP1 em metástases de tumores de mama em linfonodos, sugerem uma função potencial para a MRP1 na doença metastática (ZOCHBAUER-MULLER et al., 2001).

Na neoplasia de próstata, os níveis da MRP1 tendem a aumentar com o estadiamento e capacidade invasiva do tumor (SULLIVAN et al., 1998). A proteína é expressa em níveis moderados no epitélio prostático normal e altos nas neoplasias prostáticas intraepiteliais (DEELEY et al., 2006). Outro estudo demonstrou que as células de neoplasias prostáticas que superexpressam a MRP1 possuem habilidade para expelir compostos terapêuticos antiandrógenos, sugerindo que o transportador possa ser um fator importante na falha nessa modalidade terapêutica (GRZYWACZ et al., 2003).

O neuroblastoma é o tumor sólido extracraniano mais comum em crianças. Um dos indicadores moleculares negativos mais fortes da sua evolução é a amplificação do gene *NMYC*. A expressão da MRP1 foi correlacionada positivamente com amplificação desse gene e é indicativa de prognóstico negativo. Espécimes de neuroblastomas primários não tratados indicam uma função clara da MRP1 nos refratários à terapia, demonstrando que, assim como para o *NMYC*, a expressão da MRP1 alta está fortemente associada com redução na sobrevida dos pacientes (MUNOZ et al., 2007).

Existe uma série de análises da expressão da MRP1 nas leucemias agudas e crônicas com resultados discordantes. Como nos tumores sólidos, a determinação da significância clínica da MRP1 nas células leucêmicas é complicada pelo fato de que a proteína é expressa em todas as linhagens celulares hematopoiéticas. Na leucemia mieloblástica aguda (LMA) a expressão da MRP1 geralmente não é considerada como sendo prognóstica da resposta à quimioterapia (KOHLENER et al., 1999; POULAIN et al., 2000). Contudo, ela pode estar correlacionada com o estágio e possivelmente com o tempo de sobrevida. Um dos fatores que dificultam estabelecer o real valor prognóstico da MRP1 na LMA é a presença de múltiplos transportadores nas células leucêmicas. Por exemplo, um estudo encontrou que a presença combinada da MRP1 e da gp-P foi indicativa de resistência ao tratamento quimioterápico, enquanto que cada transportador sozinho não (LEGRAND et al., 1999).

### **2.1.1.7- MRP1 na medicina veterinária**

Existem escassos estudos com a MRP1 em tecidos de animais. Sabe-se que a MRP1 canina (canMRP1) apresenta 92% de identidade com a MRP1 humana e 88% com a mrp1 murina. A canMRP1 confere resistência ao etoposídeo e à vincristina, entretanto não confere resistência à doxorrubicina e à mitoxantrona (MA et al., 2002).

Conrad et al. (2001) avaliaram a expressão da canMRP1 e do seu RNAm no fígado, rim, duodeno, jejuno, íleo, cólon, pulmão, cérebro e testículo. Os órgãos que apresentaram alta expressão da proteína foram o cérebro, rim, fígado e testículo, enquanto que no pulmão e no intestino a expressão foi baixa. A análise do RNAm mostrou uma expressão semelhante nos órgãos testados, com exceção do fígado e cérebro, nos quais a expressão foi menor. No intestino a expressão do RNAm foi maior que o esperado, ao comparar com a análise da proteína.

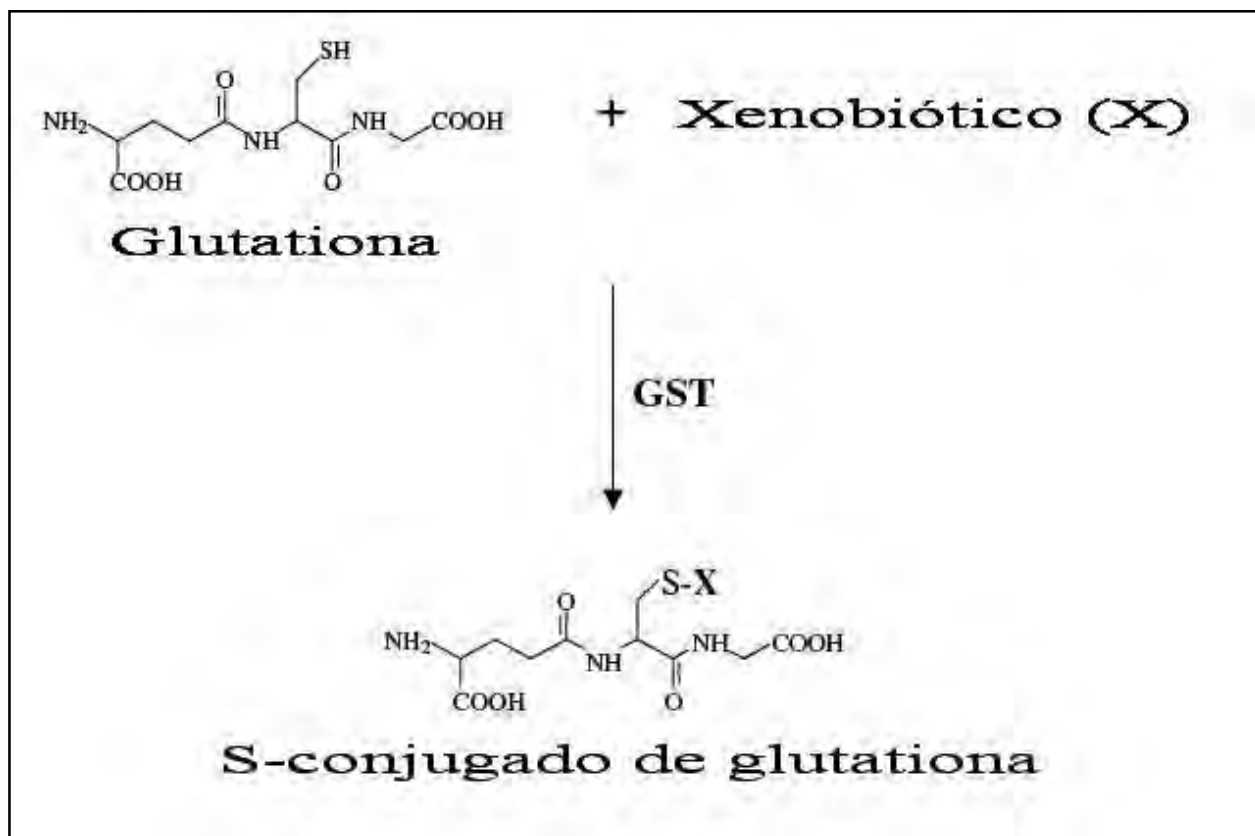
Em um estudo com mastocitoma canino, foi possível detectar a MRP1 em 18% dos espécimes submetidos à reação de imunoistoquímica. Adicionalmente, o autor constatou uma co-expressão da MRP1/gp-P em 26% dos espécimes (MIYOSHI et al., 2002). Em linfomas caninos, foi observada alta expressão da proteína MRP-1 tanto no momento do diagnóstico (71,5%) quanto na recidiva tumoral (92,9%). Novamente se notou co-expressão da MRP-1/gp-P nos espécimes estudados (REZENDE, 2005). Mais recentemente, Lee et al. (2007) encontraram expressão da MRP1 em 19,2% dos espécimes de carcinoma de células de transição canino.

## **2.2 Glutathione S-transferase**

### **2.2.1- Função**

As glutathione S-transferases (GSTs) fazem parte da família de enzimas da Fase II da desintoxicação que atuam protegendo as macromoléculas celulares do ataque de eletrófilos reativos. Especificamente, as GSTs catalizam a conjugação da glutathione (GSH) com variedade de compostos eletrófilos endógenos e exógenos (Figura 4). O conjugado resultante é menos tóxico, mais hidrossolúvel e, portanto mais facilmente excretado da célula. O transporte para fora das células ocorre por meio da ação de

proteínas transportadoras denominadas de GS-X (incluindo a MRP) (O'BRIEN & TEW, 1996; STAVROVSKAYA, 2000; TOWNSEND & TEW, 2003).



**Figura 4. Representação esquemática da conjugação da glutatona como um xenobiótico (X) via GST resultando na formação do S-conjugado de glutatona (adaptado de TOWNSEND & TEW, 2003).**

As GSTs localizam-se preferencialmente no citoplasma, entretanto também possuem atividade na membrana mitocondrial, microsossomos e núcleo (ALIYA et al., 2003). A família das GSTs humanas é composta de oito isoenzimas designadas de alfa, mu, pi, theta, sigma, kappa, omega e zeta (FRANEKOVA et al., 2008). Dentre elas, a GSTpi é a que foi mais frequentemente detectada em tumores humanos e possivelmente a sua superexpressão possa resultar em um aumento na rapidez da desintoxicação e, assim, diminui a efetividade do tratamento (ALIYA et al., 2003).

### 2.2.2- Substratos

A característica comum dos substratos catalisados pela GST e conjugados com a GSH é a sua propriedade eletrofílica. Esta é uma característica primária da maioria dos agentes alquilantes e muitos estudos (citados por O'BRIEN & TEW, 1996) têm focado esta classe de drogas antineoplásicas como substratos para as GSTs. Em geral, as isoenzimas alfa e mu estão associadas com a desintoxicação da mostarda nitrogenada e da nitrosuréia, respectivamente. Já o aumento da expressão da isoenzima pi foi associado com resistência ao melfalan, clorambucil e ciclofosfamida (TOWNSEND & TEW, 2003). O quadro 3 lista os agentes antineoplásicos nos quais a resistência está associada com os níveis elevados das GSTs.

**Quadro 3. Relação dos agentes antineoplásicos que estão associados com o aumento dos níveis da GST e resistência (adaptado de TOWNSEND & TEW, 2003).**

| <b><i>Substratos da GST</i></b> | <b><i>Não caracterizados como substratos</i></b> |
|---------------------------------|--------------------------------------------------|
| Clorambucil                     | Antimetabólicos                                  |
| Melfalan                        | Drogas anti-microtúbulos                         |
| Mostarda nitrogenada            | Inibidores da Topoisomerases I e II              |
| Mostarda de fosforamida         | Bleomicina                                       |
| Carmustina                      | Mitomicina C                                     |
| Ácido etacrínico                | Cisplatina                                       |
| Esteróides                      | Carboplatina                                     |

### 2.2.3- Glutathione S-transferase e resistência a múltiplas drogas

As evidências primárias do papel da GSH/GST na resistência a drogas em seres humanos provêm de três fontes: 1) análise das células tumorais de pacientes antes e após o início da resistência clínica às drogas, na qual se observa um aumento da GSH/GST após o desenvolvimento da mesma; 2) um aumento da GSH/GST após a seleção de linhagens celulares extraídas de tumores com resistência adquirida a agentes antineoplásicos; 3) análise da expressão de resistência após a transfecção de genes particulares da GST em linhagens celulares (O'BRIEN et al., 2000).

Em seres humanos, muitos tumores de origem linfóide, ovariana, mamária, pulmonar, vesical, renal, prostática, nervosa e de cólon mostraram aumentos na expressão de GSH/GSTs quando comparados com tecidos normais (O'BRIEN & TEW, 1996).

Como citado anteriormente, a GSTpi é a isoenzima mais predominantemente detectada nos espécimes tumorais e linhagens celulares. Aparentemente, a GSTpi está envolvida na regulação da proliferação celular por inibir os efeitos das ROS sobre a divisão celular. No caso de células neoplásicas resistentes à doxorrubicina, sugere-se que a superexpressão da GSTpi possa influenciar no "status" do "redox" celular, e suprimir a conversão da doxorrubicina em radicais livres semiquinona com subsequente produção de radicais ânions superóxido e peróxido. Portanto, a superexpressão da GSTpi também pode estar associada com o desenvolvimento da resistência às drogas, não apenas por aumentar a desintoxicação dos agentes antineoplásicos, mas também a uma supressão das ROS celulares que pode induzir apoptose (ALIYA et al., 2003).

Na medicina veterinária, três trabalhos detectaram a expressão da GST nos tumores de mama (KUMARAGURUPARAN et al., 2006a), osteossarcoma (SHOIEB et al., 1998) e carcinoma de bexiga (ROCHA et al., 2000) de cães, entretanto novos estudos são necessários para confirmar sua importância no desenvolvimento da resistência às drogas antineoplásicas nessa espécie.

## **2.3- Proteína p53**

### **2.3.1- Papel biológico e função da p53**

De acordo com Kandioler-Eckersberger et al. (2000) e Kumaraguruparan et al. (2006b) as mutações dos oncogenes fazem com que as células passem a se dividir sem restrições, enquanto que as mutações dos genes supressores de tumor fazem com que haja produção de proteínas defeituosas que não conseguem prevenir a replicação irregular das células, principalmente quando ocorre agressão ao DNA. Portanto, tanto os oncogenes como os genes supressores de tumor podem levar a formação de

tumores malignos como resultado final de uma mutação, os primeiros por serem ativados e os segundos por serem desativados (KOPNIN, 2000).

Quando a proteína p53 foi descoberta em 1979, verificou-se sua superexpressão em muitos tipos de tumores malignos, portanto, chegou-se a conclusões precipitadas de que se tratava de um oncogene. Mais tarde pensou-se que a superexpressão era de sua forma mutante (KO & PRIVES, 1996; LEVINE, 1997). Porém, atualmente sabe-se que o P53 é um gene supressor de tumor (SCHMITT et al., 1998).

O gene P53 codifica uma fosfoproteína com 393 aminoácidos e peso molecular de 53 quilodaltons, a qual é capaz de se ligar com seqüências específicas de DNA, atuando como um fator de transcrição. Ele regula muitos genes alvos (por exemplo, WAF-1, GADD45, MDM2, p21 e ciclina G), que induzem a interrupção do ciclo celular, apoptose, senescência e reparo do DNA ou alteram o metabolismo, em resposta a diversos estresses (danos ao DNA, como exposição à luz ultravioleta, radiações ionizantes e drogas radiomiméticas) (VOUSDEN, 2000; HARMS et al., 2004; HARRIS & LEVINE, 2005; MASHIMA & TSURUO, 2005; GREEN & CHIPUK, 2006). Assim, considera-se que o gene P53 garante a integridade genômica (GOTTLIEB & OREN, 1996; CHUMAKOV, 2000). A falta do P53 funcional em células tumorais é considerada responsável pela instabilidade genômica destas células, que se manifesta por aneuploidias e pela habilidade de produzir amplificação gênica (KELLEY & JOHNSON, 1994).

### **2.3.2- Mutação do gene P53**

O P53 está alterado em diversas neoplasias em humanos, apresentando-se mutado em mais de 50% dos casos (PIETSCH et al., 2006). Mutações neste gene também foram identificadas em cães com carcinoma de tireóide (DEVILLE et al., 1994), carcinoma de células escamosas (TEIFKE & LÖHR, 1996), osteossarcoma (JOHNSON et al., 1998), melanoma (ROELS et al., 2001), tumor de mama (CHUNG-HO et al., 2002), venéreo transmissível (CHOI & KIM, 2002) entre outras neoplasias. Contudo, os mecanismos que envolvem as mutações no P53, bem como seu significado clínico, não estão bem estabelecidos em cães com linfoma (SOKOLOWSKA et al., 2005).

A perda da função do P53 comumente resulta de eventos mutacionais, como mutações pontuais do tipo “nonsense”, “missense” e “splice”, perdas alélicas, rearranjos e deleções (LEVINE et al., 1994). A grande maioria das mutações encontradas no P53 de tumores humanos está distribuída sobre o domínio central da região codificadora, entre os exons cinco e nove, afetando a capacidade da p53 de se ligar a seqüências no DNA. Uma ou mais mutações podem ser herdadas ou podem surgir como consequência da exposição a carcinógenos ambientais ou a agentes infecciosos (Figura 5) (SILVA, 2004).

