

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**IMUNORREATIVIDADE DA PROSTAGLANDINA E₂
RELACIONADA A CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA,
ESTADIAMENTO CLÍNICO E PROGNÓSTICO DE
NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS**

Autor: Fábio Rodrigues da Motta

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Daleck

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

Jaboticabal – São Paulo – Brasil
Março de 2008

M921i Motta, Fábio Rodrigues
Imunorreatividade da prostaglandina E2 relacionada a
classificação histológica, estadiamento clínico e prognóstico de
neoplasias mamárias em cadelas / Fábio Rodrigues da Motta. – –
Jaboticabal, 2008
xi, 51 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008
Orientador: Carlos Roberto Daleck
Banca examinadora: Renée Laufer Amorim, Mirela Tinucci Costa
Bibliografia

1. Cadela. 2. Imunoistoquímica. 3. Neoplasia mamária. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:617:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FABIO RODRIGUES DA MOTTA – nascido em 15 de outubro de 1975, na cidade de Diadema / SP, ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade de Marília (UNIMAR), Marília / SP, em Fevereiro de 1996, concluindo-o em Janeiro de 2003. Em Abril de 2005, ingressou no curso de Especialização em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais, promovido pelo Instituto QUALITTAS e realizado na Universidade de Rio Preto (UNIRP), São José do Rio Preto / SP, concluindo-o em Dezembro de 2006. Em Março de 2006 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária, curso de Mestrado, junto à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Carlos Roberto Daleck.

Faça o que for necessário para ser feliz, mas não se esqueça que a felicidade é um sentimento simples, você pode encontrá-la e deixá-la ir embora por não perceber sua simplicidade.

(Mario Quintana)

Dedico este trabalho ao meu pai, Sérgio, minha mãe, Marta, minha irmã, Paula, minha esposa Cristina, pelo Amor incondicional, educação, apoio e proteção em todos os momentos, em especial ao meu filho Caio que é minha alegria de viver!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por estar sempre ao meu lado, me protegendo, me dando saúde, iluminando e abençoando minha vida. Sem ele, nada seria possível.

Aos meus pais Sérgio e Marta que são meus exemplos de vida, minha estrutura familiar, meus incentivadores e os Pais mais amorosos do Mundo!

Ao meu segundo pai, o Professor Carlos Roberto Daleck, pelo incentivo, amizade, oportunidades, ensinamentos, conselhos e pelo carinho que tem por mim em todos os momentos. Só quem o conhece como eu, sabe o quanto é bom ser seu amigo.

À minha esposa e companheira Cris por todo Amor, apoio e compreensão durante meus estudos. Você é meu Porto Seguro. Te Amo!

Ao meu amigo-irmão Andrigo Barboza De Nardi, pela amizade, dedicação para me ajudar durante a realização deste trabalho e por ser uma pessoa iluminada que tenho ao meu lado. Se não fosse você não concluiria este trabalho. Como dizem por ai, é um cara nota 10!

À Professora Renée Laufer Amorim, que com toda a paciência, simpatia e disposição me deu oportunidade de realizar parte deste trabalho na UNESP - Botucatu.

À minha linda irmã Paula que me ajudou muito, além de ser muito especial, saiba que tenho muito orgulho de ser seu irmão! Te Amo muito.

As minhas duas amigas Sabrina (Recife) e Sabrina (Curitiba) pela amizade, apoio durante os estudos e companheirismo durante as viagens para Botucatu.

Ao Alexandre (Dedo), pela imensa colaboração durante as aulas e, principalmente durante a análise estatística dos resultados deste trabalho. Sem você seria difícil!

À colega Geórgia da Patologia, pois sempre que precisei estava pronta para me ajudar na contagem das lâminas. Você é muito gentil e atenciosa.

À minha amiga Renata, sempre muito prestativa e paciente comigo em todas as vezes que precisei, é uma pessoa maravilhosa.

À minha amiga Sabrina (Brasília) pelos momentos de alegria e pela contribuição neste trabalho, você é muito especial.

Aos meus cães: Tandy, Tchula, Filó, Jude, Jade e Thor que são sempre amorosos comigo em todos os momentos e me fazem amar cada vez mais a minha profissão.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa e do auxílio financeiro que possibilitaram a realização dessa pesquisa.

Aos Pós-graduandos Marcela e Pedro, da UNESP – Botucatu, pela gentileza, dedicação e paciência durante os imunoistoquímicos.

À República Antro do HV que sempre me deram lugar para descansar quando precisei e pela amizade que tenho com cada um dos meninos que passaram por esta república.

Aos colegas do Serviço de Oncologia da UNESP - Jaboticabal: Jane, Simone, André e João Humberto pelo companheirismo e auxílio sempre que precisei.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – Campus de Jaboticabal por ter me dado estrutura e condições para os estudos.

Ao meu amigo Renato (Salsicha), que mesmo de longe sempre lembra e demonstra um carinho imenso por mim.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Neoplasia mamária	3
2.2 Prostaglandinas	7
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 SELEÇÃO DOS TUMORES.....	11
3.1.1 ADENOMA, CARCINOMA COM PROGNÓSTICO BOM E CARCINOMA COM PROGNÓSTICO RUIM.....	11
3.1.2 CARCINOMA PRIMÁRIO METASTÁTICO, METÁSTASE PULMONAR E CARCINOMA INFLAMATÓRIO.....	14
3.2 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO.....	14
3.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO ANTICORPO.....	15
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
4. RESULTADOS.....	17
4.1 IDADE	17
4.2 ESTADIAMENTO CLÍNICO	17
4.3 SOBREVIVÊNCIA APÓS A CIRURGIA.....	21
4.4 IMUNOISTOQUÍMICA	22
4.4.1 IMUNORREATIVIDADE PARA A PGE2.....	22
4.4.2 CORRELAÇÃO ENTRE O TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA E A IMUNOMARCAÇÃO.....	30
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÕES.....	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

8. ANEXOS	49
8.1 ANEXO 1	49
8.2 ANEXO 2	51

IMUNORREATIVIDADE DA PROSTAGLANDINA E₂ RELACIONADA AO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS

RESUMO: Pensando na contribuição ao estudo da oncologia humana e no aumento da sobrevida de cadelas com câncer de mama o objetivo deste trabalho foi de investigar a imunorreatividade da prostaglandina E₂ (PGE₂) no diagnóstico e prognóstico das neoplasias mamárias. O estudo foi realizado com 60 amostras de neoplasias de mama de cadelas que foram atendidas nos anos de 2002 a 2004. Este material foi dividido em seis grupos de 10 amostras. Nos grupos adenoma, carcinoma com prognóstico bom e carcinoma com prognóstico ruim a seleção dos casos se deu pela classificação histológica e evolução clínica do tumor. Os outros 30 tumores foram representados por 10 amostras de carcinoma primário metastático, 10 amostras de metástase pulmonar e 10 de carcinoma inflamatório. O Grupo Controle tinha 5 amostras de tecido mamário sem alterações patológicas. A avaliação da imunorreatividade da PGE₂ foi realizada através do exame imunoistoquímico, utilizando o anticorpo primário anti- PGE₂, clone PG 31, Oxford Biomedical Research. Avaliou-se também a incidência das neoplasias mamárias relacionadas à idade dos animais, o estadiamento clínico de acordo com a classificação histopatológica do tumor e a sobrevida dos animais que foram submetidos à cirurgia. O número de células imunomarcadas pelo anticorpo não apresentou variação significativa e não houve diferença estatística ($P = 0,239$) entre os grupos (adenoma, carcinoma com prognóstico bom, carcinoma com prognóstico ruim, carcinoma primário metastático, metástase pulmonar e carcinoma inflamatório), no grupo controle observou-se uma diferença estatística ($P < 0,014$) com relação aos demais grupos. Com relação aos valores médios da imunomarcagem o grupo dos carcinomas com prognóstico bom e o grupo de carcinoma primário metastático foram os que apresentaram maior número de células marcadas.

Palavras-chave: cadela, imunoistoquímica, neoplasia mamária, prostaglandina E_2 .

IMMUNOREACTIVITY OF PROSTAGLANDINE E₂ ASSOCIATED TO THE DIAGNOSIS AND PROGNOSIS OF MAMMARY NEOPLASMS IN BITCHES

ABSTRACT: Considering the contribution to researches in human oncology and the increasing surveillance of bitches with mammary neoplasm, the main purpose of this paper was to investigate the immunoreactivity of prostaglandine E₂ (PGE₂) in the diagnosis and prognosis of mammary neoplasm. The research was performed in 60 samples of mammary neoplasm in bitches attempted between 2002 and 2004. The material was separated into six groups of 10 samples each. In the group consisting of adenoma, carcinoma with good prognosis and carcinoma with poor prognosis, the cases were chosen according to the histological grade and clinical behavior of the tumor. The other 30 tumours consisted of 10 samples of primary metastatic carcinoma, 10 samples of pulmonary metastasis and 10 samples of inflammatory carcinoma. The control group consisted in 5 samples of mammary tissue without pathological changes. The immunoreactivity of PGE₂ was evaluated by immunohistochemistry, using the primary antibody anti-PGE₂, clone PG31, Oxford Biomedical Research. The incidence of mammary neoplasm was also analyzed according to the age of animals, clinical stage following the histopathologic grade of tumor and surveillance of bitches that underwent surgery. The number of positive cells for the antibody did not showed a significant range and there was no statistical difference ($P = 0,239$) between the groups (adenoma, carcinoma with good prognosis, carcinoma with poor prognosis, primary metastatic carcinoma, pulmonary metastasis and inflammatory carcinoma), regarding the control group it was observed a statistical difference ($p < 0,014$) when compared to other groups. The group consisting of carcinomas with good prognosis and the group consisting of primary metastatic carcinoma had shown the higher number of positive cells considering the average values of immunoreactivity.

Key word: bitch, immunohistochemistry, mammary neoplasm, prostaglandine E₂.