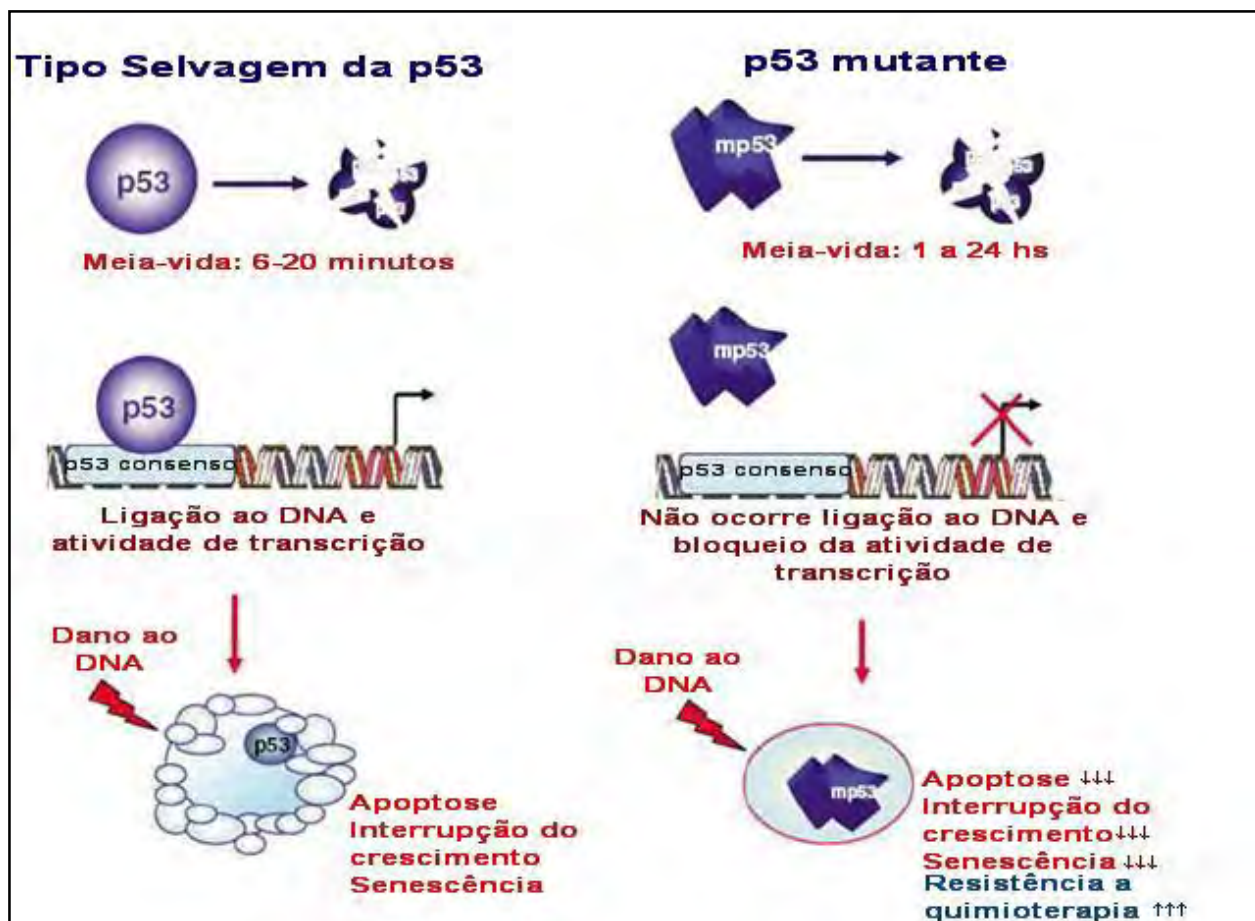
O tipo selvagem da proteína p53 é rapidamente eliminado devido à sua curta meia-vida. Em contraste, a proteína p53 mutante tem uma meia-vida de várias horas e pode ser detectada por técnicas de imunistoquímica (Figura 5) (KANDIOLER-ECKERSBERGER et al., 2000; NAKANO et al., 2005; WU et al., 2006). A meia vida muito curta da p53 selvagem impede a sua detecção em células normais. Assim, a detecção imunistoquímica da proteína p53 corresponde à detecção de mutantes de p53 (GINN et al., 2000).

### **2.3.3- Expressão da p53 e resistência à quimioterapia**

A maioria dos agentes antineoplásicos danifica direta ou indiretamente o DNA. (HICKMAN, 1996; SCHMITT & LOWE, 2002; LUQMANI, 2005). A p53 possui um papel importante na resposta ao dano do DNA induzido por drogas quimioterápicas (KONSTANTINIDOU et al., 2002). Os mecanismos envolvidos vinculam aumento rápido dos níveis da p53 e a mediação de várias respostas celulares, incluindo (1) interrupção na fase G1 via indução transcricional da p21/WAF21 (CHEN et al., 1995); (2) reparo do dano ao DNA via indução transcripcional do GADD45, que interage com o PCNA para realização desta função; e (3) indução da apoptose (LOWE et al., 1994).

A interrupção do ciclo celular na fase G1 permite o reparo do DNA antes da fase S. Contudo, se o reparo perfeito for impossível, a p53 então aciona a morte celular programada (SMITH et al., 1994). Nas células tumorais com a p53 mutante, a perda da função desta proteína e subsequente dos eventos celulares descritos acima resultam em resistência à quimioterapia (LOWE et al., 1994; HICKMAN, 1996).

Entretanto, em algumas células, a perda do ponto de controle do G1 não influencia na quimiossensibilidade, já que o do G2 parece ser um determinante mais importante da sensibilidade. As diferenças descritas provavelmente indicam que o tipo da resposta é um fenômeno específico do tipo celular (SLICHNMYER et al., 1993).



**Figura 5.** Representação esquemática da proteína p53 do tipo selvagem em contraste com a p53 mutante. A meia-vida e a habilidade de se ligar especificamente ao DNA são as características mais marcantes que distinguem uma da outra (adaptado de STRANO et al., 2007).

Lowe et al. (1994) foram os primeiros a perceber a importância da p53 na morte celular induzida pela quimioterapia ao detectarem que os fibroblastos embrionários de camundongos deficientes de p53 foram mais resistentes que suas contrapartes, que conservavam esta proteína, em induzir apoptose pelos agentes quimioterápicos. Estudos posteriores em camundongos e humanos confirmaram que a p53 é um mediador crítico da morte celular induzida por muitas das drogas quimioterápicas.

usadas comumente. Grande parte dos agentes que lesam o DNA, induzem o acúmulo e ativação da p53, geralmente como resultado de modificações pós-transducionais, como a fosforilação (SCHMITT & LOWE, 2002; IRWIN, 2004). Clinicamente, a resposta do tumor à quimioterapia pode ser também correlacionada com a condição da p53 (LOWE et al., 1994).

Proteínas p53 alteradas foram consideradas como fator potencial de prognóstico para uma variedade de tumores humanos. Os dados experimentais permitem estabelecer correlação entre a perda da função da proteína p53, devido às mutações, e a diminuição da sobrevivência de pacientes com carcinomas mamário ou pulmonar, sendo considerada fator prognóstico desfavorável. Entretanto, esta associação pode não ocorrer para todos os tipos de tumores (HARRIS & HOLLSTEIN, 1993) e, no caso de animais, os resultados para o mesmo tipo de tumor podem ser contraditórios (GINN et al., 2000; JAFFE et al., 2000).

Nesse sentido, Ginn et al. (2000) não conseguiram estabelecer a relação entre a expressão da p53 e o prognóstico em cães portadores de mastocitoma cutâneo canino. Além disso, não foram verificadas diferenças significativas entre o grau histológico do tumor e a imunorreatividade da p53. Os autores sugerem que a ausência de correlação entre a imunorreatividade para p53 e o comportamento biológico do tumor ocorreu devido à falta de especificidade da p53 para o gene supressor mutante.

Por outro lado, Jaffe et al. (2000) verificaram que mastocitomas cutâneos caninos de grau III apresentaram porcentagem de células marcadas com a p53 significativamente maior do que os tumores de graus I e II. Nestes últimos, não foram observadas diferenças significativas entre eles, impossibilitando a distinção por esta técnica. Embora os tumores de grau III tenham apresentado uma porcentagem significativamente maior de células marcadas, não foi possível estabelecer uma associação entre o grau histopatológico e o tempo de sobrevivência ou o tempo de recorrência do tumor.

Tumores osteogênicos caninos foram classificados de acordo com a porcentagem de células tumorais marcadas com o anticorpo policlonal p53. Diferenças significativas foram observadas entre osteossarcomas (72%) e tumores ósseos multilobulares (20%), mostrando que a proteína p53 está superexpressa na maioria dos

osteossarcomas caninos. Entre os osteossarcomas, os do esqueleto apendicular apresentaram prevalência significativamente maior de p53 (84%) do que os do axial (56%). Esses resultados sugerem que alterações na expressão da p53 estão correlacionadas com tumores de comportamento altamente agressivo (SAGARTZ et al., 1996).

Estudando linfomas caninos, Sueiro et al. (2004) identificaram a marcação nuclear para p53 em 59,6% dos casos. A superexpressão da p53 em linfomas caninos foi significativamente associada com aqueles de maior grau histológico (escore 2), o que condiz com seus comportamentos clínicos mais agressivos. Os mesmos autores observaram aumento significativo da idade média dos casos positivos para p53 (escores 1 e 2) e dão suporte à teoria de que as mutações genéticas tendem a se acumular com o aumento da idade, enquanto o reparo do DNA se torna menos eficiente, aumentando, assim, a susceptibilidade aos tumores. Veldhoen et al. (1998) sugeriram que cães com linfoma podem não responder à quimioterapia devido a mutações no p53.

A expressão da p53 em tumores também pode estar associada a fatores oncogênicos. Snyder et al. (2004) estudaram a expressão da p53 no carcinoma de células escamosas oral felino, relacionando-o com a exposição à fumaça de cigarro. Em 65% das amostras foi observada marcação positiva para a p53. As provenientes de gatos expostos à fumaça apresentaram superexpressão de p53, cerca de 4,5 vezes maior do que os não expostos. Entre aqueles expostos cinco anos ou mais, a qualquer tipo de tabaco, a expressão da p53 foi sete vezes maior. Gatos de pêlos longos e fêmeas também manifestaram maior expressão da p53 em seus tumores. Os resultados desse trabalho indicam relação entre o desenvolvimento do carcinoma de células escamosas oral felino e a exposição doméstica à fumaça de tabaco, podendo implicar o gene P53 como um sítio potencial para mutações relacionadas à carcinogênese deste tumor (SNYDER et al., 2004).

### 3- MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1- Grupos experimentais

Foram selecionados espécimes caninos de tumores venéreos transmissíveis (TVTC, n=14), mastocitomas (MAST, n=16), carcinomas mamário e de glândula hepatóide (CAR, n=22) e linfomas (LINF, n=16) dos arquivos do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia Veterinária e do Laboratório de Imunoistoquímica da FCAV – UNESP – Campus de Jaboticabal/SP, que estavam armazenados em blocos de parafina de 1990 a 2004. A seguir, os espécimes foram distribuídos em subgrupos conforme exposto na tabela 1 e figura 6.

**Tabela 1. Número de espécimes tumorais distribuídos por grupos e subgrupos. Jaboticabal, SP, 2008.**

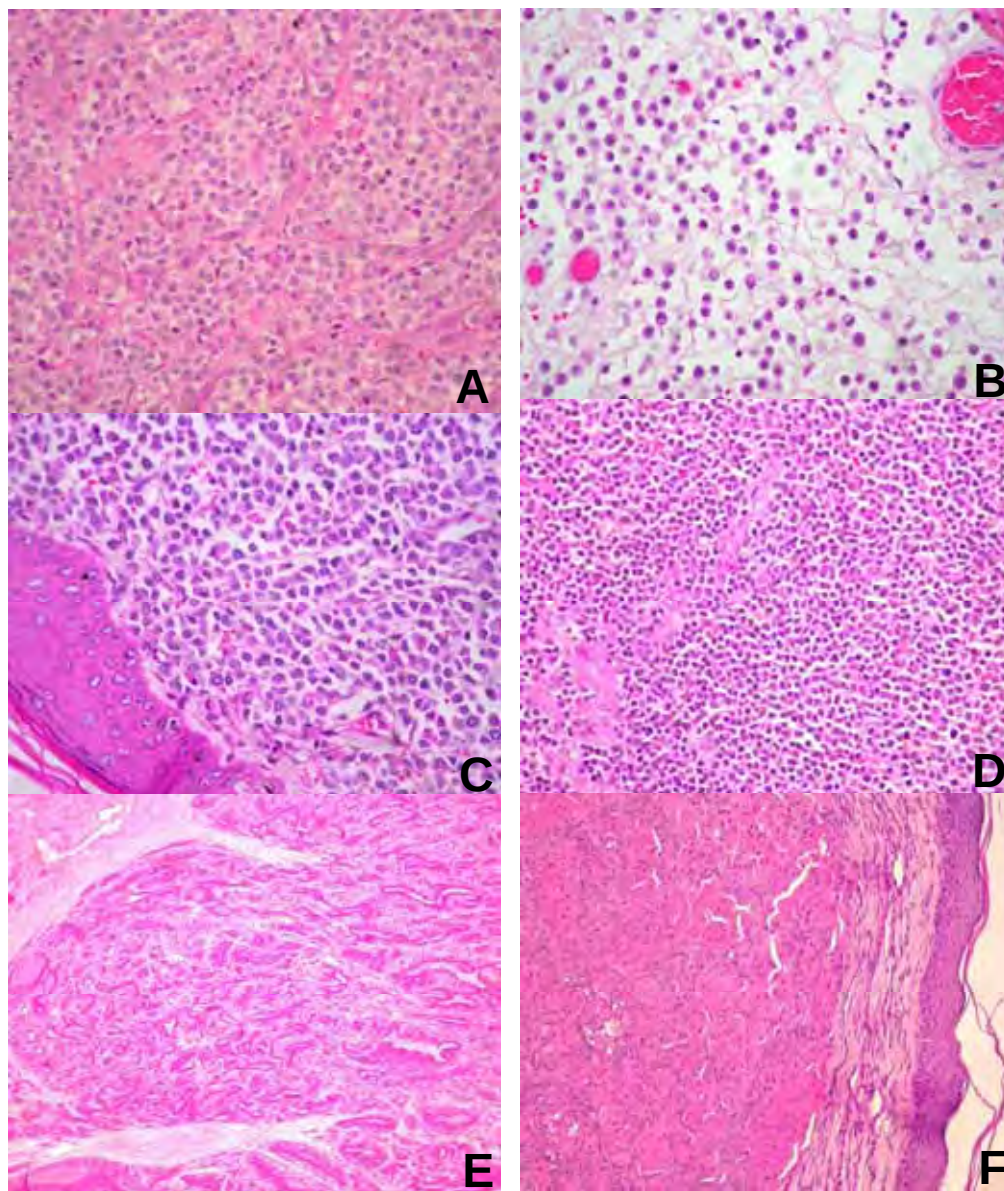
| Grupo                                        | Nº de espécimes | Subgrupo                                       | Nº de espécimes |
|----------------------------------------------|-----------------|------------------------------------------------|-----------------|
| TVTC<br>(Tumor Venéreo Transmissível Canino) | 14              | TVT <sup>1</sup>                               | 9               |
|                                              |                 | TVTR                                           | 5               |
|                                              |                 | (TVT resistente à quimioterapia <sup>2</sup> ) |                 |
| MAST<br>(Mastocitomas)                       | 16              | MASTI<br>(Mastocitoma grau I)                  | 8               |
|                                              |                 | MASTIII<br>(Mastocitoma grau III)              | 8               |
|                                              |                 |                                                |                 |
| CAR<br>(Carcinomas)                          | 22              | CARM<br>(Carcinoma mamário)                    | 14              |
|                                              |                 | CARH<br>(Carcinoma de glândula hepatóide)      | 8               |
|                                              |                 |                                                |                 |
| LINF<br>(Linfomas)                           | 16              | LINFB<br>(Linfoma de células B)                | 9               |
|                                              |                 | LINFT<br>(Linfoma de células T)                | 7               |
|                                              |                 |                                                |                 |

<sup>1</sup>Espécimes coletados antes do início do tratamento quimioterápico.

<sup>2</sup>TVTs que apresentaram pouca ou nenhuma resposta clínica ao final do tratamento quimioterápico com sulfato de vincristina.

Com exceção dos espécimes que constituíram o grupo TVTR, todos os demais foram obtidos de animais não previamente submetidos à terapia antineoplásica, baseando-se nas informações contidas no histórico clínico.

Todos espécimes que compuseram os grupos e subgrupos experimentais estavam emblocados em parafina e foram novamente cortados, corados com Hematoxilina & Eosina, examinados e classificados de acordo com Meuten (2002).



**Figura 6. Fotomicrografias de cortes histológicos dos espécimes neoplásicos caninos empregados neste estudo: (A) Tumor venéreo transmissível canino (x400); (B) Mastocitoma cutâneo grau I (x400); (C) Mastocitoma cutâneo grau III (x400); (D) Linfoma (x400); (E) Carcinoma mamário (x100); (F) Carcinoma de glândula hepatóide (x200). Coloração pela Hematoxilina & Eosina. Imagem captada por equipamento digital Sony® DSC-W70 acoplado a microscópio triocular Nikon® Eclipse E200. Jaboticabal, SP, 2008.**

### 3.2- Imunofenotipagem dos linfomas

O imunofenótipo dos linfomas foi previamente determinado por Sueiro et al. (2004), por imunoistoquímica, sendo classificados como B ou T, quando pelo menos 10% das células neoplásicas reagiram exclusivamente com o anticorpo CD79a (clone HM57; Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA), ou com o anticorpo CD3 (cód. A0452, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA), respectivamente.

### 3.3- Estudo imunoistoquímico

O método imunoistoquímico utilizado foi o complexo estreptoavidina-biotina (ABC), desenvolvido por Hsu et al. (1981). Três anticorpos primários foram utilizados para se avaliar a expressão das proteínas MRP1, p53 mutante e da isoenzima GSTpi, nos diferentes grupos experimentais (Tabela 2).

**Tabela 2. Especificações dos anticorpos empregados nas reações de imunoistoquímica neste estudo. Método ABC. Jaboticabal, SP, 2008.**

| Anticorpos primários | Imunoglobulina (subclasse) | Especificidade         | Clone           | Diluição | Código                   |
|----------------------|----------------------------|------------------------|-----------------|----------|--------------------------|
| <b>MRP1</b>          | IgG2a                      | Camundongo anti-humano | Monoclonal 33A6 | 1:25     | NCL-MRP1 <sup>1</sup>    |
| <b>GSTpi</b>         | -                          | Coelho anti-humano     | Policlonal Ab-1 | 1:50     | RB-050-A0 <sup>2</sup>   |
| <b>p53</b>           | -                          | Coelho anti-humano     | Policlonal CM1  | 1:100    | NCL-p53-CM1 <sup>1</sup> |

<sup>1</sup>Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, UK.

<sup>2</sup>Labvision Corporation, Fremont CA, USA.

Cortes de 3 µm de espessura foram montados em lâminas histológicas pré-tratadas com Poly-L-lisina (Cód. P4832 - Sigma Chemical Co., St Louis, MO EUA). As lâminas assim montadas, foram deixadas em estufa a 60°C por 30 minutos e, em seguida, passaram por desparafinização em xilol e hidratação em graduações decrescentes de etanol. Após lavagem em água destilada foi realizado o bloqueio da

atividade endógena da peroxidase por meio da imersão das lâminas em peróxido de hidrogênio a 8% em metanol por 20 minutos (exceto nas reações com o anticorpo anti-MRP1). A recuperação antigênica foi realizada pelo calor e a técnica utilizada variou de acordo com o anticorpo primário empregado (Tabela 3). Após o resfriamento das lâminas por 20 minutos a temperatura ambiente, procedeu-se o bloqueio das reações não-imunes (Tabela 3). Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário durante toda a noite (de 12 a 18 horas), a 4°C.

**Tabela 3. Anticorpos primários e seus respectivos métodos e tampões de recuperação antigênica, bloqueio das ligações não imunes e anticorpos secundários empregados nas reações de imunoistoquímica neste estudo, pelo método ABC. Jaboticabal, SP, 2008.**

| Anticorpos primários | Tampões de Recuperação     | Método                           | Bloqueio das ligações não imunes                      | Anticorpos secundários                                        |
|----------------------|----------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| <b>MRP1</b>          | Tris-EDTA<br>pH=9,0        | Panela de pressão<br>(5 minutos) | Soro eqüino normal <sup>2</sup><br>20 minutos         | Anti-IgG de camundongo <sup>2</sup><br>40 minutos             |
| <b>GSTpi</b>         | Retrieve-all1 <sup>1</sup> | Banho Maria<br>(30 minutos)      | Soro caprino normal <sup>3</sup><br>20 minutos        | Anti-IgG de coelho <sup>3</sup><br>40 minutos                 |
| <b>p53</b>           | Citrato<br>pH=6,0          | Panela de pressão<br>(5 minutos) | Soro albumina bovina <sup>4</sup><br><i>overnight</i> | Anti-imunoglobulina multi-espécies <sup>5</sup><br>40 minutos |

<sup>1</sup> Signet Laboratories, Dedham, MA, EUA cód. 1910

<sup>2</sup> VECTASTAIN ABC Elite Kit, (Cód. PK 6102, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA)

<sup>3</sup> VECTASTAIN ABC Elite Kit, (Cód. PK 6101, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA)

<sup>4</sup> 0,1g de BSA em 5mL de tampão salino com fosfato (PBS), incubado juntamente com o anticorpo primário.

<sup>5</sup> Kit Easypath USA (cód. EP-USA, Erviegas instrumental cirúrgico, São Paulo, Brasil).

Subseqüentemente, incubaram-se as lâminas com o anticorpo secundário biotilado (Tabela 3), e posteriormente, com o complexo avidina-biotina-peroxidase (cód PK6100, VECTASTAIN ABC Elite Kit, Vector Laboratories, CA, EUA ou cod. EP-USA, Kit Easypath USA, Erviegas instrumental cirúrgico, São Paulo, Brasil). As reações foram reveladas pelo substrato cromogênico, 3,3 diaminobenzendina (Cód. SK4100 – DAB – Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) e contracoradas com hematoxilina de Harris por um minuto.

Entre as etapas, foram realizadas três lavagens das lâminas histológicas em solução tampão salina com fosfato (PBS) pH 7,2 com duração de cinco minutos cada, com exceção da etapa entre o bloqueio das ligações não-imunes e o anticorpo primário.

A desidratação dos cortes foi feita em gradiente crescente de alcoóis e xilóis, seguidas pela montagem em lamínula em meio permanente bálsamo do Canadá.

As reações com os anticorpos primários anti-GSTpi e anti-MRP1 tiveram como controles positivos, fígado humano e testículo canino, cólon humano e canino, respectivamente. Espécimes de carcinomas mamários caninos que previamente foram utilizados em outro estudo do nosso grupo de pesquisa (MORO et al., 2004) e que sabidamente expressam a p53 foram empregados como controle positivo nas reações com o anticorpo anti-p53. Como controle negativo foram empregados todos os elementos das reações nos mesmos tecidos, na ausência dos anticorpos primários.

Para a avaliação da frequência da imunomarcação, foram aleatoriamente selecionados cinco campos por corte e, em cada campo, foram contadas 100 células neoplásicas, entre marcadas e não marcadas, com auxílio de um retículo micrométrico (Nikon, Inc. – Japan) em aumento de x400 (ocular de x10 e objetiva de x40). Destes, foram extraídas porcentagens de células neoplásicas marcadas (PCNM) em relação ao total. Foram considerados positivos para a expressão da MRP1, GSTpi e p53, os espécimes que apresentaram mais de 10% das células marcadas, como proposto por outros pesquisadores (MIYOSHI et al., 2002; SUEIRO et al., 2004; CALATOZZOLO et al., 2005; KUMARAGURUPARAN et al., 2006b; SOKOŁOWSKA et al., 2005; YONEMARU et al., 2007).

### **3.4- Análise Estatística**

O teste exato de Fisher e a correlação de Spearman foram empregados para se analisar os resultados, considerando-se o valor de  $P < 0,05$  para indicar diferença significativa (Prisma 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA).

## 4- RESULTADOS

### 4.1- Dados dos animais

Os 14 cães que tiveram o diagnóstico de TVT e incluídos no grupo TVTC tinham idades que variaram de um a 11 anos (média 3,9 anos  $\pm$  2,7). Oitenta e cinco por cento eram fêmeas e a maioria não tinha raça definida (85,7%). Nas fêmeas, a localização mais freqüente dos tumores era na vulva e vagina e nos machos no pênis. Localizações cutânea, ocular e uterina também foram registradas.

Entre os cães com o diagnóstico de mastocitoma que compuseram o grupo MAST, a raça Boxer foi a mais freqüente (31,25%), seguida dos Basset hounds (18,75%). Outras raças como o Fila Brasileiro, Weimaraner e Teckel tiveram frequência de 6,25% cada, e 25% não tinha raça definida. A idade desses animais variou de dois a 13 anos (média 8,4  $\pm$  2,8) e o número de machos e fêmeas foi igual. A localização mais comum do tumor foi a bolsa escrotal (18,75%). Outros locais como cauda, membro torácico, membro pélvico, vulva, região inguinal, mama, pavilhão auricular, prepúcio, regiões torácica lateral e ventral, abdominal ventral, cervical e interdigital também foram relatados em uma freqüência de 6,25% cada um.

A idade dos cães com carcinoma incluídos no grupo CAR variou de seis meses a 15 anos (média de 9,5 anos  $\pm$  3,5). Os cães sem raça definida representaram 45,5% dos casos, seguidos da raça Cocker Spaniel Inglês (13,6%) e Poodle (9%). Outras raças como Maltes, Doberman pinscher, Pinscher, Teckel, Husky siberiano, Weimaraner e Fila Brasileiro corresponderam a um caso cada. Todos os animais com carcinomas mamários que compuseram o subgrupo CARM eram fêmeas. Três cães deste subgrupo tinham metástases em pulmão, fígado, rins, bexiga e cérebro. Já no subgrupo CARH, quatro cães eram machos e três fêmeas, em um caso o sexo e a idade não foram informados.

Os cães com linfomas incluídos no grupo LINF tinham idade que variou de um a 13 anos (média 7,8  $\pm$  3,6). Setenta e cinco por cento eram fêmeas e 25 % machos. Os cães sem raça definida e os boxer corresponderam a 18,75% dos casos, seguidos dos Cocker Spaniel Inglês (12,5%). Outras raças como Tenerife, Pastor Alemão, Rottweiler,

Terrier Brasileiro, Fila Brasileiro, Poodle e Pinscher corresponderam a um caso cada. A apresentação mais freqüente foi a multicêntrica (50%), seguido da cutânea (25%) e ocular e alimentar (12,5).

#### **4.2 Expressão da MRP1, GSTpi e p53**

As expressões da proteína MRP1, da isoenzima GSTpi e da proteína p53 foram observadas em 38 (55,8%), 42 (61,8%) e 49 (72%) espécimes estudados, respectivamente. Em 27 espécimes (39,7%) houve expressão concomitante dos três marcadores e em 9 (13,2%) a nenhum deles (Tabela 4).

##### **4.2.1- Expressão da MRP1**

A grande maioria dos espécimes neoplásicos que expressaram a proteína MRP1 mostrou marcação citoplasmática de aspecto granular e difuso (Figura 7 A a E). A intensidade de coloração predominante foi moderada, entretanto em alguns carcinomas mamários e de glândula hepatóide a intensidade variou de moderada a forte (Figuras 7 D e E). Em alguns espécimes dos subgrupos TVT, MASTIII CARM, LINFB e LINFT, também pôde-se notar marcação das células do infiltrado inflamatório mononuclear peritumoral (Figura 7 F).

Os grupos CAR (93,7%) e MAST (86,3%) foram os que apresentaram maior número de espécimes positivos para a MRP1, seguidos pelo LINF (25%). Não foi observada expressão dessa proteína no grupo TVTC (Tabela 4).

A expressão da MRP1 entre os subgrupos MASTI (100%) e MASTIII (87,5%), CARM (92,9%) e CARH (75%), e LINFB (22,2%) e LINFT (28,6%) não foi significativa ( $P>0,05$ ) pelo teste de exato de Fisher (Tabela 4).

Tabela 4. Expressão e co-expressão da MRP1, GSTpi e p53 nos subgrupos experimentais pela técnica de imunistoquímica. Jaboticabal, SP, 2008.

| GRUPO    | SUBGRUPO | MRP1             | GSTpi            | p53              | MRP1+<br>p53     | GSTpi+<br>p53    | MRP1+<br>GSTpi   | MRP1+<br>GSTpi+ p53 | MRP1-GSTpi-<br>p53- |
|----------|----------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------------|---------------------|
| TVTC     | TVT      | 0/9<br>(0%)      | 4/9<br>(44,5%)   | 2/9<br>(22,2%)   | 0/9<br>(0%)      | 1/9<br>(11,1%)   | 0/9<br>(0%)      | 0/9<br>(0%)         | 4/9<br>(44,5%)      |
|          |          | 0/5<br>(0%)      | 4/5<br>(80%)     | 0/5<br>(0%)      | 0/5<br>(0%)      | 0/5<br>(0%)      | 0/5<br>(0%)      | 0/5<br>(0%)         | 1/5<br>(20%)        |
|          | TVTR     | 0/5<br>(0%)      | 4/5<br>(80%)     | 0/5<br>(0%)      | 0/5<br>(0%)      | 0/5<br>(0%)      | 0/5<br>(0%)      | 0/5<br>(0%)         | 1/5<br>(20%)        |
| SUBTOTAL |          | 0/14<br>(0%)     | 8/14<br>(57,1%)  | 2/14<br>(14,2%)  | 0/14<br>(0%)     | 1/14<br>(7,1%)   | 0/14<br>(0%)     | 0/14<br>(0%)        | 5/14<br>(35,7%)     |
| MAST     | MASTI    | 8/8<br>(100%)    | 6/8<br>(75%)     | 8/8<br>(100%)    | 8/8<br>(100%)    | 6/8<br>(75%)     | 6/8<br>(75%)     | 6/8<br>(75%)        | 0/8<br>(0%)         |
|          |          | 7/8<br>(87,5%)   | 3/8<br>(37,5%)   | 7/8<br>(87,5%)   | 6/8<br>(75%)     | 3/8<br>(37,5%)   | 3/8<br>(37,5%)   | 3/8<br>(37,5%)      | 0/8<br>(0%)         |
|          | MASTIII  | 7/8<br>(87,5%)   | 3/8<br>(37,5%)   | 7/8<br>(87,5%)   | 6/8<br>(75%)     | 3/8<br>(37,5%)   | 3/8<br>(37,5%)   | 3/8<br>(37,5%)      | 0/8<br>(0%)         |
| SUBTOTAL |          | 15/16<br>(93,7%) | 9/16<br>(56,2%)  | 15/16<br>(93,7%) | 14/16<br>(87,5%) | 9/16<br>(56,2%)  | 9/16<br>(56,2%)  | 9/16<br>(56,2%)     | 0/16<br>(0%)        |
| CAR      | CARM     | 13/14<br>(92,9%) | 11/14<br>(78,6%) | 13/14<br>(92,9%) | 13/14<br>(92,3%) | 11/14<br>(78,6%) | 11/14<br>(78,6%) | 11/14<br>(78,6%)    | 1/14<br>(7,1%)      |
|          |          | 6/8<br>(75%)     | 5/8<br>(62,5%)   | 8/8<br>(100%)    | 6/8<br>(75%)     | 5/8<br>(62,5%)   | 4/8<br>(50%)     | 4/8<br>(50%)        | 0/8<br>(0%)         |
|          | CARH     | 6/8<br>(75%)     | 5/8<br>(62,5%)   | 8/8<br>(100%)    | 6/8<br>(75%)     | 5/8<br>(62,5%)   | 4/8<br>(50%)     | 4/8<br>(50%)        | 0/8<br>(0%)         |
| SUBTOTAL |          | 19/22<br>(86,3%) | 16/22<br>(72,7%) | 21/22<br>(95,4%) | 19/22<br>(86,4%) | 16/22<br>(72,7%) | 15/22<br>(68,1%) | 15/22<br>(68,1%)    | 1/22<br>(4,5%)      |
| LINF     | LINF B   | 2/9<br>(22,2%)   | 5/9<br>(55,5%)   | 5/9<br>(55,5%)   | 1/9<br>(11,1%)   | 4/9<br>(44,4%)   | 1/9<br>(10%)     | 1/9<br>(11,1%)      | 2/9<br>(22,2%)      |
|          |          | 2/7<br>(28,6%)   | 4/7<br>(57,2%)   | 6/7<br>(85,7%)   | 2/7<br>(28,6%)   | 4/7<br>(57,1%)   | 2/7<br>(28,6%)   | 2/7<br>(28,6%)      | 0/7<br>(0%)         |
|          | LINF T   | 2/7<br>(28,6%)   | 4/7<br>(57,2%)   | 6/7<br>(85,7%)   | 2/7<br>(28,6%)   | 4/7<br>(57,1%)   | 2/7<br>(28,6%)   | 2/7<br>(28,6%)      | 0/7<br>(0%)         |
| SUBTOTAL |          | 4/16<br>(25%)    | 9/16<br>(56,3%)  | 11/16<br>(68,7%) | 3/16<br>(18,7%)  | 8/16<br>(50%)    | 3/16<br>(18,7%)  | 3/16<br>(18,7%)     | 2/16<br>(12,5%)     |
| TOTAL    |          | 38/68<br>(55,8%) | 42/68<br>(61,8%) | 49/68<br>(72%)   | 36/68<br>(53%)   | 34/68<br>(50%)   | 27/68<br>(39,7%) | 27/68<br>(39,7%)    | 9/68<br>(13,2%)     |

#### 4.2.2- Expressão da GSTpi

A expressão da isoenzima GSTpi nos espécimes estudados e nos controles positivos (testículo canino e fígado humano), empregados, foi predominantemente citoplasmática, de aspecto granular e difuso, entretanto, em alguns espécimes dos subgrupos TVT, MASTI, CARM, CARH e LINFT, pôde-se observar marcação concomitante do citoplasma e do núcleo (Figura 8 A a E). Células mononucleares do infiltrado inflamatório peritumoral, células mioepiteliais, fibroblastos e vasos também foram marcados (Figura 8 D, E e F).