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias constituem aproximadamente 52% de todos os tumores que acometem as fêmeas caninas, mas esta incidência tende a diminuir, pois é cada vez mais comum a prática da ovariossalpingoisterectomia em fêmeas jovens (QUEIROGA & LOPES, 2002).

Aproximadamente 50% destes tumores são malignos, em 25% dos casos, os animais apresentam metástases no momento do diagnóstico (KITCHELL, 1995; OGILVIE & MOORE, 1995; MORRISON, 1998).

As afecções neoplásicas acometem com maior frequência fêmeas entre nove e 12 anos de idade (SONNENSCHNEIN et al., 1991; MacEWEN & WITHROW, 2001). Com maior incidência entre os Poodles, os Pastores Alemães e os Cocker Spaniel (COHEN & REIF, 1974; GILBERTSON, 1983).

Quando não existe envolvimento metastático, o procedimento terapêutico com maior índice de cura ainda é a remoção cirúrgica das glândulas mamárias envolvidas com amplas margens de segurança, pois os protocolos de quimioterapia e radioterapia antineoplásica apresentam baixa atividade antitumoral contra este tipo de neoplasia (RUTTEMAN et al., 2001).

Experimentos com animais demonstraram a ação de antiinflamatórios não esteróides na proteção contra os tumores de mama, principalmente pela inibição da enzima ciclooxygenase-2 (COX-2) (PIAZZA et al., 1995; THOMPSON et al., 1997).

Estudos estabeleceram a presença de duas enzimas da ciclooxygenase (COX-1 e COX-2), a primeira produz prostaglandinas essenciais e a segunda se torna ativada como resultado do traumatismo tissular, resultando na produção de prostaglandinas inflamatórias ou mediadoras da dor (SUBBARAMAIAH et al., 1996).

As prostaglandinas são responsáveis pela função fisiológica da citoproteção gástrica, manutenção da homeostasia renal e da função plaquetária (HARRIS, 2002).

Inúmeras pesquisas sugerem que a ciclooxygenase 2 (COX-2) é importante no processo de carcinogênese, principalmente pela capacidade de produzir prostaglandina

E₂ (SUBBARAMAIAH et al., 1996). O aumento da atividade da COX-2, juntamente com a prostaglandina PGE₂, estão relacionados com vários tipos de neoplasia (EBERHAT et al., 1994; RISTIMAKI et al., 1997; WILLIAMS et al., 1997; HIDA et al., 2000).

O estudo da imunorreatividade de marcadores prognósticos do câncer de mama em cadelas, através da imunoistoquímica, têm se revelado um importante exame na rotina diagnóstica e ótimo material de pesquisa (KANDIOLER-ECKERSBERGER et al., 2005).

Estudos anteriormente desenvolvidos pelo mesmo grupo de pesquisa, mostraram que nas mesmas amostras tumorais havia a expressão de COX-2 e esta expressão poderia ser relacionada ao estadiamento clínico e prognóstico (DE NARDI, 2007). Tendo em vista que a PGE₂ deriva da COX-2, supôs-se que a expressão da PGE₂ poderia servir dos mesmos propósitos, e assim concebeu-se este estudo, com o objetivo de relacionar a expressão da PGE₂ com o diagnóstico e prognóstico dos adenomas e carcinomas mamários em cadelas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. NEOPLASIA MAMÁRIA

As neoplasias mamárias das cadelas são detectados em animais de meia idade a velhos (JOHNSTON, 1993; DALECK et al., 1998; MORRISON, 1998). O desenvolvimento desta neoplasia é dependente, em grande parte, de hormônios ovarianos como o estrógeno, progesterona e o hormônio de crescimento (JOHNSTON, 1993; O'KEEFE, 1997). A castração antes do primeiro cio diminui a incidência do tumor para 0,5% na idade adulta, após o primeiro cio para 8% e após o segundo cio para 26%. Após 30 meses de idade a castração não apresenta efeito preventivo sobre o desenvolvimento do tumor (FERGUSON, 1985).

Os tumores de mama que acometem cães e gatos são modelos apropriados e válidos ao estudo da biologia do câncer (MOTTOLLESE et al., 1994; ZUCCARI, 2001), assim como, para testar novos agentes terapêuticos. Os animais de estimação, principalmente as cadelas servem de modelo biológico para vários estudos, pois apresentam a histologia e biologia tumoral similares às neoplasias que ocorrem no homem (MacEWEN, 1990; PELETEIRO, 1994; ZUCCARI, 2001).

As raças que apresentam a maior incidência de tumores de mama são os Poodles, os Pastores Alemães e os Cockers Spaniel, além dos animais sem raça definida (ZUCCARI, 1999; RUTTEMAN et al., 2001).

Geralmente os tumores mamários apresentam-se como nódulos circunscritos, de dimensões variáveis. Em relação à mobilidade, podem ser móveis ou aderidos, com extenso envolvimento cutâneo e muscular. Ao corte podem ter aspectos sólidos, císticos ou mistos, cuja superfície são observados freqüentemente focos de necrose (BRODEY et al., 1983; RUTTEMAN et al., 2001).

Hormônios como o estrógeno, progesterona e o hormônio de crescimento influenciam a carcinogênese mamária (MORRISON, 1998; FONSECA, 1999; ZUCCARI,

1999). MacEWEN et al. (1982) e SARTIN (1992) identificaram receptores de estrógenos em 40 a 60 % dos casos de câncer de mama em cadelas.

Distúrbios endócrinos como irregularidade no ciclo estral, cistos foliculares ovarianos, corpo lúteo persistente, hiperplasia endometrial e pseudociese não aumentam o risco de desenvolvimento de tumor de mama em animais, como demonstrado por BRODEY et al. (1966) e FERGUSON (1985).

Moulton (1970) relata que o estadiamento das neoplasias mamárias em cadelas deve ser voltado para avaliar a fase de evolução tumoral, bem como as possibilidades de progressão do tumor, no seu sítio de origem e em outros territórios (metástases). Estas neoplasias, geralmente, fazem metástases em linfonodos e pulmão. Mas podem ocorrer em outros órgãos ou tecidos, como fígado, coração, rins, pele, cérebro e ossos (KITCHELL, 1995).

O exame histopatológico é o método de eleição para identificar as características de uma neoplasia (LIMA & MARTINS, 1992; MOTA & OLIVEIRA, 1999). As características histopatológicas desta afecção que indicam um prognóstico reservado são: pouca diferenciação nuclear, invasão de vasos linfáticos e/ou sanguíneos e metástases em linfonodos (BOSTOCK, 1992; HELLMEN, 1993).

A classificação dos tumores mamários em cadelas segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) está disposta na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação dos tumores mamários em cadelas segundo a Organização Mundial da Saúde, citada por MISDORP et al. (1999).

1- Neoplasias malignas	2- Neoplasias benignas
1.1- Carcinoma <i>in situ</i>	2.1- Adenoma
1.2- Carcinoma complexo	2.1.1- Adenoma simples
1.3- Carcinoma simples	2.1.2- Adenoma complexo
1.3.1- Carcinoma túbulo-papilífero	2.1.3- Adenoma basalóide
1.3.2- Carcinoma sólido	2.2- Fibroadenoma
1.3.3- Carcinoma anaplásico	2.2.1- Fibroadenoma com baixa celularidade
1.4- Tipos especiais de carcinoma	2.2.2- Fibroadenoma com alta celularidade
1.4.1- Carcinoma de células fusiformes	2.3- Tumor misto benigno
1.4.2- Carcinoma de células escamosas	2.4- Papiloma ductal
1.4.3- Carcinoma mucinoso	
1.4.4- Carcinoma rico em lipídeos	
1.5- Sarcoma	
1.5.1- Fibrossarcoma	
1.5.2- Osteossarcoma	
1.5.3- Outros sarcomas	
1.6- Carcinossarcoma	
1.7- Carcinoma ou sarcoma em tumores benignos	
3- Tumores sem classificação	
4- Hiperplasias mamárias e displasias	
4.1- Hiperplasia ductal	
4.2- Hiperplasia lobular	
4.2.1- Hiperplasia epitelial	
4.2.2- Adenose	
4.3- Cistos	
4.4- Ectasia ductal	
4.5- Ginecomastia	

As neoplasias malignas compreendem o carcinoma *in situ*, carcinoma complexo, carcinoma simples com os subtipos tubulopapilar, sólido e anaplásico; tipos especiais de carcinoma, que agrupam o carcinoma de células fusiformes, o de células escamosas, o mucinoso e o rico em lipídio; sarcomas com o fibrossarcoma, osteossarcoma e outros sarcomas (MISDORP et al., 1999).

Nos tumores benignos estão agrupados os adenomas simples, complexo e basalóide, os fibroadenomas de baixa e alta celularidade, o tumor misto benigno e o papiloma ductal. As hiperplasias/displasias mamárias na cadela são classificadas como

hiperplasia ductal, hiperplasia lobular podendo ser epitelial ou adenose, cistos, ectasia ductal, fibrose local e ginecomastia (MISDORP et al., 1999). Outra forma de apresentação histológica dos tumores mamários malignos é aquela em que o neoplasma é denominado de carcinoma inflamatório, que tem como característica, extrema rapidez de crescimento e de invasão (MacEWEN & WITHROW, 2001).

Até o momento, somente a terapia cirúrgica realizada com amplas margens de segurança é a forma de tratamento que confere maior sobrevida para cadelas com câncer de mama (BIRCHARD, 1995).

A seleção da técnica cirúrgica depende do número de tumores e da sua localização na cadeia mamária, das características clínicas do tumor e do estado clínico do paciente. É importante respeitar as margens de segurança dos tumores e sempre enviá-los para o exame histopatológico. Nas cadelas é comum coexistirem diferentes tipos histológicos e com comportamento biológico distinto (QUEIROGA & LOPES, 2002).