Dentre os grupos experimentais, o CAR apresentou maior número de espécimes positivos (72,7%). Os grupos TVTC, LINF e MAST apresentaram número de espécimes positivos semelhantes, 57,1%, 56,3 e 56,2%, respectivamente (Tabela 4).

Embora se tenha observada maior frequência de expressão para a GSTpi nos subgrupos TVTR (80%), MASTI (75%) e CARM (78,6%) e LINFb (55,5%) em comparação aos subgrupos TVT (44,5%), MASTIII (37,5%), CARH (62,5%) e LINFT (57,2%), e esta diferença não foi significativa pelo teste exato de Fisher ( $P>0,05$ ) (Tabela 4).

#### 4.2.3- Expressão da p53

A expressão da proteína p53 nos espécimes imunorreativos foi predominantemente nuclear (Figura 9 A a F), contudo pode-se observar marcações citoplasmáticas principalmente nos grupos TVTC, MAST e CAR (Figura 9 A, C, D, E e F). Além das células neoplásicas, fibroblastos e células mioepiteliais apresentaram marcação nos TVTs (Figura 9 A) e nos carcinomas mamários (Figura 9 F), respectivamente.

Os grupos CAR (95,4%) e MAST (93,7%) foram os que apresentaram maior número de espécimes positivos, seguido dos LINF (68,7%) e TVTC (14,2%) (Tabela 4).

Quando se comparou a expressão da p53 entre os subgrupos TVT (22,2%) e TVTR (0%), MASTI (100%) e MASTIII (87,5%), CARM (92,9%) e CARH (100%) e LINFb (55,5%) e LINFT (85,7%) esta não foi significativa ( $P>0,05$ ) pelo teste exato de Fisher (Tabela 4).

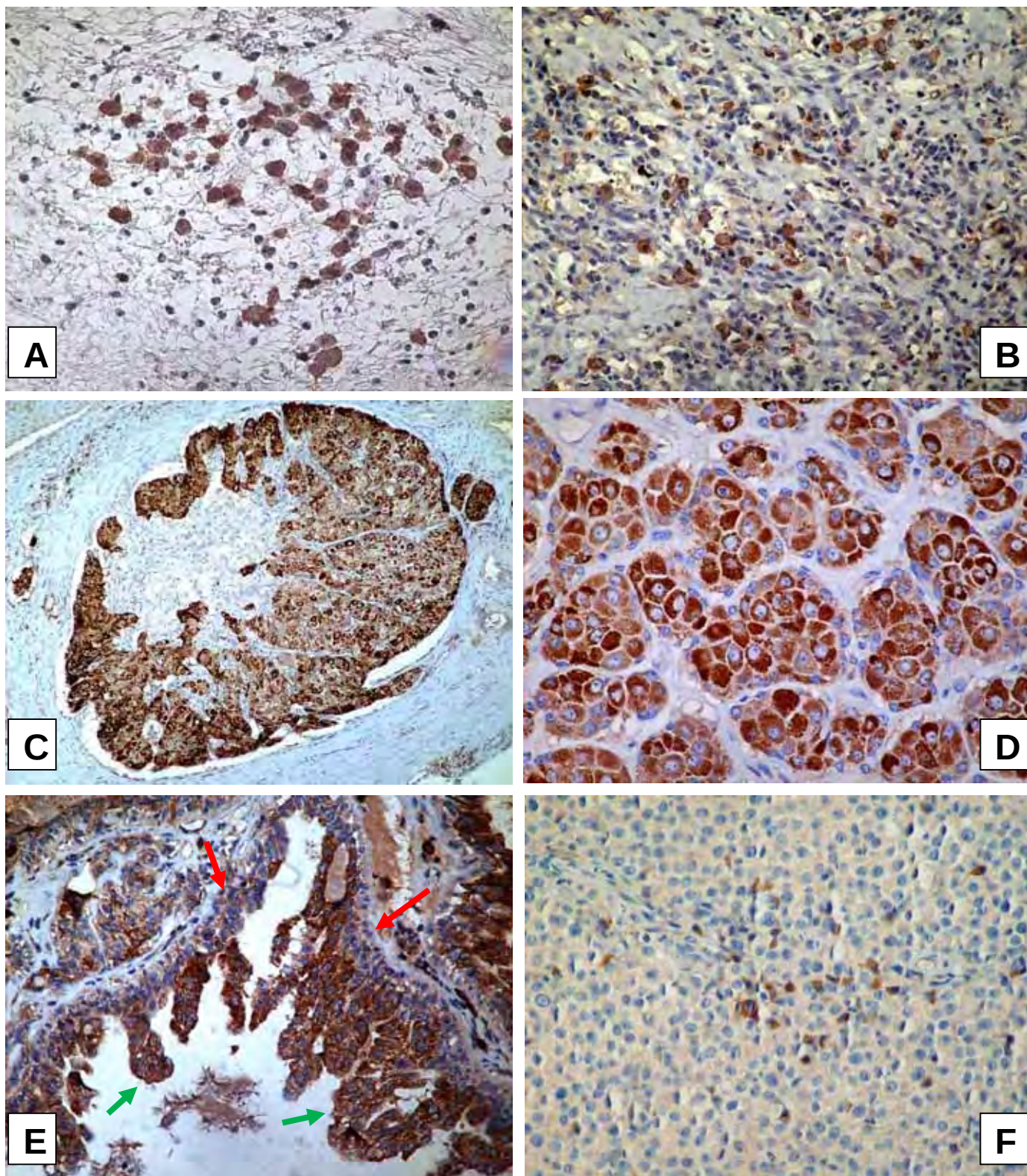


Figura 7. Ver legenda na página seguinte.

**Figura 7. Fotomicrografias de espécimes neoplásicos caninos submetidos à reação de imunistoquímica, empregando o anticorpo anti-MRP1. (A e B) Mastocitoma grau I e grau III respectivamente, observam-se marcações citoplasmáticas granulares e difusas, de coloração castanha e intensidade forte (x400). (C) Carcinoma de glândula hepatóide, observam-se marcações nas células neoplásicas delimitadas por tecido conjuntivo com marcação discreta (x200). (D) Mesmo espécime de carcinoma de glândula hepatóide exibido em C, em maior aumento (x400), evidenciando marcações citoplasmáticas granulares e difusas com intensidade de coloração variando entre moderada e intensa. (E) Carcinoma mamário, mostrando marcações citoplasmáticas granulares, de coloração castanha e intensidade forte (setas verdes) a moderada (setas vermelhas) (x400). (F) Tumor venéreo transmissível, onde se observam células do infiltrado inflamatório mononuclear marcadas de coloração castanha e ausência de marcação nas células neoplásicas (x400). Método ABC. Contracoloração pela Hematoxilina de Harris. Imagem captada por equipamento digital Sony® DSC-W70 acoplado a microscópio triocular Nikon® Eclipse E200. Jaboticabal, SP, 2008.**

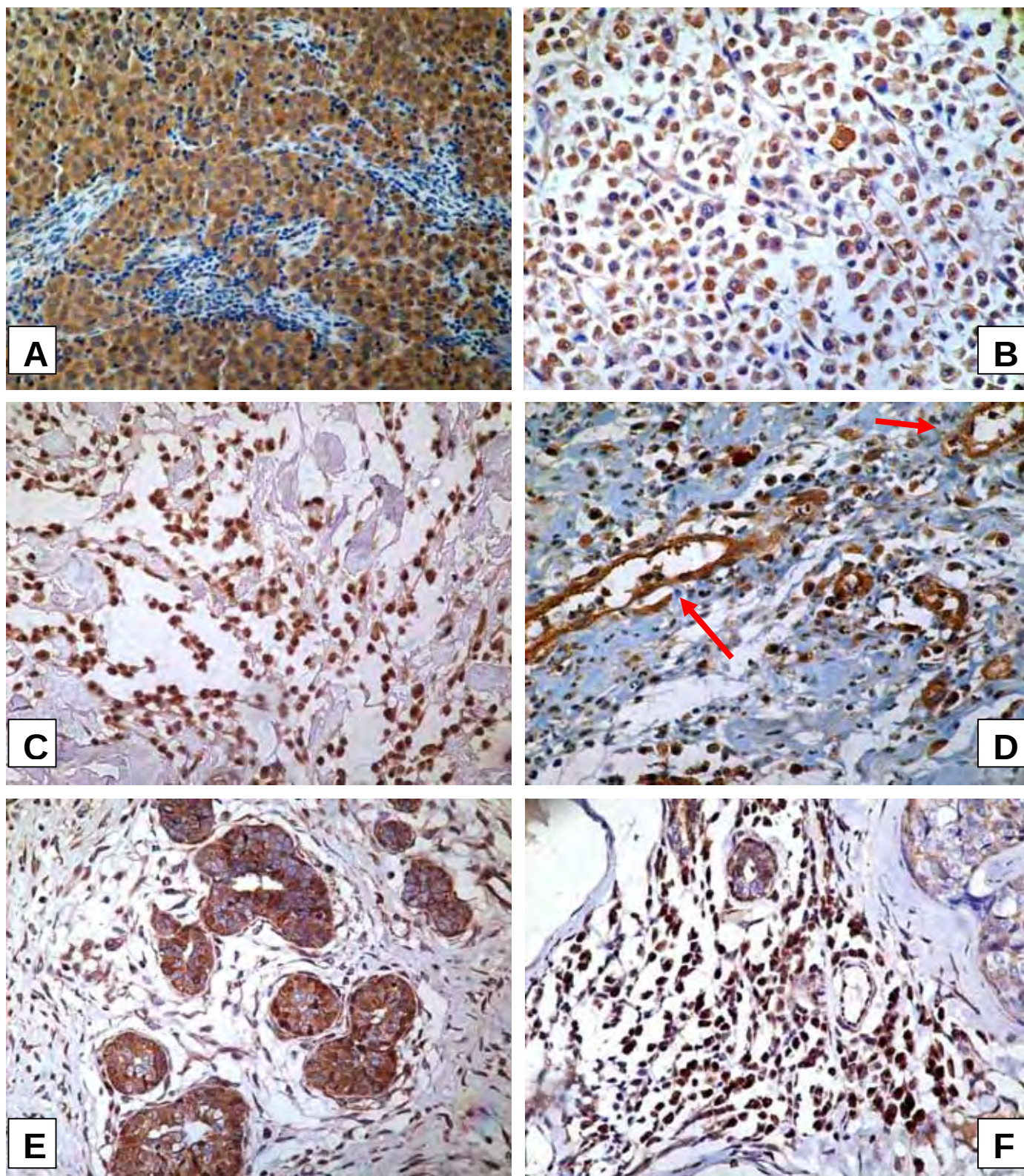


Figura 8. Ver legenda na página seguinte.

**Figura 8. Fotomicrografias de tecidos neoplásicos caninos submetidos à reação de imunohistoquímica, empregando o anticorpo anti-GSTpi. (A) Tumor venéreo transmissível, mostrando marcações citoplasmáticas granulares e nucleares, de coloração castanha e intensidade forte (x400). (B) Linfoma B, com marcações citoplasmáticas granulares, de coloração castanha e intensidade moderada (x400). (C) Mastocitoma grau I, observam-se marcações citoplasmáticas granulares e nucleares de coloração castanhas e intensidade forte (x400). (D) Mastocitoma grau III, observam-se marcações citoplasmáticas granulares e nucleares das células neoplásicas e das paredes dos vasos (setas) de coloração castanha e intensidade moderada (x400). (E) Carcinoma mamário, onde se nota marcações citoplasmáticas granulares e nucleares das células tumorais e dos fibroblastos (x400). (F) Carcinoma mamário, notam-se marcações citoplasmáticas granulares de coloração castanha e intensidade forte nas células do infiltrado inflamatório mononuclear (x400). Método ABC. Contracoloração pela Hematoxilina de Harris. Imagem captada por equipamento digital Sony® DSC-W70 acoplado a microscópio triocular Nikon® Eclipse E200. Jaboticabal, SP, 2008.**

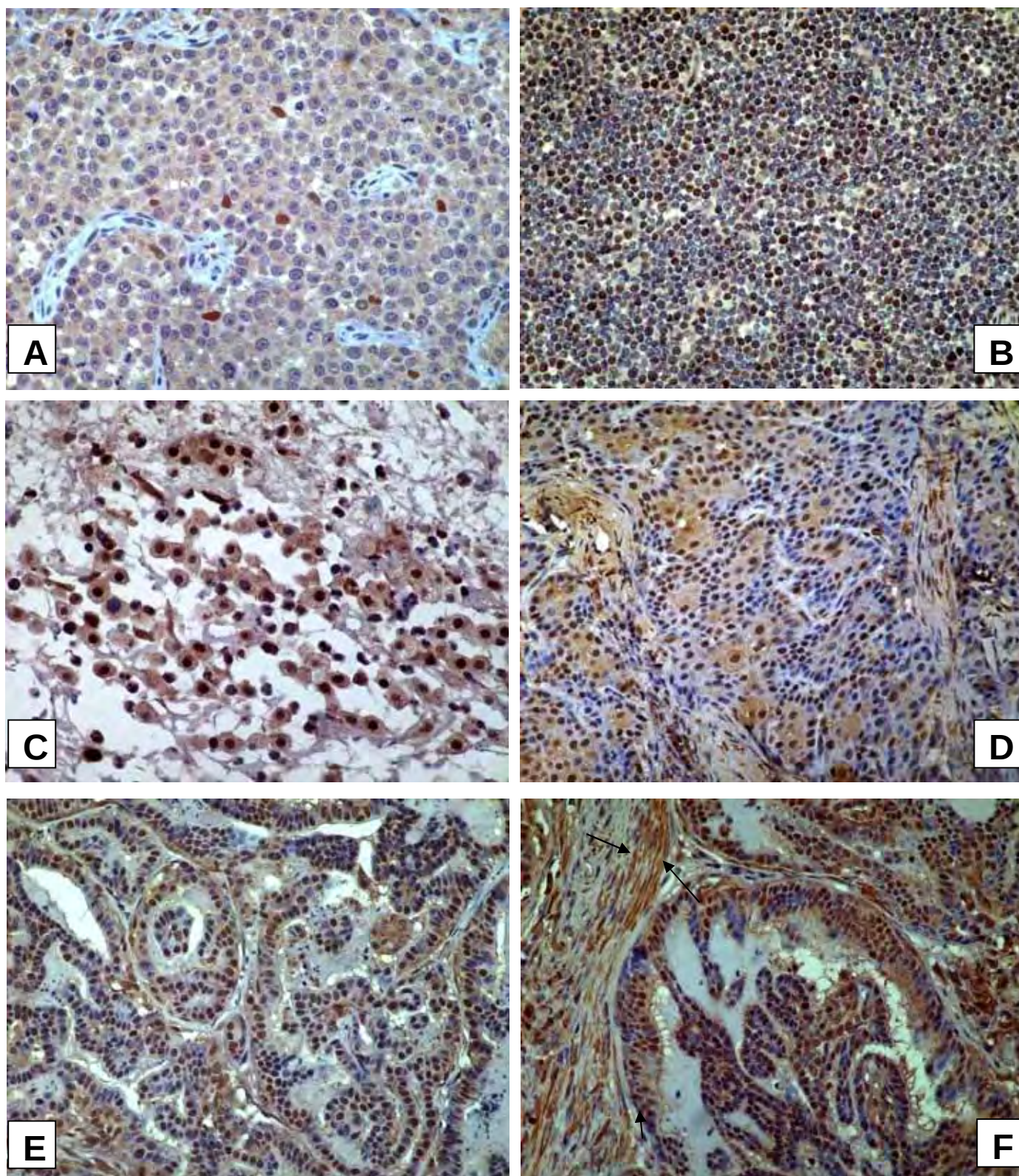


Figura 9. Ver legenda na página seguinte

**Figura 9. Fotomicrografias de tecidos neoplásicos caninos submetidos à reação de imunohistoquímica, empregando o anticorpo anti-p53. (A) Tumor venéreo transmissível, observam-se marcações nucleares de coloração castanha e intensidade forte e discreta marcação citoplasmática das células neoplásicas (x800). (B) Linfoma B, observam-se marcações nucleares de coloração castanha e intensidade forte (x400). (C e D) Mastocitoma grau I e carcinoma de glândula hepatóide respectivamente, notam-se marcações nucleares de coloração castanhas e intensidade forte e discreta marcação citoplasmática (x400). (E) Carcinoma mamário, onde se nota marcações nucleares de coloração castanhas e intensidade forte e marcações citoplasmáticas discretas(x400). (F) Carcinoma mamário, notam-se marcações nucleares de coloração castanha e intensidade forte e discreta marcação citoplasmática das células neoplásicas e mioepiteliais (setas) (x400). Método ABC. Contracoloração pela Hematoxilina de Harris. Imagem captada por equipamento digital Sony® DSC-W70 acoplado a microscópio triocular Nikon® Eclipse E200. Jaboticabal, SP, 2008.**