Os protocolos com fármacos antineoplásicos e/ou a radioterapia geralmente não são efetivos (MacEWEN & WITHROW, 2001). Experimentos com animais demonstraram a ação do sulindac sulfone na proteção contra os tumores de mama (PIAZZA et al., 1995; THOMPSON et al., 1997). O sulindac sulfone é um metabólito de um antiinflamatório não esteróide que age diretamente na inibição da ciclooxigenase-2 (COX-2), contribuindo desta forma para a redução na síntese de várias prostaglandinas, entre elas, a prostaglandina E₂.

Considerando ainda a importância do estudo dos tumores mamários em cadelas, pode-se afirmar que houve melhora substancial nos cuidados prestados aos animais de companhia nos últimos anos. Cada vez mais, os proprietários exigem que seus animais de estimação tenham atenção semelhante àquelas prestadas aos doentes humanos (PELETEIRO, 1994; ZUCCARI, 2001).

2.2. PROSTAGLANDINAS

As prostaglandinas são substâncias orgânicas extremamente potentes que aparecem numa grande variedade de tecidos e situações biológicas. São chamadas de prostaglandinas, pois Von Euler em 1934, supôs que eram substâncias originadas na próstata. Alguns anos mais tarde, Eliasson (1959) provou que quase todas as prostaglandinas seminais eram originadas nas vesículas seminais e não na próstata, mas o nome permaneceu. As prostaglandinas são divididas de acordo com sua estrutura e função, produzindo efeitos biológicos diferentes. As prostaglandinas endógenas possuem atividade bastante ampla, mas seu efeito fisiológico predominante é provocar a contração ou o relaxamento das células musculares lisas em diversos órgãos (TSAI & WILTBANK, 1997).

São metabólitos importantes do ciclo do ácido aracdônico, responsáveis por inúmeros processos fisiológicos. Outros estudos mostram que grandes concentrações de prostaglandinas E_2 são produzidas por células neoplásicas, responsáveis por atuar na mutação celular, proliferação, apoptose além de produzir efeitos imunossupressores (LUPULESCU, 1996; ARA et al., 1996). Este papel imunossupressor é demonstrado sobre linfócitos T e B, linfocinas, células *natural killers*, células T citotóxicas e macrófagos. Altas quantidades de prostaglandinas produzidas por alguns tumores são também capazes de causar inibição da migração de monócitos, inibição esta que pode ser revertida pelo uso de antiinflamatórios COX-2 seletivos (BORZACCHIELLO & PAPPARELLA, 2004).

Além de estar relacionada com eventos fisiológicos e processos cicatriciais, a prostaglandina E_2 (PGE_2) é responsável por muitos eventos celulares nas neoplasias como a iniciação, promoção, progressão e metástase dos tumores (BAKLE, 2001; CAO & PRESCOTT, 2002; WANG & DUBOIS, 2004).

Prostaglandinas e COX estão sendo avaliadas com alvos para prevenção do câncer e em seu tratamento em animais com neoplasias ocorridas naturalmente usadas como modelos para humanos (KNAPP et al., 2000).

Grandes concentrações de prostaglandinas E_2 são produzidas por células neoplásicas, macrófagos associados a tumores e monócitos, em pessoas com câncer de pulmão, mama, cólon, cabeça e pescoço e experimentalmente em tumores induzidos em animais, mostrando assim sua íntima ligação com o comportamento biológico do câncer (HUBBARD et al., 1988; MARNETT et al., 1992).

A angiogênese é o processo de desenvolvimento de novos capilares sanguíneos a partir de vasos pré-existentes; essencial para que ocorra o desenvolvimento dos tumores e das metástases. Sabe-se hoje que a expressão da COX-2 pelas células endoteliais tem papel fundamental no processo de angiogênese tumoral. Neoplasias capazes de expressar grandes quantidades de COX-2 produzem mais fatores angiogênicos do que tumores com pobre expressão desta enzima. O uso de fármacos COX-2 seletivos é capaz de inibir a angiogênese e a migração de células endoteliais por tumores que expressam COX-2 (FOSSLIEN, 2000).

Doré et al., (2003) demonstraram que a COX-2 tem uma estreita relação com neoplasias, havendo uma maior concentração em tumores malignos do que em benignos, portanto sendo a PGE_2 um metabólito da COX-2, esta deve apresentar uma estreita relação com o desenvolvimento neoplásico maligno.

A COX-2 não é encontrada nas células em repouso em quantidade significativa, mas sua imunorreatividade é aumentada nos estados inflamatórios (DAVIES, 1995). Em contraste, a COX-1 é expressa de forma constitutiva em muitos tecidos e age sintetizando as prostaglandinas que regulam a função celular normal, onde através de sua inibição ocorrem os efeitos colaterais como as úlceras gástricas e toxicidade renal (DAVIES, 1995; MURRAY & BRATER, 1993).

Em humanos, estudos com células de câncer de cólon tratadas com PGE_2 , sugerem que esta prostaglandina promove o crescimento tumoral por aumentar a resistência à apoptose. A redução das taxas de apoptose podem prolongar a sobrevivência de células anormais, permitindo a ocorrência de mutações genéticas múltiplas, resultando em transformações fenotípicas e promoção do crescimento celular do tumor (BOL et al., 2002; CAO & PRESCOTT, 2002; SURH et al., 2001). Estas alterações são reversíveis por meio do uso de inibidores seletivos para COX-2

(KAWAMORI et al., 1998; OSHIMA et al., 1996; TSUJII & DUBOIS, 1995; FLORY & LeBLANC, 2005).

Mecanismos associados ao desenvolvimento neoplásico têm sido propostos, baseados em estudos experimentais, para explicar as consequências da super expressão de COX-2 e da PGE₂ (Figura 1) (LIU & ROSE, 1996; SURH et al., 2001; BOL et al., 2002; CAO & PRESCOTT, 2002; WANG & DUBOIS, 2004).

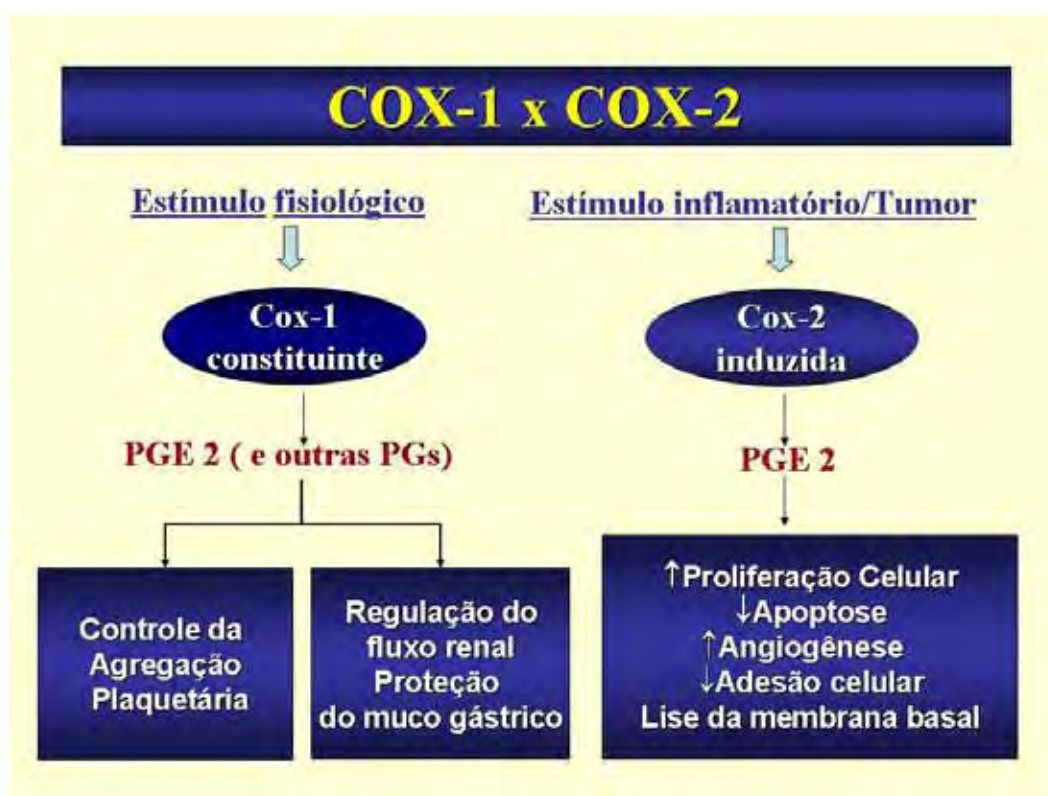


Figura 1. Papel da cicloxigenase 1 e 2 (Fonte: CALDERON, 2005).

A partir desses dados, estudos imunoistoquímicos têm sido realizados com o objetivo de avaliar a expressão da prostaglandina E₂ nos tecidos neoplásicos e pré-neoplásicos em humanos e animais na tentativa de estabelecer o verdadeiro papel da PGE₂ no desenvolvimento do câncer (ALMEIDA et al., 2001; DONG et al., 2003; DORÉ et al., 2003; KELLY et al., 2003).

Todos esses achados suportam o papel da PGE_2 na patogênese do câncer e assim sugerem que sua inibição programada desta prostaglandina pode levar a uma das mais efetivas e promissoras abordagens da quimioprevenção do câncer(SURH et al., 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. SELEÇÃO DOS TUMORES

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

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

O grupo controle foi composto por 5 amostras de tecido mamário sem alterações patológicas, obtidas de cadelas pertencentes ao Canil Municipal de Jaboticabal – São Paulo.

3.1.1. ADENOMA, CARCINOMA COM PROGNÓSTICO BOM E CARCINOMA COM PROGNÓSTICO RUIM

As amostras dos tumores dos grupos 1, 2 e 3 foram selecionados a partir de pacientes atendidas pelo Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná, no período de Janeiro de 2002 a Dezembro de 2004.

Nestes três grupos, além de avaliar a quantidade de células imunomarcadas pelo anticorpo anti-PGE₂, também foi realizado o estadiamento clínico da amostra do tumor e avaliado o tempo de sobrevida do animal após a cirurgia.

Foi estabelecido o estadiamento clínico das neoplasias por meio da mensuração do tamanho do(s) tumor(s) com auxílio de um paquímetro. Procedeu-se também à avaliação dos linfonodos quanto ao tamanho, mobilidade e envolvimento por células

neoplásicas, por meio do exame citológico. A avaliação radiográfica do tórax e a ultrasonografia do abdome objetivaram pesquisar a presença de metástases identificáveis nestas cavidades. O estadiamento clínico das neoplasias mamárias foi realizado segundo o sistema TNM (Tumor/ Linfonodo/ Metástase) proposto pela OMS (OWEN, 1980).

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

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

No período pós-operatório as pacientes foram avaliadas trimestralmente por exames físico e complementares, com o propósito de monitorar a evolução da afecção neoplásica (presença ou ausência de recidiva e/ou metástase; paciente vivo ou morto), procedimento este que teve continuidade até o mês de Dezembro de 2006.

Tabela 2. Relação dos casos de acordo com a classificação histopatológica e evolução clínica das neoplasias mamárias de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da UFPR, Câmpus de Curitiba, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004. UFPR – Curitiba, PR, 2008.

Paciente	Classificação histopatológica	Evolução clínica	Denominação do grupo
1	Adenoma simples	Favorável	Adenoma
2	Adenoma simples		
3	Adenoma complexo		
4	Adenoma simples		
5	Adenoma simples		
6	Adenoma simples		
7	Adenoma complexo		
8	Adenoma complexo		
9	Adenoma simples		
10	Adenoma simples		
11	Carcinoma complexo	Durante o período de acompanhamento pós-operatório ¹ os animais não apresentaram recidivas ou metástases	Carcinoma com prognóstico bom
12	Carcinoma túbulo-papilífero		
13	Carcinoma túbulo-papilífero		
14	Carcinoma complexo		
15	Carcinoma complexo		
16	Carcinoma sólido		
17	Carcinoma complexo		
18	Carcinoma sólido		
19	Carcinoma túbulo-papilífero		
20	Carcinoma túbulo-papilífero		
21	Carcinoma sólido	Durante o período de acompanhamento pós-operatório ¹ os animais apresentaram recidivas ou metástases	Carcinoma com prognóstico ruim
22	Carcinoma complexo		
23	Carcinoma túbulo-papilífero		
24	Carcinoma túbulo-papilífero		
25	Carcinoma sólido		
26	Carcinoma complexo		
27	Carcinoma complexo		
28	Carcinoma sólido		
29	Carcinoma túbulo-papilífero		
30	Carcinoma complexo		

¹ Acompanhamento pós-operatório: período compreendido entre a data da cirurgia² e os retornos (ou a morte do paciente). Os pacientes que não morreram foram monitorados até dezembro de 2006.

² As cirurgias foram realizados entre janeiro de 2002 e dezembro de 2004.

3.1.2. CARCINOMA PRIMÁRIO METASTÁTICO, METÁSTASE PULMONAR E CARCINOMA INFLAMATÓRIO

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

Durante a necropsia foram colhidas amostras da neoplasia mamária (carcinoma primário metastático – Grupo 4) e das metástases pulmonares (metástase pulmonar – Grupo 5). Para estes pacientes, não existem informações em relação à evolução clínica do tumor, pois chegaram mortos ao Hospital Veterinário em virtude da progressão da neoplasia.

Além destes, utilizaram-se outros 10 casos de carcinoma inflamatório (Grupo 6) provenientes do arquivo do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Câmpus de Botucatu. Neste grupo não havia informações sobre o paciente, portanto não se pôde estabelecer a relação com o prognóstico.

As amostras dos grupos 4, 5 e 6 foram submetidas ao mesmo protocolo de rotina histopatológica descrita anteriormente.

3.2. ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

Para a realização da técnica de imunoistoquímica os blocos de parafina foram submetidos a cortes de três micrômetros e distendidos em lâminas histológicas devidamente preparadas com cola líquida a base de organolisano (A3648 – SIGMA), evitando assim a perda do material durante o processamento.

A técnica imunoistoquímica foi realizada de acordo com o protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu (Anexo 1 e 2), utilizando-se o anticorpo primário anti-PGE₂, clone PG 31, Oxford

Biomedical Research, com a finalidade de avaliar a expressão da prostaglandina E₂ nas amostras estudadas.

3.3. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO ANTICORPO

Para a estimativa das células marcadas com o anticorpo anti-prostaglandina E₂ (PGE₂) foram contados cinco campos para cada amostra analisada. Em cada campo foram atribuídas pontuações ao número de células marcadas (Tabela 3), conforme preconizado por DE NARDI (2007). Foi estabelecida uma média dos valores determinados em cada campo.

Tabela 3. Pontuação atribuída a porcentagem de células neoplásicas marcadas (imunorreativas) nas neoplasias mamárias de cadela. UNESP – Jaboticabal, SP, 2008.

Número de células marcadas por campo (%)	Pontuação
< 5%	0
5 – 25 %	1
26 – 50%	2
51 – 75%	3
> 75%	4

Para uma maior exploração deste estudo, independentemente do número de células imunomarcadas foi atribuída uma pontuação referente à intensidade de imunomarcção (Tabela 4), conforme preconizado por DE NARDI (2007).

Tabela 4. Pontuação atribuída à intensidade de coloração das células marcadas nas neoplasias mamárias de cadela. UNESP – Jaboticabal, SP, 2008.

Intensidade de coloração	Pontuação
Fraca	1
Moderada	2
Intensa	3

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos ao teste estatístico Kruskal-Wallis (ANOVA on Ranks) para avaliar se houve diferença ($P < 0,05$) entre os grupos (adenoma, carcinoma com prognóstico bom, carcinoma com prognóstico ruim, carcinoma primário metastático, metástase pulmonar, carcinoma inflamatório e o grupo controle) levando-se em conta o número de células marcadas.

A possível correlação dos resultados com a sobrevida dos casos de adenoma, carcinomas com prognóstico bom e carcinoma com prognóstico ruim foi avaliada através do emprego do teste de Sperman ($P < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 IDADE

A incidência das neoplasias mamárias nas cadelas relacionada com a idade está representada na Figura 2, e demonstram maior prevalência em pacientes com idade entre sete e 12 anos.

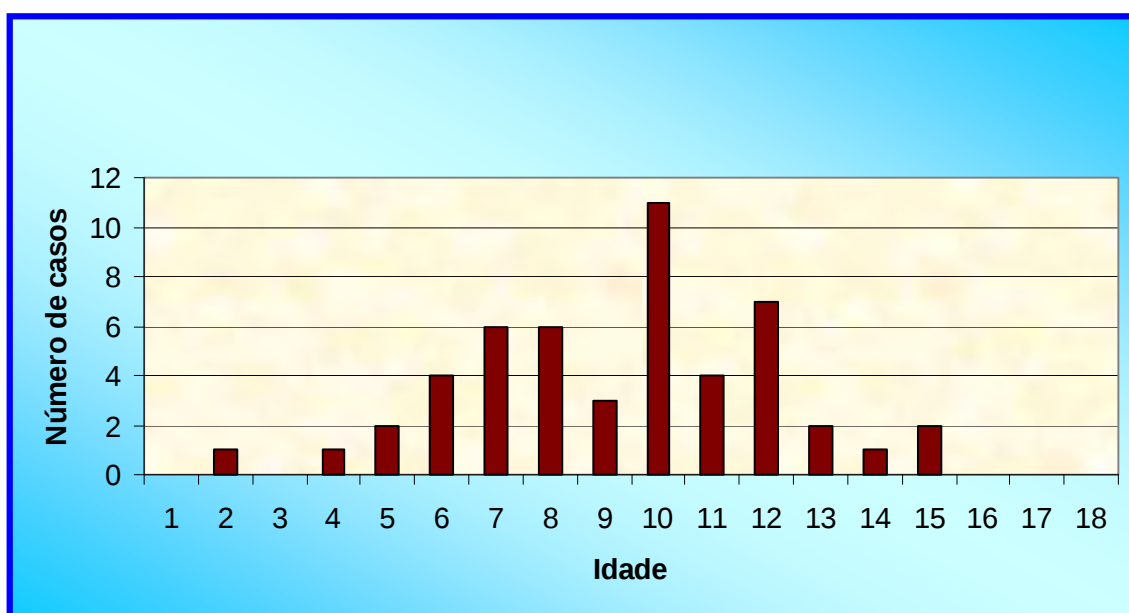


Figura 2. Distribuição da incidência das neoplasias mamárias em cadelas, de acordo com a idade. UFPR – Curitiba, PR, 2006.

4.2. ESTADIAMENTO CLÍNICO

Os dados de estadiamento clínico estão apresentados, de acordo com a classificação histopatológica e comportamento das neoplasias. Seis tumores (60%) do grupo adenoma foram classificados em estágio I, três (30%) em estágio II e um (10%)

em estágio III (Tabela 5). No grupo de carcinoma mamário com prognóstico bom (Tabela 6), quatro tumores (40%) foram estadiados em estágio I, dois (20%) em estágio II e quatro (40%) em estágio III. Nas neoplasias do grupo carcinoma mamário com prognóstico ruim (Tabela 7), dois tumores (20%) foram classificados em estágio I, dois (20%) em estágio II, cinco (50%) em estágio III e um (10%) em estágio IV.

Tabela 5. Estadiamento clínico dos adenomas mamários em cadelas de acordo com o Sistema TNM (Tumor / Linfonodo / Metástase) proposto pela OMS (OWEN, 1980). UFPR – Curitiba, PR, 2008.