#### **4.3- Co-expressão da MRP1, GSTpi e p53**

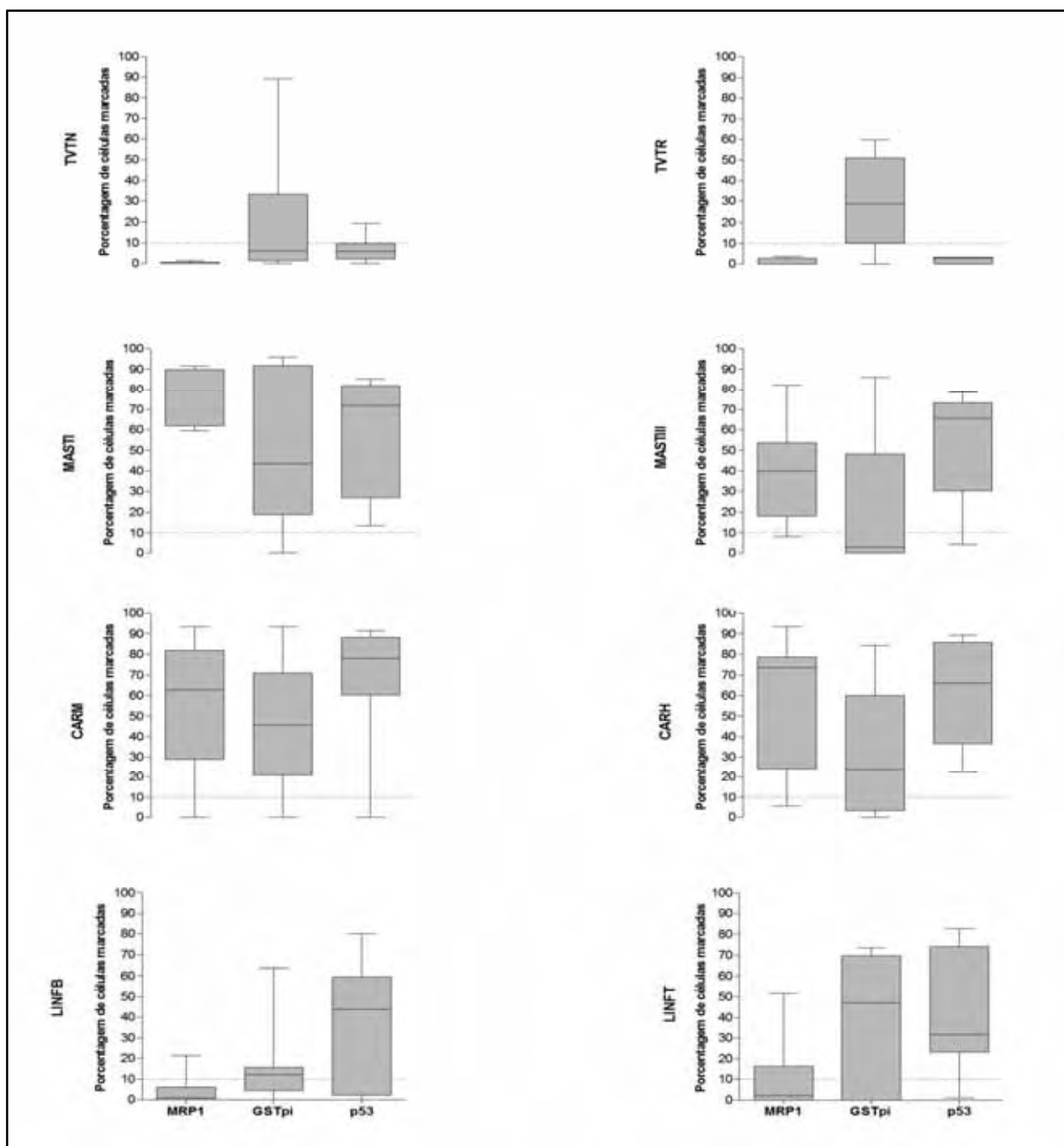
Comparando-se o número de espécimes positivos para os três marcadores nos grupos experimentais, observou-se que este foi maior para GSTpi em relação aos demais no TVTC (57,1%). Nos grupos CAR (95,4%) e LINF (68,7%) um maior número de espécimes expressaram a p53, enquanto que no grupo MAST (93,7%) houve um número igual de espécimes positivos para a p53 e MRP1 (Tabela 4).

Em outra análise, buscou-se verificar se houve co-expressão dos três marcadores nos espécimes neoplásicos, em cada grupo experimental. Dessa forma, observou-se que o grupo CAR foi o que mostrou o maior número de espécimes que co-expressaram MRP1, GSTpi e p53 (68,1%), seguidos do MAST (56,2%) e do LINF (18,7%). Não houve co-expressão dos três marcadores no grupo TVTC (Tabela 4).

Ao avaliar a co-expressão dos marcadores aos pares, observou-se que nos grupos MAST, CAR e LINF houve co-expressão da MRP1 e p53 em 87,5%, 86,4% e 18,7% dos espécimes, respectivamente. Já a co-expressão da GSTpi e da p53 pôde ser observada em 7,1% dos espécimes do TVTC, 56,2% do MAST, 72,7% do CAR e 50% do LINF. A co-expressão da MRP1 e da GSTpi ocorreu em 56,2% do MAST, 68,1% do CAR e 18,7% do LINF. No entanto, a co-expressão da MRP1 e GSTpi sempre foi coincidente com a p53.

#### **4.4- Porcentagem de células neoplásicas marcadas**

Os valores mínimos e máximos, medianas e dos interquartis das PCNM, pelos anticorpos em cada subgrupo estão demonstrados na figura 10.



**Figura 10 – Representação gráfica das porcentagens mínimas e máximas de células neoplásicas marcadas nos subgrupos experimentais com os anticorpos anti-GSTpi, MRP1 e p53. As linhas horizontais continuas representam os valores das medianas. As caixas representam os intervalos interquartis (25º ao 75º percentil). As hastes representam os valores mínimos e máximos das porcentagens de células neoplásicas marcadas. A linha horizontal tracejada representa o limite para considerar a expressão positiva para determinado marcador. Jaboticabal, SP, 2008.**

O teste de Spearman mostrou correlação positiva na PCNM apenas entre a GSTpi e a MRP1 no subgrupo LINFT ( $r=0,8846$ ,  $P=0,0123$ ) (Figura 11), sugerindo que a PCNM para ambos os marcadores tendem a aumentar conjuntamente. Nenhuma correlação foi observada entre os demais subgrupos.

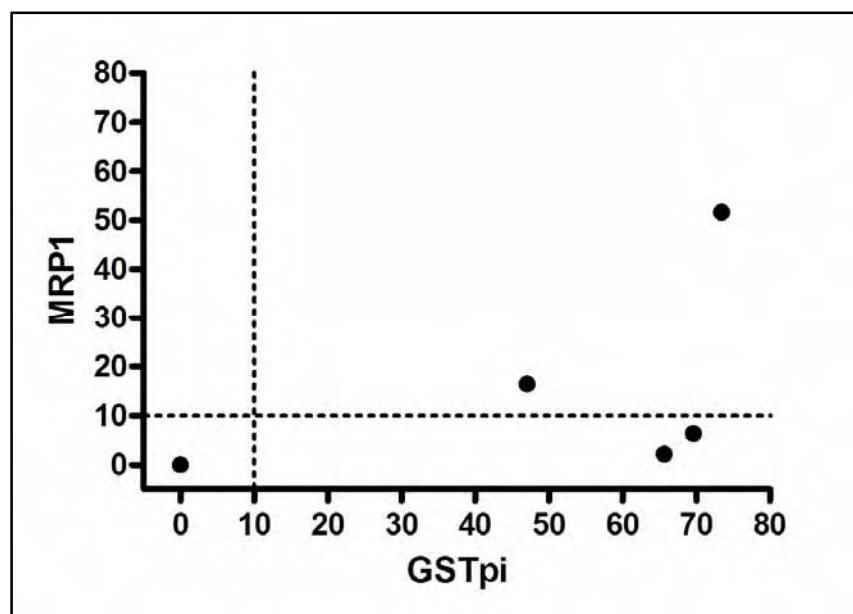


Figura 11. Representação gráfica da análise de correlação entre as PCNM para a MRP1 e GSTpi no subgrupo LINFT ( $P=0,0123$ ). As linhas tracejadas horizontal e vertical representam o limite para considerar a expressão positiva.

## 5- DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho que avaliou conjuntamente as expressões das proteínas MRP1 e p53 e da enzima GSTpi por imunoistoquímica em espécimes caninos de TVTs (de ocorrência natural e refratários à quimioterapia), de mastocitomas (grau I e III), de carcimomas (de glândulas mamária e hepatóide) e de linfomas (de células B e T). Anteriormente alguns marcadores de resistência à múltiplas drogas, como a p53 (GINN et al., 2000; JAFFE et al., 2000; SUEIRO et al., 2004), gp-P (MIYOSHI et al., 2002; GERARDI, 2005; LEE et al., 2007), MRP1 (MIYOSHI et al., 2002; LEE et al., 2007) e GSTpi (ROCHA et al., 2000) já haviam sido identificados em neoplasias caninas.

A imunoisquímica é uma técnica relativamente barata e simples que pode ser utilizada em tecidos congelados e parafinados, o que torna possível a realização de estudos retrospectivos com materiais arquivados (TÓTH et al., 1994; BERGMAN & OGILVIE, 1995). Entretanto, a maioria dos anticorpos disponíveis comercialmente foi desenvolvida contra imunógenos específicos humanos e murinos e por essa razão, alguns podem não apresentar reatividade cruzada interespécies (KELLER et al., 2007).

Os três anticorpos empregados no presente estudo foram comercialmente desenvolvidos contra antígenos específicos humanos. Dentre eles, o anticorpo policlonal anti-p53, clone CM1 (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, UK) já havia sido testado e com êxito em tecidos neoplásicos caninos (SUEIRO et al., 2004; De NARDI, 2007; MORO et al., 2004). Além disso, sua reatividade cruzada com tecidos caninos foi comprovada por Keller et al. (2007). Até o momento, trabalhos mostrando especificidade cruzada dos anticorpos anti-MRP1 (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, UK) e anti-GSTpi (Labvision Corporation, Fremont CA, USA), como os empregados nesse estudo, em tecidos caninos, não foram realizados. Todavia, trabalhos anteriores utilizando diferentes clones comerciais destes anticorpos tiveram sucesso em marcar as respectivas proteína (MIYOSHI et al., 2002; LEE et al., 2007) e enzima (ROCHA et al., 2000) em tecidos neoplásicos caninos. Adicionalmente, a utilização de controles humanos e caninos no presente estudo permitiu comparar e estabelecer o padrão de marcação para cada anticorpo nas duas espécies.

A marcação citoplasmática observada para o anticorpo anti-MRP1 foi semelhante à descrita em estudos anteriores envolvendo tumores humanos e caninos (FUKUSHIMA et al., 1999; MIYOSHI et al., 2002; KAMATA et al., 2008). No entanto, outros pesquisadores, documentaram marcação da membrana plasmática além desta (LARKIN et al., 2004; CALATOZZOLO et al., 2005; FILIPITS et al., 2005). Adicionalmente, no nosso estudo foi observado que a marcação citoplasmática apresentava um aspecto granular, característica também descrita por Larkin et al. (2004) e Calatozzolo et al. (2005). Pesquisadores sugerem que a MRP1 se acumule em vesículas citoplasmáticas (LOE et al., 1996; RENES et al., 2000; RAJAGOPAL & SIMON, 2003) e esta distribuição poderia, de certo modo explicar o aspecto granular da marcação citoplasmática identificada em nosso estudo.

A reatividade da MRP1, nos subgrupos experimentais, não pode ser associada a fatores habitualmente relacionados com pior prognóstico, como gradação histológica (mastocitomas), resistência clínica à quimioterapia (TVT) e ao imunofenótipo (linfomas). Expressões significativas da MRP1 seriam esperadas nos mastocitomas grau III, TVTs refratários a quimioterapia e linfomas de células T, fato que não ocorreu.

Miyoshi et al. (2002) não observaram positividade nos mastocitomas caninos grau III empregando o mesmo anticorpo, e assim como no presente estudo, não verificaram associação significativa entre o número de casos positivos e a gradação histológica.

Em tumores humanos, a expressão da MRP1 tem cada vez mais sido associada a um pior prognóstico (NOOTER et al., 1997; SULLIVAN et al., 1998; RUDAS et al., 2003; BERGER et al., 2005; FILIPITS et al., 2005; OHSAWA et al., 2005). Associação semelhante foi também encontrada por Rezende (2005), em linfomas caninos recidivantes, quando comparadas às expressões no momento do diagnóstico, empregando a RT-PCR e o "DOT blot", técnicas distintas da utilizada no estudo em tela.

A marcação citoplasmática e nuclear da GSTpi observada nos espécimes tumorais seguiu o mesmo padrão descrito para tecidos neoplásicos humanos (ALI-OSMAN et al., 1997; CALATOLOZZO et al., 2004; HOWELLS et al., 2004; SOH et al., 2005). Entre os humanos, esse padrão de marcação tem sido relacionado ao prognóstico (ALI-OSMAN, et al., 1997; HOWELLS et al., 2004; SOH et al., 2005), embora sujeito a controvérsias. Enquanto dois estudos relacionaram a expressão

concomitante nuclear e citoplasmática da GSTpi ao menor tempo de sobrevida do paciente e resistência a quimioterapia (ALI-OSMAN et al., 1997; SOH et al., 2005), outro associou o mesmo padrão de marcação da enzima a características mais favoráveis (HOWELLS et al., 2004).

No presente estudo, a marcação concomitante do citoplasma e do núcleo foi observada nos subgrupos TVT, MASTI, CARM, CARH e LINFT. No entanto estudos futuros são necessários para correlacionar a localização da GSTpi com o prognóstico em neoplasias caninas.

Não se levando em consideração o padrão de marcação, a expressão da GSTpi em tumores humanos tem sido associada a pior prognóstico, caracterizado por menor tempo de sobrevida e resistência a quimioterápicos (SHIGA et al., 1999; HUANG et al., 2003; RIBRAG et al., 2003; ARAI et al., 2008). Em cães, embora as concentrações da GST, pareçam ser maiores nos tecidos neoplásicos do que nos tecidos normais (KUMARAGURUPARAN et al., 2006a), embora no realizado por Rocha et al. (2000) essa associação não pôde ser estabelecida. Contudo, deve-se levar em consideração os poucos tipos neoplásicos pesquisados e o número limitado de estudos envolvendo a expressão da GSTpi em neoplasias caninas.

Conforme descrito pelo fabricante do anticorpo policlonal coelho anti-humano clone CM1 (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, UK), o padrão de marcação da proteína p53 é nuclear. Porém estudos empregando este mesmo clone em neoplasias humanas identificaram marcação nuclear, associada ou não à citoplasmática (SUN et al., 1992; BOSARI et al., 1994; ZHANG, 1999). Interessante salientar que pesquisas apontaram o padrão citoplasmático relacionado a um pior prognóstico em tumores colorretais humanos (SUN et al., 1992; BOSARI et al., 1994; FLAMINI et al., 1996). Em cães, a marcação citoplasmática foi relatada em neoplasias mamárias (INOUE & SHIRAMIZU, 1999; HAGA et al., 2001; De NARDI, 2007), intestinais (GAMBLIN et al., 1997; WOLF et al., 1997) e ósseas (LOUKOPOULOS et al., 2003) empregando anticorpos mono e policlonais anti-p53. Todavia, Keller et al. (2007) consideraram inespecíficas as marcações citoplasmáticas observadas com o anticorpo CM1 em linfomas, osteossarcomas e carcinomas mamários caninos.

No presente estudo, pôde-se notar padrões de marcação nuclear, nuclear e citoplasmática ou somente citoplasmática empregando o clone CM1. Estes dois últimos foram encontrados principalmente nos TVTs, mastocitomas e carcinomas mamários e de glândula hepatóide. No entanto, devido às controvérsias a respeito dos padrões de marcação, neste estudo somente foram consideradas positivas as células neoplásicas com o núcleo marcado. As possíveis teorias para explicar o acúmulo citoplasmático incluem: formação de complexo entre a p53 mutante e a proteína de choque térmico citoplasmática hsp72/73 (PURDIE et al., 1991), ligação da p53 selvagem à proteína mdm2 (TOMINAGA et al., 1993) e inativação da p53 por meio da exclusão nuclear (BOSARI et al., 1995). Também, Haga et al. (2001) sugerem que apenas a porção C-terminal da proteína esteja presente no citoplasma.

Nos mastocitomas, a porcentagem de espécimes positivos encontrados neste estudo foi proporcionalmente superior ao detectado por Ginn et al. (2000) e Wu et al. (2006). Tal como nesses estudos, os referidos autores empregaram um anticorpo policlonal e consideraram positivos os espécimes com porcentagem de células marcadas superiores a 10%. Também, a PCNM encontrada em nosso estudo foi superior à detectada por Jaffe et al. (2000), empregando o mesmo anticorpo e método.