Paciente	Tamanho do tumor	Linfonodo	Metástase	Estágio clínico
1	T1	N0	M0	I
2	T1	N0	M0	I
3	T2	N0	M0	II
4	T1	N0	M0	I
5	T1	N0	M0	I
6	T2	N0	M0	II
7	T3	N0	M0	III
8	T1	N0	M0	I
9	T1	N0	M0	I
10	T2	N0	M0	II

Legenda: *Tamanho do tumor:* **T1** = Tumor < 3cm de diâmetro. **T2** = Tumor entre 3-5cm de diâmetro. **T3** = Tumor > 5cm de diâmetro.

Linfonodo: **N0** = Sem evidência de metástase em linfonodo regional.

Metástase: **M0** = Sem evidência de metástases à distância.

Tabela 6. Estadiamento clínico dos carcinomas mamários com prognóstico bom, em cadelas, de acordo com o Sistema TNM (Tumor / Linfonodo / Metástase) proposto pela OMS (OWEN, 1980). UFPR – Curitiba, PR, 2008.

Paciente	Tamanho do tumor	Linfonodo	Metástase	Estágio clínico
11	T3	N0	M0	III
12	T3	N0	M0	III
13	T1	N0	M0	I
14	T1	N0	M0	I
15	T2	N0	M0	II
16	T2	N0	M0	II
17	T1	N0	M0	I
18	T3	N0	M0	III
19	T3	N0	M0	III
20	T1	N0	M0	I

Legenda: *Tamanho do tumor:* **T1** = Tumor < 3cm de diâmetro. **T2** = Tumor entre 3-5cm de diâmetro. **T3** = Tumor > 5cm de diâmetro.

Linfonodo: **N0** = Sem evidência de metástase em linfonodo regional.

Metástase: **M0** = Sem evidência de metástases à distância.

Tabela 7. Estadiamento clínico dos carcinomas mamários com prognóstico ruim, em cadelas, de acordo com o Sistema TNM (Tumor/ Linfonodo/ Metástase) proposto pela OMS (OWEN, 1980). UFPR – Curitiba, PR, 2008.

Paciente	Tamanho do tumor	Linfonodo	Metástases	Estágio clínico
21	T2	N1	M0	II
22	T3	N0	M0	III
23	T3	N1	M0	III
24	T3	N1	M0	III
25	T3	N0	M0	III
26	T3	N1	M0	III
27	T1	N0	M0	I
28	T1	N0	M0	I
29	T2	N1	M1	IV
30	T2	N0	M0	II

LEGENDA: *Tamanho do tumor:* **T1** = Tumor < 3cm de diâmetro. **T2** = Tumor entre 3-5cm de diâmetro. **T3** = Tumor > 5cm de diâmetro.

Linfonodo: **N0** = Sem evidência de metástase em linfonodo regional. **N1** = Presença de metástase em linfonodo regional.

Metástase: **M0** = Sem evidência de metástases à distância. **M1** = Presença de metástase à distância.

Na Figura 3 está representada a divisão dos tumores por tamanho (< 3cm, entre 3 e 5cm e > 5cm). No grupo dos adenomas, 60% dos tumores tinham menos de 3cm de diâmetro, enquanto que 50% dos casos de carcinoma com prognóstico ruim os tumores apresentavam mais que 5cm de diâmetro.

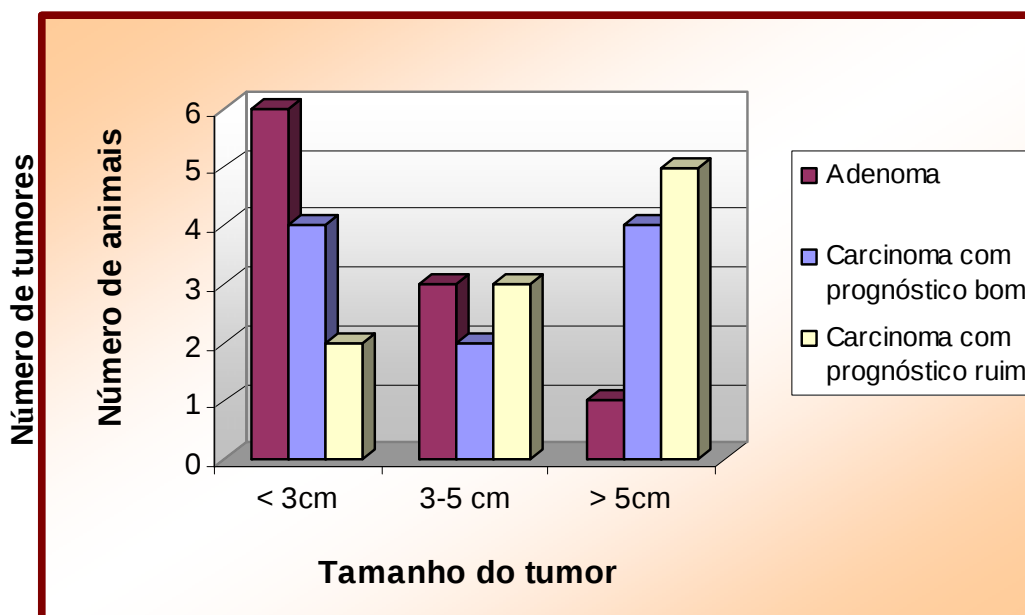


Figura 3. Prevalência de neoplasias mamárias, distribuídas conforme o tamanho do tumor, em cadelas atendidas no Hospital Veterinário da UFPR, câmpus de Curitiba, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004. UFPR – Curitiba, PR, 2008.

4.3. SOBREVIDA APÓS A CIRURGIA

Três cadelas (30%) com adenomas apresentaram sobrevida no pós-operatório maior que 36 meses. No grupo de carcinomas com prognóstico bom, 20% das pacientes viveram mais que 36 meses. No entanto, no grupo dos carcinomas com prognóstico ruim nenhum paciente apresentou sobrevida maior que 36 meses (Figura 4).

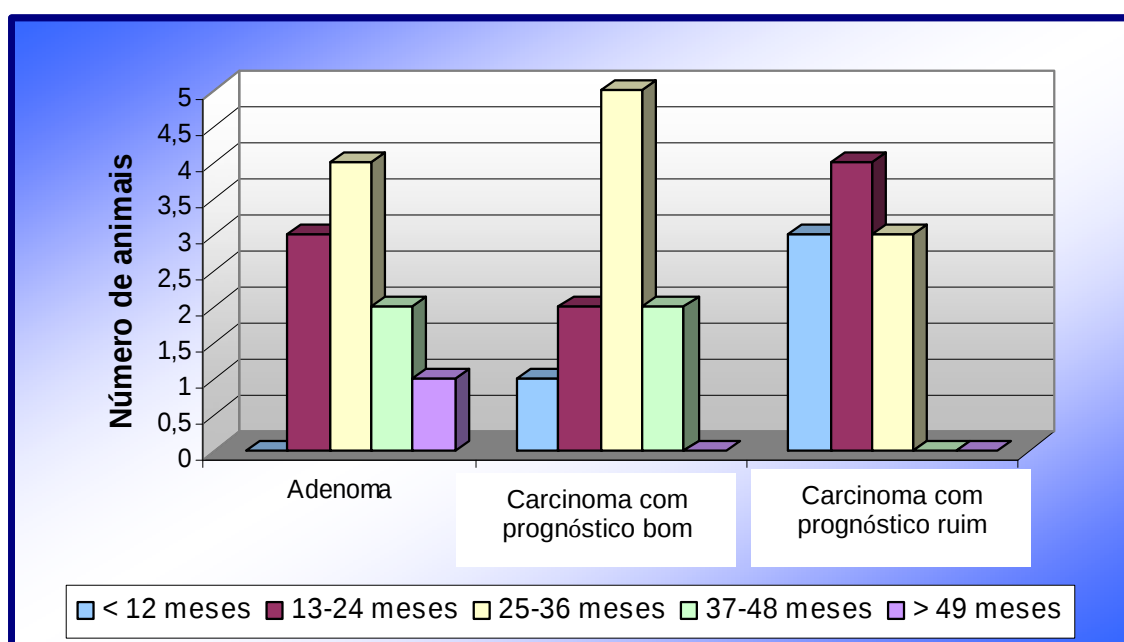


Figura 4. Distribuição das neoplasias mamárias de acordo com a sobrevida observada no pós-operatório, em cadelas atendidas no Hospital Veterinário da UFPR, câmpus de Curitiba, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004. UFPR – Curitiba, PR, 2008.

4.4. IMUNOISTOQUÍMICA

4.4.1. IMUNORREATIVIDADE PARA A PGE₂

Na avaliação imunoistoquímica, não houve diferença estatística ($P = 0,239$) entre os grupos (adenoma, carcinoma com prognóstico bom, carcinoma com prognóstico ruim, carcinoma primário metastático, metástase pulmonar e carcinoma inflamatório) em relação ao número de células marcadas para atividade da PGE₂. No entanto, foi observado diferença estatística ($P < 0,014$) nas amostras do grupo controle em relação ao número de células marcadas.

Em relação aos valores médios, observou-se um grande número de células marcadas para a PGE₂ nos carcinomas com prognóstico bom (média = 3,6), carcinoma primário metastático (média = 3,5) e nos carcinomas inflamatórios (média = 3,3) (Tabela 8 e Figura 5). O grupo dos carcinomas com prognóstico ruim e das metástases pulmonares apresentaram valores médios de imunomarcacão de 3,1 e 3,2 respectivamente. O grupo dos adenomas foi o que apresentou menor valor de imunomarcacão (média = 2,9) (Tabela 8 e Figura 5).

Tabela 8. Valores individuais e médias (erro padrão da média - $\pm$ EPM) de pontuação atribuídas ao percentual de imunomarcação da PGE₂ em cada neoplasia estudada. UNESP – Jaboticabal, SP, 2008.

Tumor	Adenoma	Carcinoma prognóstico bom	Carcinoma prognóstico ruim	Carcinoma primário metastático	Metástase pulmonar	Carcinoma inflamatório
1	3	4	3	4	4	3
2	4	4	3	3	3	2
3	3	3	2	4	4	4
4	2	3	3	3	3	3
5	4	4	3	3	4	3
6	2	4	4	4	4	4
7	3	3	3	4	4	3
8	3	4	4	3	2	4
9	2	4	3	3	2	4
10	3	3	3	4	2	3
Média$\pm$EPM	2,90$\pm$0,23	3,60$\pm$0,16	3,10$\pm$0,18	3,50$\pm$0,16	3,20$\pm$0,29	3,30 $\pm$0,21

(Kruskal-Wallis: p = 0,239)

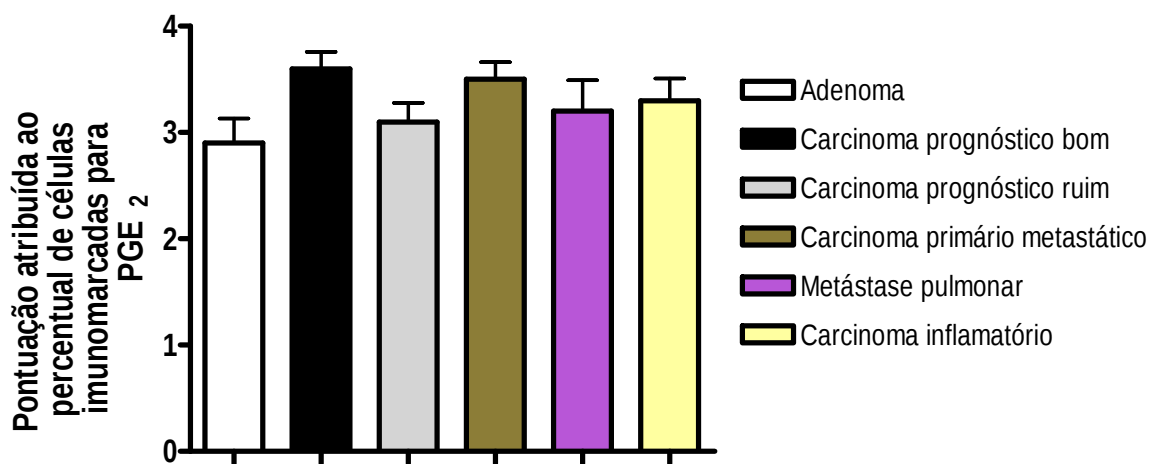


Figura 5. Média e erro padrão da média da pontuação atribuída ao número de células marcadas para PGE₂, nos grupos estudados. UNESP – Jaboticabal, SP, 2008.

(Kruskal-Wallis: p = 0,239).

Para uma maior exploração da imunoistoquímica realizada neste trabalho foi observada a intensidade da imunomarcção do anticorpo nos grupos estudados. Foi constatada uma intensidade de coloração classificada como moderada e intensa em todos os grupos estudados, mas sempre intensa no grupo dos carcinomas metastáticos. Com relação ao grupo controle foi observada uma intensidade de coloração fraca e moderada.

A imunorreatividade para a PGE₂ foi inteiramente confinada ao citoplasma das células neoplásicas. Um grande número de células imunorreativas, bem como forte expressão para a COX-2 foi observada na maior parte dos casos de carcinoma com prognóstico bom (Figura 6) e nos carcinomas inflamatórios (Figura 7).

Observou-se imunomarcção tanto no componente epitelial como no componente mesenquimal das neoplasias mamárias (Figura 8).

Na (Figura 9) pode-se observar células tumorais (maiores) e células inflamatórias (menores e mais escuras) no grupo de carcinoma metastático.

No grupo controle, sem alterações patológicas não se observou células imunomarcadas pelo anticorpo estudado (Figura 10).

Observou-se um número moderado de células imunomarcadas, bem como uma fraca intensidade de imunomarcção no grupo dos Adenomas (Figura 11 e 12), mas na (Figura 13) pode-se observar uma forte intensidade de marcação no mesmo grupo.

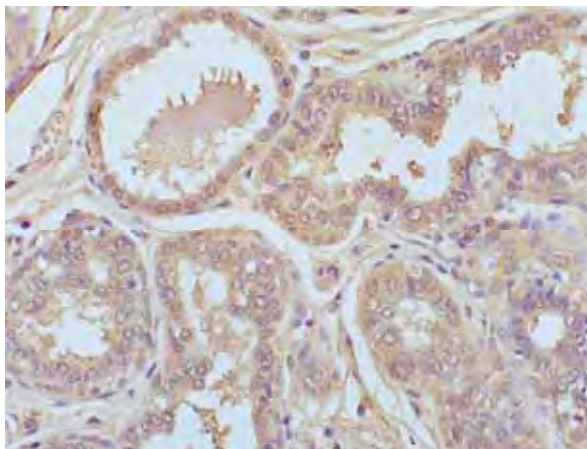


Figura 6. Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um carcinoma mamário com prognóstico bom, percentual de marcação 3 e intensidade de marcação 2. Contra-coloração: Hematoxilina de Mayer. Aumento: 200 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2008.

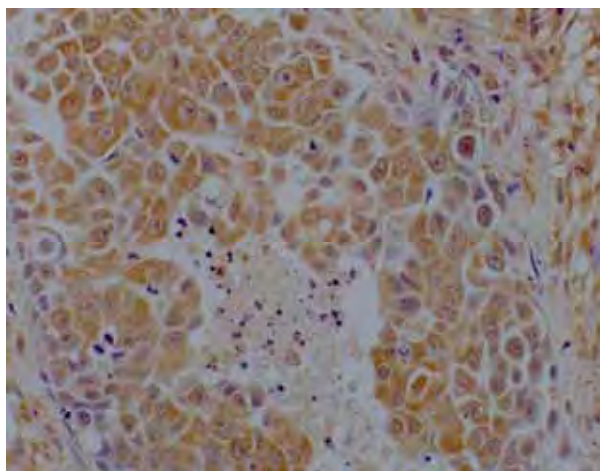


Figura 7. Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um carcinoma inflamatório em cadela com imunomarcação positiva, observar o grande número de células marcadas e a forte intensidade de expressão. Contra-coloração: Hematoxilina de Mayer. Aumento: 200 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2008.

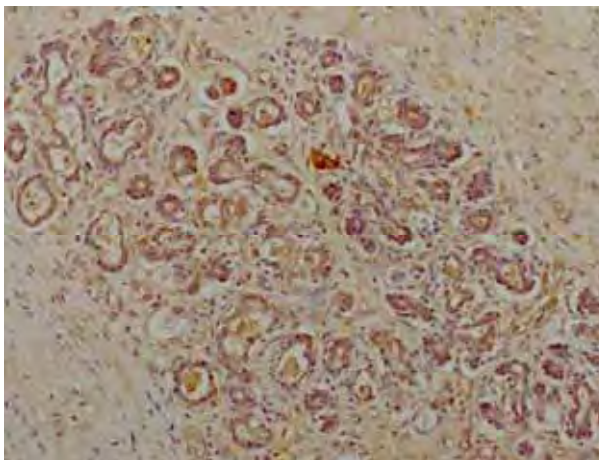


Figura 8. Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um carcinoma primário metastático em cadela, observar tanto a marcação do componente epitelial como do componente mesenquimal. Contra-coloração: Hematoxilina de Mayer. Aumento: 100 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2008.

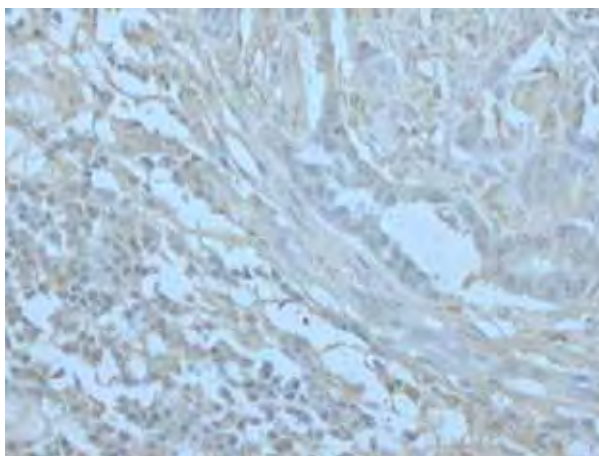


Figura 9. Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um carcinoma primário metastático. Observar células tumorais (maiores) e as células inflamatórias (menores e mais escuras). Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Objetiva 20x. UNESP – Jaboticabal, SP, 2008.

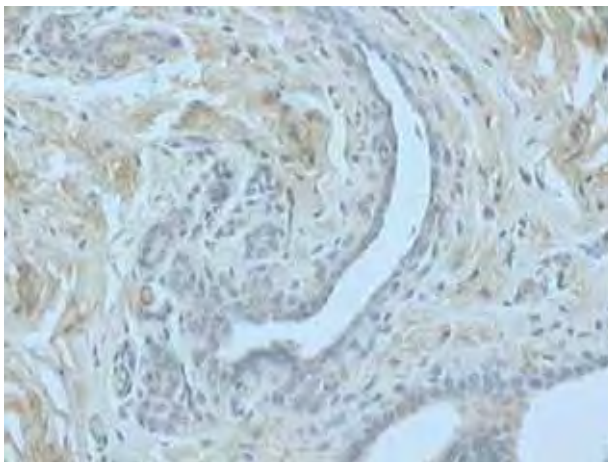


Figura 10. Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica em uma amostra de mama de cadela sem alterações patológicas (Grupo controle). Observar a não marcação pelo anticorpo PGE_2 . Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Objetiva 20x. UNESP – Jaboticabal, SP, 2008.