O maior número de espécimes positivos e da PCNM no presente estudo, comparado com os anteriormente citados poderia ser explicado por algumas variações no protocolo imunoistoquímico, como o método de fixação, diluição do anticorpo primário e método de recuperação antigênica empregado.

Adicionalmente no presente estudo, a expressão da p53 foi detectada nos mastocitomas de grau I e III, sem significância entre o número de espécimes positivos e a gradação histológica, concordante com Ginn et al. (2000) e Wu et al. (2006). Segundo Patnaik et al. (1984), nesses tumores, a gradação histológica tem sido o método rotineiramente empregado por patologistas para se determinar o prognóstico. Entretanto, é de consenso que este método é subjetivo (PINCZOWSKI et al., 2008). No presente estudo e nos realizados por Ginn et al. (2000) e Wu et al. (2006) a relação entre o grau histológico e a expressão da p53 não pôde ser identificada. Isto poderia sugerir que a expressão da p53 não está associada à gradação histológica. Contudo, a relação entre a gradação histológica e o prognóstico nem sempre ocorre (PINCZOWSKI et al., 2008).

Nos carcinomas mamários observou-se grande número de espécimes positivos para a p53, semelhante aos resultados De Nardi (2007), que encontrou expressão positiva em 100% dos espécimes, empregando o mesmo anticorpo policlonal. Contudo, outros estudos documentaram uma porcentagem menor utilizando anticorpos monoclonais e diferentes tipos histológicos de tumores mamários (INOUE & SHIRAMIZU, 1999; HAGA et al., 2001; LEE et al., 2004). Isso pode indicar que o anticorpo policlonal favoreceria a reatividade com um maior número de epítomos, enquanto que o anticorpo monoclonal a um epítipo específico, que pode não estar presente naquele tecido canino. Experiência anterior do nosso grupo de pesquisa confirma que alguns espécimes caninos não reagiram com anticorpo monoclonal anti-p53 (clone DO-7, Cod. NCL-p53-DO-7 Novocastra Laboratories, Ltd, Newcastle, UK), fato também documentado por Keller et al. (2007). Além disso, é possível que a expressão da p53 varie de acordo com o tipo histológico do tumor mamário.

No presente estudo a expressão da p53 foi detectada em todos os espécimes de carcinomas de glândulas hepatóides e 75% deles apresentaram mais de 36,75% de células neoplásicas marcadas. Contrariamente, estudo anterior não detectou expressão da p53 e sugeriu que a mutação dessa proteína fosse menos comum nessas neoplasias (NAKANO et al., 2005).

No presente estudo a expressão da p53 nos linfomas foi semelhante à observada por Sueiro et al. (2004), ambos mostrando uma tendência a maior expressão nos linfomas T, embora não significativa. Sokolowska et al. (2005) encontraram uma significância entre os dois imunofenótipos, embora a porcentagem de células neoplásicas marcadas para a p53 não tenha ultrapassado 5% em todos os espécimes. Semelhante ao documentado por esses autores, em humanos, Korkolopoulou et al. (1994) encontraram expressão significativamente maior da p53 em linfomas de células T do que nos de células B. A expressão da p53 em linfomas parece estar relacionada a um desenvolvimento desfavorável, uma vez que os linfomas de célula T apresentam menor sobrevida e maior taxa de mortalidade (GREENLEE et al., 1990; TESKE et al., 1994). Raciocínio semelhante poderia ser feito com o grupo TVTC, no qual se esperaria maior expressão da p53 no subgrupo TVTR. Todavia, o grupo do TVTC foi o que apresentou a menor reatividade a esse anticorpo. Em outro estudo realizado por nosso

grupo de pesquisa foi verificada maior expressão da p53 nos TVTs transplantados em fase de regressão (MORO et al., dados em publicação). Concordante com esse achado Santos et al. (2008) também documentaram maior expressão da p53 nos TVTs em fase de regressão, quando comparado à fase de progressão. Esses autores descrevem relação direta entre a expressão da p53 e o índice apoptótico presente nesta fase. Sugerem ainda que a expressão da p53 no TVT canino possa corresponder ao tipo selvagem da proteína. Isto posto, é possível que a p53, ao menos no TVT, não seja um marcador adequado de resistência à quimioterapia. Mais recentemente, Lo et al. (2008) mostraram em linhagens celulares neoplásicas humanas que o tipo selvagem da p53 regula a expressão do gene *GST* e protege o genoma de compostos alquilantes e geradores de radicais livres.

A RMD, particularmente à quimioterapia é aparentemente multifatorial e heterogênea. A heterogeneidade da expressão dos marcadores relacionados aos mecanismos de RMD pode ser verificada em diferentes tipos histológicos, localizações e em um mesmo espécime tumoral. Além disso, muitos dos marcadores relacionados a esses mecanismos que podem causar resistência são, em alguma extensão, inter-relacionados, enquanto outros são independentes, podendo co-existirem em uma mesma célula neoplásica (LEHNERT, 1996).

A MRP1, a GSTpi e a p53 foram expressas em quase todos os grupos experimentais, com exceção do grupo TVTC que não expressou a MRP1. Os resultados expostos na tabela 4 mostraram que dentre os tipos histológicos tumorais estudados, o número de espécimes positivos para os três marcadores foi heterogêneo, assim como o número de espécimes positivos dentro do mesmo tipo histológico tumoral. Isto sugere que à semelhança do descrito em neoplasias humanas, a RMD em tumores caninos também possa variar de acordo com o tipo histológico tumoral e com o marcador empregado.

A identificação da MRP1 como importante bomba de efluxo de conjugados glutatiônicos eleva a possibilidade de que a MRP1 e a GST possam agir em sinergismo na resistência celular a alguns quimioterápicos (MORROW et al., 1998). Correlação positiva entre esses mesmos marcadores também foi identificada quando se avaliou a PCNM no subgrupo LINFT neste estudo.

Por sua vez, a p53 mutante promove a expressão do gene *MRP1* (WANG & BECK, 1998; SULLIVAN et al., 2000; HAIT & YANG, 2006). A expressão simultânea e coordenada de dois ou mais marcadores foi mostrada em linhagens celulares e em tecidos neoplásicos humanos (MORROW et al., 1998; WANG & BECK, 1998; SULLIVAN et al., 2000; QIAN et al., 2001; PEKLAK-SCOTT et al., 2005).

Até o momento, não foram realizados outros estudos envolvendo a co-expressão dos marcadores *MRP1*, *GSTpi* e *p53* em neoplasias caninas. No presente estudo, a co-expressão dos três marcadores foi observada em quase 40% dos espécimes neoplásicos. Dentre eles, os carcinomas (68,1%) e os mastocitomas (56,2%) foram os que apresentaram maior frequência de co-expressão, seguidos dos linfomas (17,1%). Não houve co-expressão dos três marcadores no grupo dos TVTs. Talvez a frequência de co-expressão desses marcadores no momento do diagnóstico nos mastocitomas e carcinomas seja responsável pela pior resposta à quimioterapia desses tumores (FOX, 1998; MORRISON, 1998a) quando comparados aos TVTs e aos linfomas, os quais geralmente respondem bem ao tratamento quimioterápico inicial (MORRISON, 1998b; VONDERHAAR & MORRISON, 1998).

Isto poderia sugerir que a expressão concomitante dos três marcadores está inter-relacionada e atuando em sinergismo em determinados tipos histológicos tumorais. No entanto, isto não pôde ser observado em todos os grupos experimentais, uma vez que em determinados grupos não houve co-expressão dos marcadores, como no grupo dos TVTs, e em outros, a expressão simultânea de dois marcadores pareceu ser mais significativa que a dos três concomitantemente, como nos casos dos mastocitomas e carcinomas para a *MRP1* e *p53* e dos linfomas para a *GSTpi* e *p53* (Tabela 4).

O presente estudo mostrou que a maioria dos tecidos neoplásicos caninos estudados expressa ou co-expressa a *MRP1*, *GSTpi* e *p53*, no entanto, deve-se futuramente avaliar se a expressão destas isoladamente ou em associação implicaria no desenvolvimento da resistência clínica a quimioterapia, ou ainda, se poderiam ser úteis como marcadores preditivos de prognóstico.

## 6- CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- A expressão da MRP1, GSTpi e p53 isoladas ou associadas pôde ser observada em todos os grupos experimentais, exceto o grupo TVTC que não expressou a MRP1.
- A localização da marcação nas células tumorais foi citoplasmática para MRP1 e nuclear e/ou citoplasmática para a GSTpi e p53.
- Não foi possível observar diferença na expressão dos marcadores de resistência a quimioterapia em relação à resistência a quimioterapia (TVT e TVTR), gradação histológica (MASTI e MASTIII) e imunofenótipo (LINFB e LINFT).
- Há relação direta entre o aumento da expressão da MRP1 e da GSTpi nos linfomas T.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>

ÁGUILA, J. F.; RAMOS, O.C.; ÁLVAREZ, I.V.; VÁZQUEZ, R.P. Resistencia a drogas mediada por la glicoproteína P. **Revista Cubana de Oncologia**, v.14, n.2, p.111-120, 1998.

ALEXANDROVA, R. Multidrug resistance and P-glycoprotein. **Experimental Pathology and Parasitology**, v.1, p.62-66, 1998.

ALI-OSMAN, F.; BRUNNER, J.M.; KUTLUK, T.M.; HESS, K. Prognostic significance of glutathione S-transferase  $\pi$  expression and subcellular localization in human gliomas. **Clinical Cancer Research**, v.3, p.2253-2261, 1997.

ALIYA, S.; REDDANNA, P.; THYAGARAJU, K. Does glutathione S-transferase Pi (GST-Pi) a marker protein for cancer? **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.253, p.319-327, 2003.

ARAI, T.; MIYOSHI, Y.; KIM, S.J.; AKAZAWA, K; MARUYAMA, N.; TAGUCHI, T.; TAMAKI, Y.; NOGUCHI, S. Association of GSTP1 expression with resistance to docetaxel and paclitaxel in human breast cancers. **The Journal of Cancer Surgery**, v.34, p.734-738, 2008.

ARCECI, R.J.; STIEGLITZ, K.; BRAS, J.; SCHNKE, A.; BAAS, F.; CROOP, J. Monoclonal antibody to an external epitope of the human *mdr1* P-glycoprotein. **Cancer Research**, v.53, p.310-317, 1993.

BECK, W.T.; GROGAN, T.M.; WILLMAN, C.L.; CORDON-CARDO, C.; PARHAM, D.M.; KUTTESCH, J.F.; ANDREEFF, M.; BATES, S.E.; BERARD, C.W.; BOYETT, J.M.; BROPHY, N.A.; BROXTERMAN, H.J.; CHAN, H.S.; DALTON, W.S.; DIETEL, M.; FOJO, A.T.; GASCOYNE, R.D.; HEAD, D.; HOUGHTON, P.J.; SRIVASTAVA, D.K.; LEHNERT,

---

<sup>1</sup> ABNT – Normas de referências, 2003.

M.; LEITH, C.P.; PAIETTA, E.; PAVELIC, Z.P.; WEINSTEIN, R. Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients' tumors: consensus recommendations. **Cancer Research**, v.56, n.13, p. 3010-3020, 1996.

BENTUBO, H.D.L.; TOMAZ, T.A.; BONDAN, E.F.; LALLO, M.A. Expectativa de vida e causas de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil). **Ciência Rural**, v.37, n.4, p.1021-1026, 2007.

BERGER, W.; SETINEK, U.; HOLLAUS, P.; ZIDEK, T.; STEINER, E.; ELBLING, L.; CANTONATI, H.; ATTEMS, J.; GSUR, A.; MICKSCHE, M. Multidrug resistance markers P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, and lung resistance protein in non-small cell lung cancer: prognostic implications. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 131, p.355 – 363, 2005.

BERGMAN, P.J. Mechanisms of anticancer drug resistance. In: KITCHELL, B.E. **The Veterinary Clinics of the North America - Small Animal Practice**, v.33, n.3, p.651-667, 2003.

BERGMAN, P.J.; OGILVIE, G.K. Drug resistance and cancer therapy. **The Compendium**, v.17, n.4, p. 549-558, 1995.

BORST, P.; EVERS, R.; KOOL, M.; WIJINHOLDS, J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. **Journal of the National Cancer Institute**, v.92, p.1295-1302, 2000.

BOSARI, S.; VIALE, G.; BOSSI, P.; MAGGIONI, M.; COGGI, G.; MURRAY, J.J.; LEE, A.K. Cytoplasmic accumulation of p53 protein: an independent prognostic indicator in colorectal adenocarcinomas. **Journal of the National Cancer Institute**, v.86, n.9, p. 681-687, 1994.

BOUMENDJEL, A.; BAUBICHON-CORTAY, H.; TROMPIER, D.; PERROTON, T.; DI PIETRO, A. Anticancer multidrug resistance mediated by MRP1: recent advances in the discovery of reversal agents. **Medicinal Research Reviews**, v.25, n.4, p. 453-472, 2005.

CALATOZZOLO, C.; GELATI, M.; CIUSANI, E.; SCIACCA, F.L.; POLLO, B.; CAJOLA, L.; MARRAS, C.; SILVANI, A.; VITELLARO-ZUCCARELLO, L.; CROCI, D.; BOIARDI, A.; SALMAGGI, A. Expression of drug resistance proteins Pgp, MRP1, MRP3, MRP5 and GST-pi in human glioma. **Journal of Neuro-oncology**, v.74, n.2, p.113-121, 2005.

CHEN, Y.Q.; CIPRIANO, S.C.; ARENKIEL, J.M.; MILLER, F.R. Tumor suppression by p21WAF1. **Cancer Research**, v.55, p.4536-4539, 1995.

CHOI, Y.K.; KIM, C.J. Sequence analysis of canine LINE-1 elements and p 53 gene in canine transmissible venereal tumor. **Journal of Veterinary Science**, v.3, n.4, p.285-292, 2002.

CHUMAKOV, P.M. Function of the p53 gene: choice between life and death. **Biochemistry**, v.65, n.1, p.28-40, 2000.

CHUNG-HO, L.; OH-KYEONG, K. Mutations of p53 tumor suppressor gene in spontaneous canine mammary tumors. **Journal of Veterinary Science**, v.3, n.4, p.321-325, 2002.

COLE, S.P.; BHARDWAJ, G.; GERLACH, J.H.; MACKIE, J.E.; GRANT, C.E.; ALMQUIST, K.C.; STEWART, A.J.; KURZ, E.U.; DUNCAN, A.M.; DEELEY, R.G. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. **Science**, v.258, p. 1650-1654, 1992.

CONRAD, S.; VIERTELHAUS, A.; ORZECOWSKI, A.; HOOGSTRAATE, J.; GJELLAN, K.; SCHRENK, D.; KAUFFMANN, H.M. Sequencing and tissue distribution of the canine MRP2 gene compared with MRP1 and MDR1. **Toxicology**, v.156, p.81-91, 2001.

De NARDI, A.B. **Correlação da ciclooxigenase-2 com Ki-67, P53 e Caspase-3 nas neoplasias de mama em cadelas.** Jaboticabal, 2007. 110f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade do Estado de São Paulo.

De NARDI, A.B.; RODASKI, S.; SOUSA, R.S.; COSTA, T.A.; MACEDO, T.R.; RODIGHIERI, S.M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C.H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v.7, n.2, p. 15-26, 2002.

DEELEY, R.G.; COLE, S.P.C. Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v.580, p. 1103-1111, 2006.

DEELEY, R.G.; WESTLAKE, C.; COLE, S.P.C. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. **Physiological Reviews**, v. 86, p.849-899, 2006.

DEVILLE, P.; VAN LEEUMEN, I.S.; VOESTEN, A.; RUTTERMAN, G.R.; VOS, J.H.; CORNELISSE, C.J. The canine p53 gene is subject to somatic mutations in thyroid carcinoma. **Anticancer Research**, v.14, p.2039-2046, 1994.

Di PIETRO, A.; DAYAN, G.; CONSEIL, G.; STEINFELS, E.; KRELL, T.; TROMPIER, D.; BAUBICHON-CORTAY, H.; JAULT, J.M. P-glycoprotein-mediated resistance to chemotherapy in cancer cells: using recombinant cytosolic domains to establish structure-function relationships. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, n. 8, p. 925-939, 1999.

EVERS, R.; ZAMAN, G.J.; VAN DEEMTER, L.; JANSEN, H.; CALAFAT, J.; OOMEN, L.C.; OUDE ELFERINK, R.P.; BORST, P.; SCHINKEL, A.H. Basolateral localization and

export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig kidney cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v.97, p.1211–1218, 1996.

FILIPITS, M.; POHL, G.; RUDAS, M.; DIETZE, O.; LAX, S.; GRILL, R.; PIRKER, R.; ZIELINSKI, C.C; HAUSMANINGER, H.; KUBISTA, E.; SAMONIGG, H.; JAKESZ, R. Clinical role of multidrug resistance protein 1 expression in chemotherapy resistance in early-stage breast cancer: the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. **Journal of Clinical Oncology**, v.23, n.6, p.1161-1168, 2005.

FLAMINI, G.; CURIGLIANO, G.; RATTO, C.; ASTONE, A.; FERRETTI, G.; NUCERA, P.; SOFO, L.; SGAMBATO, A.; BONINSEGNA, A.; CRUCITTI, F.; CITTADINI, A. Prognostic significance of cytoplasmic p53 overexpression in colorectal cancer. An immunohistochemical analysis. **European Journal of Cancer**, v.32A, n.5, p.802-806, 1996.

FLENS, M.J.; IZQUIERDO, M.A.; SCHEFFER, G.L.; FRITZ, J.M.; MEIJER, C.J.; SCHEPER, R.J.; ZAMAN, G.J. Immunochemical detection of the multidrug resistance-associated protein MRP in human multidrug resistant tumor cells by monoclonal antibodies. **Cancer Research**, v.54, p.4557–4563, 1994.

FOJO, T.; BATES, S. Strategies for reversing drug resistance. **Oncogene**, v.22, n.47, p.7512-7523, 2003.

FOX, L.E. Mast cell tumors. In: MORRISON, W.B. **Cancer in dogs and cats: medical and surgical management**. 1 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998, p.477-488.

FRANEKOVA, M.; HALASOVA, E.; BUKOVSKA, E.; LUPTAK, J.; DOBROTA, D. Gene polymorphisms in bladder cancer. **Urologic Oncology**, v.26, p.1-8, 2008.

FUKUSHIMA, Y.; OSHIKA, Y.; TOKUNAGA, T.; HATANAKA, H.; TOMISAWA, M.; KAWAI, K.; OZEKI, Y.; TSUCHIDA, T.; KIJIMA, H.; UHEYAMA, Y.; TAMAOKI, N.; MIURA,

S.; NAKAMURA, M. Multidrug resistance-associated protein (MRP) expression is correlated with expression of aberrant p53 protein in colorectal cancer. **European Journal of Cancer**, v.35, p.935–938, 1999.

GAMBLIN, R.M.; SAGARTZ, J.E.; COUTO, C.G. Overexpression of p53 tumor supressor protein in spontaneously arising neoplasms of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.58, p.857-863, 1997.

GERARDI, D.G. **Reatividade à glicoproteína-P pelos anticorpos C219 e C494 em tecidos neoplásicos de cães**. Jaboticabal, 2005. 56f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade do Estado de São Paulo.

GERMANN, U.A. P-glycoprotein - a mediator of multidrug resistance in tumor cells. **European Journal of Cancer**, v.32A, n.6, p.927-944, 1996.

GINN, P.E. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in formalin-fixed and paraffin-embedded normal and neoplastic canine tissues. **Veterinary Pathology**, v.33, p.533-541, 1996.

GINN, P.E.; FOX, L.E.; BROWER, J.C.; GASKIN, A.; KURZMAN, I.D., KUBILIS, P.S. Immunohistochemical detection of p53 tumor-suppressor protein is a poor indicator of prognosis for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v.37, p.33-39, 2000.

GOMI, A.; SHINODA, S.; MASUZAWA, T.; ISHIKAWA, T.; KUO, M.T. Transient induction of the *MRP/GS-X* pump and gamma-glutamylcysteine synthase by 1-(4-amino-2-methyl-5-pyridinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea in human glioma cells. **Cancer Research**, v.57, p.5292–5299, 1997.

GOTTESMAN, M.M.; FOJO, T.; BATES, S.E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nature Reviews Cancer**, v.2, n.1, p.48-58, 2002.

GOTTLIEB, T.M.; OREN, M. p53 in growth control and neoplasia. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1287, p.7-102, 1996.

GREEN, D.R.; CHIPUK, J.E. p53 and metabolism: inside the TIGAR. **Cell**, v.126, n.1, p.30-32, 2006.

GREENLEE, P.G.; FILIPPA, D.A.; QUIMBY, F.W.; PATNAIK, A.K.; CALVANO, S.E.; MATUS, R.E.; KIMMEL, M.; HURVITZ, A.I.; LIEBERMAN, P.H. Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic, and clinical study. **Cancer**, v.66, n.3, p. 480-490, 1990.

GRZYWACZ, M. J.; YANG, J. M.; HAIT, W. N. Effect of the multidrug resistance protein on the transport of the antiandrogen flutamide. **Cancer Research**, v.63, p.2492 – 2498, 2003.

HAGA, S.; NAKAYAMA, M.; TATSUMI, K.; MAEDA, M.; SHUNSUKE, I.; UMESAKO, S.; YAMAMOTO, H.; HILGERS, J.; SARKAR, N.H. Overexpression of the p53 gene product in canine mammary tumors. **Oncology Reports**, v.8, p.1215-1219, 2001.

HAIT, W.N.; YANG, J.M. The individualization of cancer therapy: the unexpected role of P53. **Transactions of the American clinical and climatological association**, v.117, p.85-101, 2006.

HARMS, K.; NOZELL, S.; CHEN, X. The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.61, p.822-842, 2004.

HARRIS, C.; HOLLSTEIN, M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. **The New England Journal of Medicine**, v.329, n.18, p.1318-1327, 1993.

HARRIS, S.L.; LEVINE, A.J. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. **Oncogene**, v.24, n.17, p.2899-2908, 2005.

HARRISON, D.J. Molecular mechanisms of drug resistance in tumours. **Journal of Pathology**. v.175, p. 7-12, 1995.

HICKMAN, J.A. Apoptosis and chemotherapy resistance. **European Journal of Cancer**, v.32A, n.6, p.921-926, 1996.

HIGGINS, C.F. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. **Nature**, v. 446, p. 749-757, 2007.

HIPFNER, D.R.; DEELEY, R.G.; COLE, S.P.C. Structural, mechanistic and critical aspects of MRP1. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1461, p.359-376, 1999.

HOWELLS, H.E.; DHAR, K.K.; HOBAN, P.R.; JONES, P.W.; FRYER, A.A.; REDMAN, C.W.; STRANGE, R.C. Association between glutathione-S-transferase GSTP1 genotypes, GSTP1 over-expression, and outcome in epithelial ovarian cancer. **International Journal of Gynecological Cancer**, v.14, n.2, p.242-250, 2004.

HSU, S.M.; RAINER, L.; FANGER, H.A. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **American Journal of Clinical Pathology**, v.75, p. 734-738, 1981.

HUANG, J.; TAN, P.H.; THIYAGARAJAN, J.; BAY, B.H. Prognostic significance of glutathione S-transferase-Pi in invasive breast cancer. **Modern Pathology**, v.16, n.6, p558-565, 2003.

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

IRWIN, M.S. Family feud in chemosensitivity, p73 and mutant p53. **Cell Cycle**, v.3, n.3, p.319-323, 2004.

ISHIKAWA, T., AKIMARU, K., NAKANISHI, M., TOMOKIYO, K., FURUTA, K., SUZUKI, M., NOYORI, R. Anti-cancer-prostaglandin-induced cell-cycle arrest and its modulation by an inhibitor of the ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump (GS-X pump). **Biochemical Journal**, v.336, p.569-576, 1998.

JAFFE, M.H.; HOSGOOD, G.; TAYLOR, H.W.; KERWIN, C.S.; HEDLUND, C.S.; LOPEZ, M.K.; DAVIDSON, J.R.; MILLER, D.M.; PARANJIPE, M. Immunohistochemical and clinical evaluation of p53 in canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v.37, p.40-46, 2000.

JEDLITSCHKY, G.; LEIER, I.; BUCHHOLZ, U.; BARNOUIN, K.; KURZ, G.; KEPPLER, D. Transport of glutathione, glucuronate and sulfate conjugates by the *MRP* gene-encoded conjugate export pump. **Cancer Research**, v.56, p.988–994, 1996.

JOHNSON, A.S.; COUTO, A.G.; WEGHORST, C.T. mutation of the p53 tumor suppressor gene in spontaneously occurring osteosarcomas of the dog. **Carcinogenesis**, v.19, n.1, p.213-217, 1998.

JULIANO, R.L.; LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.455, n.1, p. 152-162, 1976.

KAMATA, S.; KISHIMOTO, T.; KOBAYASHI, S.; MIYAZAKI, M. Expression and localization of ATP binding cassette (ABC) family of drug transporters in gastric hepatoid adenocarcinomas. **Histopathology**, v.52, n.6, p.747-754, 2008.

KANDIOLER-ECKERSBERGER, D.; LUDWIG, C.; RUDAS, M.; KAPPEL, S.; JANSCHKE, E.; WENZEL, C.; SCHLAGBAUER-WAKL, H.; MITTLBÖCK, M.; GNANT,

M.; STEGER, G.; JAKESZ, R. TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v.6, n.1, p.50-56, 2000.

KELLER, S.M.; SCHADE, B.; RICKENBACHER, A.B.; BRUGNERA, E.; WERGIN, M.C.; MÜLLER, E.J.; SUTER, M.M.; GUSCETTI, F. A comprehensive test system to identify suitable antibodies against p53 for immunohistochemical analysis of canine tissues. **Journal of Comparative Pathology**, v.137, p.59-70, 2007.

KELLEY, M.J.; JOHNSON, B.E. Genetic mechanisms of solid tumor oncogenesis. **Advances in Internal Medicine**, v.39, p.93-122, 1994.

KO, L.J.; PRIVES, C. p53: puzzle and paradigm. **Genes & Development**, v.10, n.9, p.1054-1072, 1996.

KÖHLER, T.; LEIBLEIN, S.; BORCHERT, S.; ELLER, J.; ROST, A.K.; LASSNER, D.; KRAHL, R.; HELBIG, W.; WAGNER, O.; REMKE, H. Absolute levels of MDR-1, MRP, and BCL-2 mRNA and tumor remission in acute leukemia. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.457, p.177-185, 1999.

KONSTANTINIDOU, A.E., KORKOLOPOULOU, P., PATSOURIS, E. Apoptotic markers for tumor recurrence: a minireview. **Apoptosis**, v.7, p.461-470, 2002.

KOPNIM, B.P. Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. **Biochemistry**, v.65, n.1, p.2-27, 2000.

KORKOLOPOULOU, P.; OATES, J.; KITTAS, C.; CROCKER, J. p53, c-myc p62 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in non-Hodgkin's lymphomas. **Journal of Clinical Pathology**, v. 47, p. 9–14, 1994.

KRISHNAMACHARY, N., CENTER, M.S. The MRP gene associated with a non-P-glycoprotein multidrug resistance encodes a 190-kDa membrane bound glycoprotein. **Cancer Research**, v.15, n.16, p. 3658-3661, 1993.

KRUH, G.D.; BELINSKY, M.G. The MRP family of drug efflux pumps. **Oncogene**, v.22, p. 7537-7552, 2003.

KUMARAGURUPARAN, R.; PRATHIBA, D.; NAGINI, S. Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 2, p. 218-224, 2006b.

KUMARAGURUPARAN, R.; SUBAPRIYA, R.; BALACHANDRAN, C.; MANOHAR, B.M.; THANGADURAI, A.; NAGINI, S. Xenobiotic-metabolizing enzymes in canine mammary tumours. **The Veterinary Journal**, v.172, p.364-368, 2006a.

LARKIN, A.; O'DRISCOLL, L.; KENNEDY, S.; PURCELL, R.; MORAN, E.; CROWN, J.; PARKINSON, M.; CLYNES, M. Investigation of MRP-1 protein and MDR-1 P-glycoprotein expression in invasive breast cancer: a prognostic study. **International Journal of Cancer**, v.112, n.2, p.286-294, 2004.

LEE, K.; BELINSKY, M.G.; BELL, D.W.; TESTA, J.R.; KRUH, G.D. Isolation of MOAT-B, a widely expressed multidrug resistance-associated protein/canicular multiespecific organic anion transporter-related transporter. **Cancer Research**, v.58, p.2741-2747, 1998.

LEE, C.H.; KIM, W.H.; LIM, J.H.; KANG, M.S.; KIM, D.Y.; KWEON, O.K. 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, J.Y.; TANABE, S.; SHIMOHIRA, H.; KOBAYASHI, Y.; OOMACHI, T.; AZUMA, S.; OGIHARA, K.; INOKUMA, H. Expression of cyclooxygenase-2, P-glycoprotein and multi-

drug resistance-associated protein in canine transitional cell carcinoma. **Research in Veterinary Science**, v.83, p.210-216, 2007.

LEGRAND, O.; SIMONIN, G.; BEAUCHAMP-NICOUD, A.; ZITTOUN, R.; MARIE, J.P. Simultaneous activity of MRP1 and Pgp is correlated with in vitro resistance to daunorubicin and with in vivo resistance in adult acute myeloid leukemia. **Blood**, v.94, p.1046–1056, 1999.

LEHNERT, M. Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problem. **European Journal of Cancer**, v. 32A, n.6, p. 912-920, 1996.

LEIER, I.; JEDLITSCHKY, G.; BUCHHOLZ, U.; CENTER, M.; COLE S.P.; DEELEY, R.G.; KEPPLER, D. ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. **Biochemical Journal**, v.314, p.433-437, 1996.

LEONARD, G.D.; TOJO, T.; BATES, S.E. The role of ABC transporters in clinical practice. **The Oncologist**, v.8, p. 411-424, 2003.

LEVINE, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**, n. 88, p.323–331, 1997.

LEVINE, A.J.; CHANG, A.W.; DITTMER, D.; NOTTERMAN, D.D.; SILVER, A.; THORN, K.; WELSH, M.; WU, M. The p53 tumor-suppressor gene. **Journal of Laboratory Clinical Medicine**, v. 123, n.6, p.817-823, 1994.

LO, H.W.; STEPHENSON, L.; CAO, X.; MILAS, M.; POLLOCK, R.; ALI-OSMAN, F. Identification and functional characterization of the human glutathione S-transferase P1 gene as a novel transcriptional target of the p53 tumor suppressor gene. **Molecular Cancer Research**, v.6, n.5, p.843-850, 2008.

LOE, D.W.; ALMQUIST, K.C.; DEELEY, R.G.; COLE, S.P. Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, n.16, p.9675-9682, 1996.

LOE, D.W.; DEELEY, R.G.; COLE, S.P.C. Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP. **European Journal of Cancer**, v. 32A, n.6, p. 945-957, 1996.

LOUKOPOULOS, P.; THORNTON, J.R.; ROBINSON, W.F. Clinical and pathologic relevance of p53 index in canine osseous tumors. **Veterinary Pathology**, v.40, p.237-248, 2003.

LOWE, S.W.; BODIS, S.; McCLATCHEY, A.; REMINGTON, L.; RULEY, H.E.; FISHER, D.E.; HOUSMAN, D.E.; JACKS, T. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. **Science**, v.266, p. 807-810, 1994.

LUQMANI, Y.A. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. **Medical Principles and Practice**, v.14, p.35-48, 2005.

MA, L.; PRATT, S.E.; CAO, J.; DANTZIG, A.; MOORE, R.E.; SLAPAK, C.A. Identification and characterization of the canine multidrug resistance-associated protein. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.1, p.1335-1342, 2002.

MASHIMA, T.; TSURUO, T. Defects of the apoptotic pathway as therapeutic target against cancer. **Drug Resistance Updates**, v.8, n.6, p.339-343, 2005.

MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**. 5<sup>a</sup> ed. Ames: Iowa State Press, 2002, p.788.

MICHELL, A.R. Longevity of British breeds of dogs and its relationships with sex, size, cardiovascular variables and disease. **Veterinary Record**, v145, p. 625-629, 1999.

MIYOSHI, N.; TOJO, E.; OISHI, A.; FUJIKI, M.; MISUMI, K.; SAKAMOTO, H.; KAMEYAMA, K.; SHIMIZU, T.; YASUDA, N. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein (PGP) and multidrug resistance-associated protein (MRP) in canine cutaneous mast cell tumors. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.64, n.6, p. 531-533, 2002.

MORO, J.V.; SILVEIRA, A.C.T.; TINUCCI-COSTA, M. Reatividade da proteína p53 no tumor venéreo transmissível canino: resultados preliminares. In: 12º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12., 2004, Ribeirão Preto. **Anais...**São Paulo:USP, 2004. 1 CD-ROM.

MORRISON, W.B. Canine and feline mammary tumors. In: MORRISON, W.B. **Cancer in dogs and cats: medical and surgical management**. 1 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998a, p.581-590.

MORRISON, W.B. Cancers of the reproductive tract. In: MORRISON, W.B. **Cancer in dogs and cats: medical and surgical management**. 1 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998b, p.591-598.