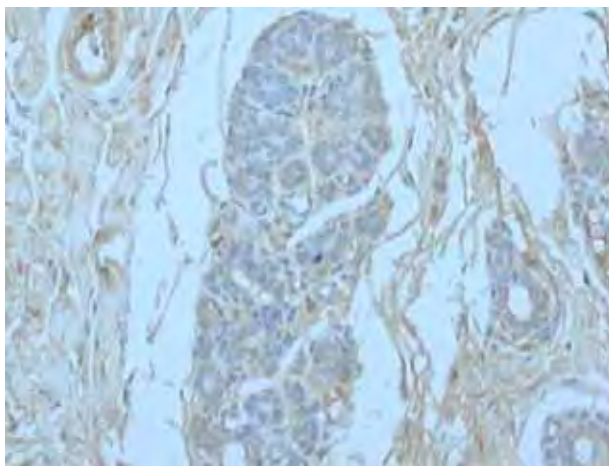


Figura 11. Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um adenoma. Observar as células imunomarcadas pelo anticorpo PGE_2 . Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Objetiva 20x. UNESP – Jaboticabal, SP, 2008.

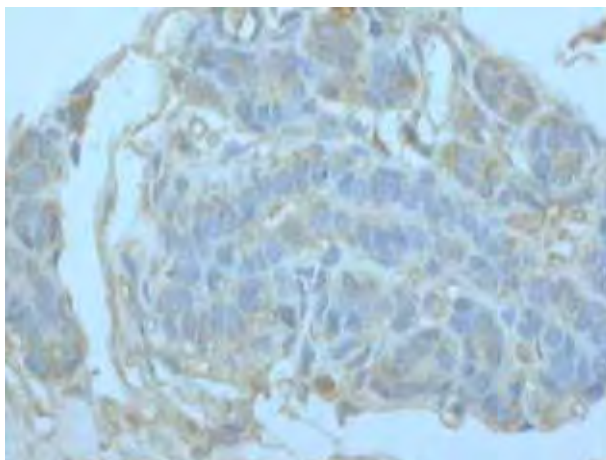


Figura 12. Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um adenoma. Observar as células imunomarcadas pelo anticorpo PGE_2 . Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Objetiva 40x. UNESP – Jaboticabal, SP, 2008.

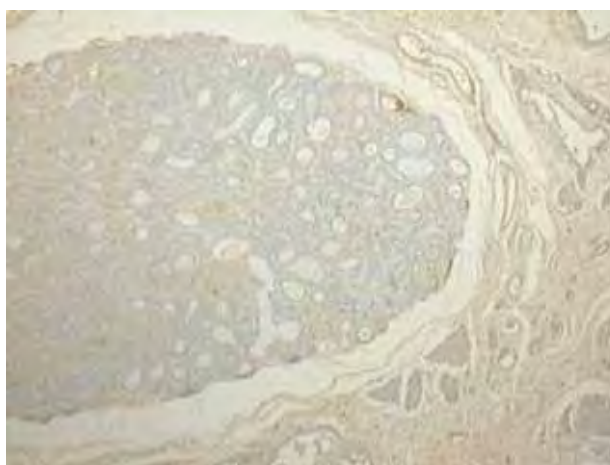


Figura 13. Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um adenoma em cadela com imunomarcção positiva. Observar o grande número de células imunomarcadas na região do tumor. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Objetiva 4x. UNESP – Jaboticabal, SP, 2008.

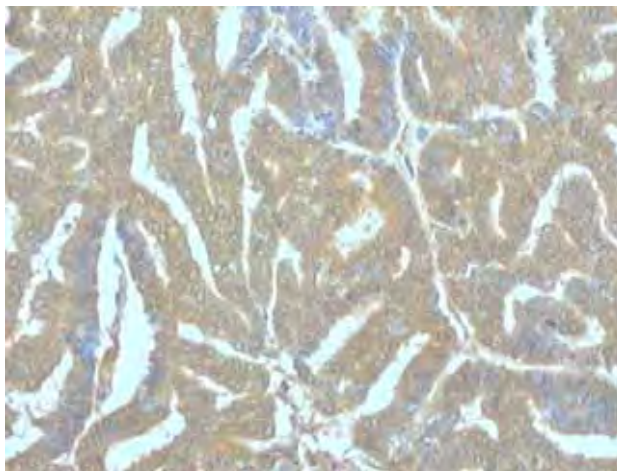


Figura 14. Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de uma metástase pulmonar em cadela. Observar células muito coradas e com intensa marcação no seu citoplasma. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Objetiva 20x. UNESP – Jaboticabal, SP, 2008.

4.4.2. CORRELAÇÃO ENTRE O TEMPO DE SOBREVIDA E A IMUNOMARCAÇÃO

Não se observou correlação entre o tempo de sobrevida e a imunomarcação em nenhum dos grupos: adenomas ($p = 0,3679$, $r = 0,3169$), carcinomas com prognóstico bom ($p = 0,8651$, $r = 0,06856$) e carcinomas com prognóstico ruim ($p = 0,8651$, $r = 0,06856$).

5. DISCUSSÃO

Pela idade dos animais estudados e acometidos por esta neoplasia, pode-se afirmar que a faixa etária de maior incidência para a neoplasia mamária é de sete a doze anos de idade confirmando os achados da literatura (SONNENSCHNEIN et al. 1991) e (RUTTEMAN et al. 2001). Contudo existiram amostras que foram obtidas de animais com maior e menor idades que a média citada por alguns autores.

A variação na prevalência dos tipos histológicos pode ser entendida devido a subjetividade de alguns parâmetros estabelecidos por BOSTOCK, (1992). As características histopatológicas das neoplasias mamárias que indicam um prognóstico reservado são: pouca diferenciação nuclear, invasão de vasos linfáticos e/ou sanguíneos, metástases em outros órgãos como principalmente linfonodos e pulmão. Estas características também foram observadas na maioria das amostras de carcinoma que foram contabilizadas e avaliadas neste estudo, onde se verificou que existe um grande índice de metástase em pulmão e linfonodos.

O estadiamento dos tumores mamário realizado de acordo com o sistema TNM (Tumor / Nódulo ou Linfonodo / Metástase) proposto pela Organização Mundial da Saúde (MOULTON, 1990) foi de grande importância neste estudo, pois permitiu avaliar a possibilidade de metástases do tumor para outros órgãos como os linfonodos e os pulmões, sendo que, existiram dois grupos de estudo que foram obtidos à partir de amostras que apresentavam metástase(s) no momento do diagnóstico além disso auxiliou na avaliação da fase de evolução tumoral. A partir do estadiamento tumoral pode-se de forma subjetiva estabelecer um prognóstico.

De Nardi (2004) verificou que nas neoplasias mamárias em cadelas o número de células marcadas pela COX-2 apresentou variação de acordo com a classificação histopatológica ($p < 0,001$). Observou também baixa expressão para a COX-2 nas células neoplásicas do grupo de adenomas onde apenas 32,1% das células foram imunomarcadas. No entanto, em 60,3% das células neoplásicas do grupo de carcinomas e metástases pulmonares foi observada uma imunomarcagem para a COX-2. Sendo a PGE_2 é um metabólito da COX-2 poderia ser concluído que a expressão das mesmas

seria igual nas neoplasias estudadas por De Nardi e no presente estudo, mas, com relação as prostaglandinas (PGE_2) não ocorreu nenhuma variação no número de células marcadas e a expressão foi alta nos grupos dos adenomas, ao contrario do estudo com a COX-2.

Concordando com a demonstração de Mohammed et al (2001) neste estudo foi observada maior concentração de PGE_2 em tecidos tumorais quando comparados com tecidos normais. Esta comparação foi possível, pois um dos grupos estudados foi composto por amostras de tecido mamário sadio (grupo controle) onde foi observada ausência de imunomarcção para PGE_2 e nos demais grupos (neoplasias) foi observada uma forte imunomarcção.

Thorat (2008) realizou um trabalho onde foi avaliada a expressão de EP1, um receptor da prostaglandina através da imunoistoquímica em amostras de câncer de mama em mulheres e observou a imunomarcção no citoplasma e no núcleo das células na maioria dos casos, além disso, não evidenciou correlação da expressão deste receptor da prostaglandina com a expressão da COX-2. Esta imunomarcção observada no núcleo e citoplasma das células ocorreu em pequena proporção no presente estudo.

Um estudo realizado por PINCZOWSKI (2008) demonstrou que mastocitomas caninos expressam PGE_2 independente da graduação histopatológica deste tumor e a intensidade de coloração assim como o número de células marcadas esta relacionada com a graduação histopatológica podendo assim, avaliar esta expressão como um possível biomarcador prognóstico.

Avaliando a imunorreatividade da PGE_2 em neoplasias mamárias em cadelas como objetivo deste trabalho pode-se observar que, existiu uma forte imunomarcção nos carcinomas assim como também foi observado por De Nardi (2007) uma elevada imunomarcção para COX-2 em carcinomas metastáticos. Sendo a PGE_2 um metabólito da COX-2 podemos confirmar uma estreita relação entre as PGE_2 e a COX-2 com algumas neoplasias como os carcinomas.

O anticorpo primário anti- PGE_2 , clone PG 31, Oxford Biomedical Research que foi o anticorpo utilizado neste estudo não é utilizado na rotina da Técnica de Imunoistoquímica. Por este motivo a intensidade de coloração da imunomarcção nas

células neoplásicas não foi levada em consideração porque as análises estatísticas poderiam alterar os resultados finais, entretanto nota-se que todos os grupos estudados apresentaram uma moderada ou forte intensidade de marcação por este anticorpo.

Avaliando a imunorreatividade das prostaglandinas nas neoplasias mamárias caninas e tendo como resultado a forte marcação celular pelo anticorpo primário anti PGE₂ é demonstrada a importância de continuar avaliando uma possível ligação da COX e de seus metabólitos (PGE₂) no desenvolvimento e progressão do câncer (LUPULESCU et al., 1996; ARA et al., 1996).

Futuras investigações ainda devem ser elucidadas para a avaliação da expressão da PGE₂ nas várias neoplasias malignas de cães e gatos, bem como, entender a variação dos efeitos dos antiinflamatórios não esteróides na prevenção e tratamento do câncer.