MORROW, C.S.; SMITHERMAN, P.K.; DIAH, S.K., SCHNEIDER, E.; TOWNSEND, A.J. Coordinated action of glutathione S-transferases (GSTs) and multidrug resistance protein 1 (MRP1) in antineoplastic drug detoxification. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, n.32, p.20114-20120, 1998.

MÜLLER, M.; ROELOFSEN, H.; JANSEN, P.L.M. Secretion of organic anions by hepatocytes: involvement of homologues of the multidrug resistance protein. **Seminars in liver disease**, v.16, p.211-220, 1996.

MUNOZ, M.; HENDERSON, M.; HABER, M.; NORRIS, M. Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. **Life**, v.59, n.12, p. 752-757, 2007.

NAKANO, M.; TAURA, Y.; INOUE, M. Protein expression of Mdm2 and p53 in hyperplastic and neoplastic lesions of the canine circumanal gland. **Journal of Comparative Pathology**, v.132, p.27-32, 2005.

NOOTER, K.; BRUTEL DE LA RIVIERE, G.; LOOK, M. P.; VANWINGERDEN, K. E.; HENZEN-LOGMANS, S. C.; SCHEPER, R. J.; FLENS, M. J.; KLIJN, J. G.; STOTER, G.; FOEKENS, J. A. The prognostic significance of expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in primary breast cancer. **British Journal of Cancer**, v.76, p.486 – 493, 1997.

O'BRIEN, M.L.; KRUH, G.D.; TEW, K.D. The influence of coordinate overexpression of glutathione phase II detoxification gene products on drug resistance. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.294, p.480-487, 2000.

O'BRIEN, M.L.; TEW, K.D. Glutathione and related enzymes in multidrug resistance. **European Journal of Cancer**, v.32A, p.967–978, 1996.

OHSAWA, M.; IKURA, Y.; FUKUSHIMA, H.; SHIRAI, N.; SUGAMA, Y.; SUEKANE, T.; HIRAYAMA, M.; HINO, M.; UEDA, M. Immunohistochemical expression of multidrug resistance proteins as a predictor of poor response to chemotherapy and prognosis in patients with nodal diffuse large B-cell lymphoma. **Oncology**, v.68, p.422-431, 2005.

PAREDES, A.; BLANCO, J.L.; ECHENIQUE-ELIZONDO, M. Expresión de proteínas relacionadas con resistencia a múltiples fármacos (MDR-proteínas) en tumores sólidos. **Cirugía Española**, v.79, n.4, p. 202-214, 2006.

PATNAIK, A.; EHLER, W.; MACEWEN, E. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival times in 83 dogs. **Veterinary Pathology**, v.21, p.469–474, 1984.

PEKLAK-SCOTT, C.; TOWNSEND, A.J.; MORROW, C.S. Dynamics of glutathione conjugation and conjugate efflux in detoxification of the carcinogen, 4-nitroquiloline 1-oxide: contributions of glutathione, glutathione S-transferase, and MRP1. **Biochemistry**, v.44, p.4426-4433, 2005.

PERSIDIS, A. Cancer multidrug resistance. **Nature biotechnology**. v.17, n.1, p. 94-95, 1999.

PIETSCH E.C.; HUMBEY, O.; MURPHY, M.E. Polymorphisms in the p53 pathway. **Oncogene**, V.25, p.1602–1611, 2006.

PINCZOWSKI, P.; TORRES-NETO, R.; FABRIS, V.E.; LAUFER-AMORIM, R. Mastocitoma cutâneo canino: variação da graduação histopatológica entre patologistas. **Clínica Veterinária**, n.77, p.76-78, 2008.

POULAIN, S.; LEPELLEY, P.; PREUDHOMME, C.; CAMBIER, N.; CORNILLON, J.; WATTEL, E.; COSSON, A.; FENAUX, P. Expression of the multidrug resistance-associated protein in myelodysplastic syndromes. **British Journal of Haematology**, v.110, p.591–598, 2000.

PROSCHOWSKY, H.F.; RUGBJERG, H.; ERSBOLL, A.K. Mortality of purebreed and mixedbreed dogs in Denmark. **Preventive Veterinary Medicine**, v.58, n.2, p.63-74, 2003.

PURDIE, C.A.; O'GRADY, J.; PIRIS, J.; WYLLIE, A.H.; BIRD, C.C. p53 expression in colorectal tumors. **American Journal of Pathology**, v.138, p.807-809, 1991.

QIAN, Y.M.; SONG, W.C.; CUI, H.; COLE, S.P.C.; DEELEY, R.G. Glutathione stimulates sulfated estrogen transport by multidrug resistance protein 1. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.9, p.6404-6411, 2001.

RAJAGOPAL, A.; SIMON, S.M. Subcellular localization and activity of multidrug resistance proteins. **Molecular Biology of the Cell**, v.14, p.3389-3399, 2003.

RENES, J.; De VRIES, E.G.E.; JANSEN, L.M.; MÜLLER, M. The (path)physiological functions of the MRP family. **Drug Resistance Updates**, v.3, p. 289-302, 2000.

RENES, J.; De VRIES, E.G.E.; NIENHUIS, E.F.; JANSEN, P.L.; MÜLLER, M. ATP-and glutathionedependent transport of chemotherapeutic drugs by the multidrug resistance protein MRP1. **British Journal Pharmacology**, v.126, p.681–688, 1999.

REZENDE, B.C.G. **Estudo da resistência a múltiplas drogas no linfoma canino**. São Paulo, 2005. 121f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo.

RIBRAG, V.; KOSCIELNY, S.; CARPIU, I.; CEBOTARU, C.; VANDE WALLE, H.; TALBOT, M.; FENAUX, P.; BOSQ, J. Prognostic value of GST-pi expression in diffuse large B-cell lymphomas. **Leukemia**, v.17, n.5, p.972-977, 2003.

ROCHA, T.A.; MAULDIN, G.N.; PATNAIK, A.K.; BERGMAN, P.J. Prognostic factors in dogs with urinary bladder carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.14, p.486-490, 2000.

ROELS, S.; TILMANT, K.; DUCATELLE, R. p53 expression and apoptosis in melanomas of dogs and cats. **Research in Veterinary Science**, v.70, p.19-25, 2001.

RUDAS, M.; FILIPITS, M.; TAUCHER, S.; STRANZL, T.; STEGER, G. G.; JAKESZ, R.; PIRKER, R.; POHL, G. Expression of MRP1, LRP and Pgp in breast carcinoma patients treated with preoperative chemotherapy. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.81, p.149 – 157, 2003.

SAGARTZ, J.E.; BODLEY, W.L.; GAMBLIN, R.M.; COUTO, C.G.; TIERNEY, L.A.; CAPEN, C.C. p53 tumor suppressor protein overexpression in osteogenic tumors of dogs. **Veterinary Pathology**, v.33, p.213-221, 1996.

SANCHES, R.C.; REGONATO, E.; ZILIOOTTO, L.; VICENTI, F.A.M.; DALECK, C.R. Doenças neoplásicas em cães: estudo retrospectivo de 535 casos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 2000, Gôania. **Anais...** Goiania:UFG, 2000, p.42.

SANTOS, F.G.A.; VASCONCELOS, A.C.; NUNES, J.E.S.; CASSALI, G.D.; PAIXÃO, T.A.; MARTINS, A.S.; SILVA, S.S.; MARTINS, R.F.; MORO, M.L. Apoptosis in the transplanted canine transmissible venereal tumor during growth and regression phases. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.3, p.607-612, 2008.

SCHMITT, C.A.; LOWE, S.W. Apoptosis and chemoresistance in transgenic cancer models. **Journal of Molecular Medicine**, v. 80, p.137-146, 2002.

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

SCOTTO, K.W. Transcriptional regulation of ABC drug transportes. **Oncogene**, v.22, p.7496-7511, 2003.

SHIGA, H.; HEATH, E.I.; RASMUSSEN, A.A.; TROCK, B.; JOHNSTON, P.G.; FORASTIERE, A.A.; LANGMACHER, M.; BAYLOR, A.; LEE, M.; CULLEN, K.J. Prognostic value of p53, glutathione S-transferase  $\pi$ , and thymidylate synthase for neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in head and neck cancer. **Clinical Cancer Research**, v.5, p.4097-4104, 1999.

SHOIEB, A.M.; HAHN, K.A.; Van LAACK, R.L.; BARNHILL, M.A. In vitro reversal of glutathione-S-transferase-mediated resistance in canine osteosarcoma (COS31) cells. **In Vivo**, v.12, n.5, p.455-462, 1998.

SILVA, A.R.L. Oncogenes e genes supressores de tumor. In: FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. **Oncologia Molecular**. 1ª ed. São Paulo:Editora Atheneu, p.29-42, 2004.

SLICHNMYER, W.J.; NELSON, W.G.; SLEBOS, R.J.; KOSTAN, M.B. Loss of a p53-associated G1 check-point does not decrease cell survival following DNA damage. **Cancer Research**, v.53, p.4164-4168, 1993.

SMITH, M.L.; CHEN, I.T.; ZHAN, Q.; BAE, I.; CHENC, Y.; GILMER, T.; KASTAN, M.B.; O'CONNOR, P.M.; FORNACE, A.J. Interaction of the p53-regulated protein GADD45 with proliferating cell nuclear antigen. **Science**, v.266, p.1376-1380, 1994.

SNYDER, L.A.; BERTONE, E.R.; JAKOWSKI, R.M.; DOONER, M.S., JENNINGS-RITCHIE, J., MOORE, A.S. p53 expression and environmental tobacco smoke exposure in feline oral squamous cell carcinoma. **Veterinary Pathology**, v.41, p.209-214, 2004.

SOH, Y.; GOTO, S.; KITAJIMA, M.; MORIYAMA, S.; KOTERA.; NAKAYAMA, T. NAKAJIMA.; H.; KONDO, T.; ISHIMARU, T. Nuclear localisation of glutathione S-transferase pi is na evaluation factor for drug resistance in gynaecological cancers. **Clinical Oncology**, v.17, n.4, p.264-270, 2005.

SOKOLOWSKA, J.; CYWINSKA, A.; MALICKA, E. p53 expression in canine lymphoma. **Journal of Veterinary Medicine**, v.52, 172-175, 2005.

STAVROVSKAYA, A.A. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. **Biochemistry**, v.65, n.1, p.95-106, 2000.

STEIN, U.; WALTHER, W.; LAURENCOT, C.M.; SCHEFFER, R.J.; SHOEMAKER, R.H. Tumor necrosis factor-alpha and expression of the multidrug resistance-associated genes LRP and MRP. **Journals of the National Cancer Institute**, v.89, p.807–813, 1997.

STRANO, S.; DELL'ORSO, S.; AGOSTINO, S.; FONTEMAGGI, G.; SACCHI, A.; BLANDINO, G. Mutant p53: na oncogenic transcription factor. **Oncogene**, v.26, p.2212-2219, 2007.

SUEIRO, F.A.R.; ALESSI, A.C.; VASSALLO, J. Canine lymphomas: a morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations on p53 immunoexpression. **Journal of Comparative Pathology**, v.131, p.207-213, 2004.

SULLIVAN, G. F.; AMENTA, P. S.; VILLANUEVA, J. D.; ALVAREZ, C. J.; YANG, J. M.; HAIT, W. N. The expression of drug resistance gene products during the progression of human prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v.4, 1393 – 1403, 1998.

SULLIVAN, G.F.; YANG, J.M.; VASSIL, A.; YANG, J.; BASH-BABULA, J.; HAIT, W.N. Regulation of expression of the multidrug resistance protein MRP1 by p53 in human prostate cancer cells. **Journal of Clinical Investigation**, v.105, p. 1261-1267, 2000.

SUN X.F.; CARSTENSEN, J.M.; STAL, O.; WINGREN, S.; HATSCHEK, T.; NORDENSKJÖLD, B.; ZHANG, H. Prognostic significance of cytoplasmic p53 oncoprotein in colorectal adenocarcinoma. **The Lancet**, v.340,p.1369-1373, 1992.

SUZUKI, T.; NISHIO, K.; TANABE, S. The MRP family and anticancer drug metabolism. **Current Drug Metabolism**, v.2, p.367-377, 2001.

TEIFKE, J.P.; LÖHR, C.V. Immunohistochemical detection of p53 overexpression in paraffin wax-embedded squamous cell carcinomas of cattle, horses, cats and dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v.114, p.205-210, 1996.

TESKE, E.; Van HEERDE, P.; RUTTERMAN, G.R.; KURZMAN, I.D.; MOORE, P.F.; MacEWEN, E.G. Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.205, n.12, 1722-1722, 1994.

THOMAS, H.; COLEY, H.M. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein. **Cancer Control**, v.10, n.2, p.159-165, 2003.

TOMINAGA, O.; HAMELIN, R.; TROUVAT, V.; SALMON, R.J.; LESEC, G.; THOMAS, G.; REMVIKOS, Y. Frequently elevated content of immunochemically defined wild-type p53 protein in colorectal adenomas. **Oncogene**, v.8, p.2653-2658, 1993.

TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D. The role glutathione-S-transferease in anti-cancer drug resistance. **Oncogene**, v.22, p.7369-7375, 2003.

TÓTH, K.; VAUGHAN, M.M.; SLOCUM, H.K.; ARREDONDO, M.A.; TAKITA, H.; BAKER, R.M.; RUSTUM, Y.M. New immunohistochemical “sandwich” staining method for mdr1 P-glycoprotein detection with JSB-1 monoclonal antibody in formalin-fixed, paraffin-embedded human tissues. **American Journal of Pathology**, v.144, n.2, p.227-236, 1994.

TSURUO, T.; NAITO, M.; TOMIDA, A.; FUJITA, N.; MASHIMA, T.; SAKAMOTO, H.; HAGA, N. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. **Cancer Science**. v.94, n.1, p. 15-21, 2003.

van LUYN, M.J.; MÜLLER, M.; RENES, J.; MEIJER, C.; SCHEPER, R.J.; NIENHUIS, E.F.; JANSEN, P.J.; De VRIES, E.G. Transport of glutathione conjugates into secretory vesicles is mediated by the multidrug –resistance protein I. **International Journal of Cancer**, v.76, p. 55-62, 1998.

VELDHOEN, N.; STEWART, J.; BROWN, R.; MILNER, J. Mutations of the p53 gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53 mutations in the dog. **Oncogene**, v.16, p.249-255, 1998.

VONDERHAAR, M.A.; MORRISON, W.B. Lymphosarcoma. In: MORRISON, W.B. **Cancer in dogs and cats: medical and surgical management**. 1 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998, p.667-696.

VOUSDEN, K.H. p53: dead star. **Cell**, v.103, n.5, p.691-694, 2000.

WANG, W.; BALLATORI, N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. **Pharmacological Reviews**, v.50, p.335–356, 1998.

WANG, Q.; BECK, W.T. Transcriptional suppression of multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wild-type p53. **Cancer Research**, v.58, p. 5762–5769, 1998.

WITHROW, S.J. Why worry about cancer in pets? In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 4. ed. Philadelphia: Saunders, 2007, p.xv-xvii.

WOLF, J.C.; GINN, P.E.; HOMER, B.; FOX, L.E.; KURZMAN, I.D. Immunohistochemical detection of p53 tumor suppressor gene protein in canine epithelial colorectal tumors. **Veterinary Pathology**, v.34, n.5, p.394-404, 1997.

WRIGHT, S.R.; BOAG, A.H.; VALDIMARSSON, G.; HIPFNER, D.R.; CAMPLING, B.G.; COLE, S.P.C.; DEELEY, R.G. Immunohistochemical detection of multidrug resistance protein in human lung cancer and normal lung. **Clinical Cancer Research**, v.4, p.2279–2289, 1998.

WU, H.; HAYASHI, T.; INOUE, M. Immunohistochemical expression of Mdm2 and p53 in canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of Veterinary Medicine – A Physiology, Pathology, Clinical Medicine**, v. 53, n. 2, p. 65-68, 2006.

YONEMARU, K.; SAKAI, H.; MARAKAMI, M.; KODAMA, A.; MORI, T.; YANAI, T.; MARUO, K.; MASEGI, T. The significance of p53 and retinoblastoma pathways in canine hemangiosarcoma. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.69, n.3, p.271-278, 2007.

ZHANG, H. Evaluation of four antibodies in detecting p53 protein for predicting clinicopathological and prognostic significance in colorectal adenocarcinoma. **Clinical Cancer Research**, v.5, 4126-4132, 1999.

ZHU, Q.; CENTER, M.S. Cloning and sequence analysis of the promoter region of the MRP gene of HL60 cells isolated for resistance to adriamycin. **Cancer Research**, v.54, p.4488–4492, 1994.

ZOCHBAUER-MULLER, S.; FILIPITS, M.; RUDAS, M.; BRUNNER, R.; KRAJNIK, G.; SUCHOMEL, R.; SCHMID, K.; PIRKER, R. P-glycoprotein and MRP1 expression in axillary lymph node metastases of breast cancer patients. **Anticancer Research**, v. 21, p.119 – 124, 2001.