6. CONCLUSÕES

Neste estudo, os resultados mostram que a PGE₂ é expressa em tecidos mamários de cadelas, sem que se possa relacionar ao prognóstico e estadiamento clínico, ao menos pelo anticorpo e método empregado.

Concordando com o fato das prostaglandinas estarem presentes em vários tecidos, observou-se a imunomarcção do anticorpo estudado em tecidos mamários sadios assim como em neoplasias mamárias.

Observou-se um grande percentual de células imunomarcadas em todos os grupos estudados, mesmo tendo ocorrido uma leve variação de marcação entre os grupos.

Nos grupos dos adenomas, carcinomas com prognóstico bom e carcinoma com prognóstico ruim não se observou nenhuma correlação entre o tempo de sobrevida e a imunomarcção.

Em quase todas as células que foram imunomarcadas, o citoplasma foi onde se observou a maior expressão da prostaglandina E₂.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E. M. P. et al. Expression of cyclo-oxygenase in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. v.49, p.867-875, 2001.

ARA G.; TEICHER B. A. Cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors in cancer therapy. **Prostaglandins, Leukot Esset Acids**, v.54, p.3-16, 1996.

BAKLE, Y. S. COX-2 and cancer: a new approach to an old problem. **British Journal of Pharmacology**. v.134, p.1137-1150, 2001.

BIRCHARD, S. J. Definitive surgical treatment for cancer. **Kirk's Current Veterinary Therapy XII Small Animal Practice**. Philadelphia: Saunders, 1995. p.462-464.

BOL, D. K. et al. Cyclooxygenase-2 overexpression in the skin of transgenic mice results in supression of tumor development. **Cancer Research**. v.62, p.2516-2521, 2002.

BORZACCHIELLO, G.; PAPPARELLA, S. Expression of cyclooxygenase-1 and 2 in canine nasal carcinomas. **Journal of Comparative Pathology**, v.131, n.1, p.70-76, 2004.

BOSTOCK, D. E. Correlation between histological diagnosis mean nucleolar organizer region count and prognosis in canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.29, n.5, p.381-385, 1992.

BRODEY, R. S.; FIDLER, I. J.; HOWSON, B. A. The relationship of estrus irregularity, pseudopregnancy and pregnancy to the development of canine mammary neoplasms. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.149, p.1047-1049, 1966.

BRODEY, R. S.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ROSZEL, J. R. Canine mammary gland neoplasms. **Journal of American Animal Hospital Association**, v.19, p.61-89, 1983.

CALDERON, C. **Avaliação da expressão da cicloxigenase-2 e do índice de proliferação celular dos mastocitomas cutâneos caninos pela histopatologia, histoquímica, imunoistoquímica**. 2005. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Área de Concentração Patologia Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu, 2005.

CAO Y.; PRESCOTT S. M. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer, **Journal of Cellular Physiology**, v.190, p.279-286, 2002.

CASSALI, G. D. **Estudos morfológicos, imuno-histoquímicos e citométrico de tumores mamários da cadela – aspectos comparativos com neoplasias da mama humana.** 2000. 73p. Tese (Doutorado em Ciência Animal, Área de Patologia), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2000.

COHEN, D.; REIF, J. S. Epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasm observed in a veterinary hospital. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 34, p. 2859-68, 1974.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins. **Patologia Estrutural e Funcional.** 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.979-1002.

CHIARELLI, I. M.; CASSALI, G. D.; SCHMITT, F. O tamanho da massa tumoral pode ser indicativo de diferenciação das neoplasias da mama da cadela. In: **SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTIFICA**, 9., 2000. Anais... Belo Horizonte: UFMG / Pró-Reitoria de Pesquisa, 2000. p.95.

DALECK, C. R.; FRANCESCHINI, P. H.; ALESSE, A. C.; SANTANA, A. E.; MARTINS, M. I. M. Aspectos clínicos e cirúrgicos do tumor mamário canino. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.1, p.95-100, 1998.

DAVIES, N. M. Toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the large intestine. **Diseases of the Colon & Rectum**, Baltimore, v.38, p.1311-1321, 1995.

DE NARDI, A. B. **Correlação da cicloxigenase-2 com Ki-67, P53 e caspase-3 nas neoplasias de mama em cadelas.** 2007. 97p. Dissertação (Doutor em Cirurgia Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, 2007.

DE NARDI, A. B. **Expressão da cicloxigenase-2 nas neoplasias de mama em cadelas.** 2004. 54p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, 2004.

DONG M. et al. Inverse association between phospholipase A2 and COX-2 expression during mouse colon tumorigenesis. **Carcinogenesis**, v.24, p.307-315, 2003.

DORÉ, M. et al. Cyclooxygenase-2 Expression in canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.40, p.207-212, 2003.

EBERHAT, C. E.; COFFEY, R. J.; RADHIKA, A.; GIARDELLO, F. M.; FERRENBACH, S. DUBOIS, R. N. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human collateral adenomas and adenocarcinomas. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.107, p.1183-1188, 1994.

FANTON, J. W.; WITHROW, S. J. Canine mammary neoplasia: an overview. **California Veterinarian**, v.7, p.12-16, 1981.

FERGUSON, H. R. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinical of North America**, v.15, p.501-511, 1985.

FLORY, A. B.; LeBLANC, A. K. The role of cyclooxygenase in carcinogenesis and anticancer therapy. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.27, n.8, p.616-626, 2005.

FONSECA, C. S. **Avaliação dos níveis séricos de 17 β -estradiol e progesterona em cadelas portadoras de neoplasias mamárias**. 1999. 87p. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, 1999.

FOSSLIEN, E.; Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v.37, n.5, p.431-502, 2000.

GILBERTSON, S. R. Canine Mammary Epithelial Neoplasms: Biologic implications of morphologic characteristic assessed in 232 dogs. **Veterinary Pathology**, v.20, p.127-142, 1983.

HARRIS, R. C. Jr. Cyclooxygenase-2 inhibition and renal physiology. **American Journal of Cardiology**, v.89, p.10D-17D, 2002. Supplement.

HELLMEN, E. Prognostic factors in canine mammary tumors. A multivariate study of 202 consecutive cases. **Veterinary Pathology**, v.30, n.1, p.20-27, 1993.

HIDA, T.; YATABE, Y.; ACHIWA, H.; MURAMATSU, H.; KOZABI, K.; NAKAMURA, S.; OGAWA, M.; MITSUDOMI, T.; SUGIURA, T.; TAKAHASHI, T. Increased expressed of cyclooxygenase-2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. **Cancer Research**, Philadelphia, v.58, p.3761-3764, 2000.

HUBBARD, W. C.; ALLEY M. C.; McLEMORE, T. L. et al. Profiles of prostaglandin biosynthesis in sixteen established cell line derived from human lung, colon, prostate, and ovarian tumors. **Cancer Research**. v.48, p.4770-4775, 1988.

JOHNSTON, S. D. Reproductive systems. In: SLATTER, D. **Textbook of Small Animal Surgery**. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 1993. v.2, p.2177-2199.

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, 2005.

KAWAMORI, T.; RAO, C. V.; SEIBERT, K.; REDDY, B. S. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. **Cancer Research**, Philadelphia, v.58, p.409-412, 1998.

KELLY, L. M., et al. Lack of prognostic effect of COX-2 expression in primary breast cancer on short-term follow-up. **European Journal of Surgical Oncology**, p.1-4, 2003.

KITCHELL, B. E. Mammary tumors. **Kirk's Current Veterinary Therapy XII Small Animal Practice**. Philadelphia: Saunders, 1995, p.1098-1103.

KNAPP D. W.; GLICKEMAN M. W.; DeNICOLA D. B. et al. Naturally occurring canine transitional cell carcinoma of the urinary bladder. A relevant model of human invasive bladder cancer. **Urology Oncology**. v.5, p.47–59, 2000.

LIMA, G. R.; MARTINS, N. V. **Onco Ginecologia**. São Paulo: Atheneu, 1992. p.17-23.

LIU, X.; ROSE, D. P. Differential expression and regulation of cyclooxygenase-1 and 2 in two human breast cancer cell lines. **Cancer Research**. 1996. v.55, n.5, p.5125-5127.

LUPULESCU, A. Prostaglandins, their inhibitors and cancer. **Prostaglandins Leukot Esset Fatty Acids**, v.54, p.83-94, 1996.

MacEWEN, E. G. Spontaneous tumors in dogs and cats: Models for the study of cancer biology and treatment. **Cancer and Metastases Review**, v.9, n.1, p.125-136, 1990.

MacEWEN, E. G.; PATNAIK, A. K.; HARVEY, H. J.; PANKO, W. B. Estrogen receptors in canine mammary tumors. **Cancer Research**, v.42, n.6, p.2255-2259, 1982.

MacEWEN, E. G.; WITHROW, S. J. Tumors of the mammary gland. In: _____. **Small Animal Clinical Oncology**. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 2001. p.356-372.

MARNETT L. J. Aspirin and the potential role of prostaglandin in colon cancer. **Cancer Research**. v.52, p.5575-5589, 1992.

MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMÉN, E. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. **Armed Forces Institute of Pathology**, v.7, n.1, p.1-59, 1999.

MOHAMMED, S. I; COFFMAN, K.; GLICKMAN, N. W. et al. Prostaglandin E₂ concentrations in naturally occurring canine cancer. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v.64, p.1-4, 2001.

MORRISON. W. B. Canine and feline mammary tumors. In: _____. **Cancer in Dogs and Cats**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998, p.591-598.

MOTA, E. F. F.; OLIVEIRA, S. R. Diagnóstico citológico em medicina veterinária. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, n.30, n.1, p.29-47, 1999.

MOTTOLLESE, M.; MORELLI, L.; AGRIMI, U.; BENEVOLO, M.; SCJARRETTA, F.; ANTONUCCI, G.; NATALI, G. N.; Spontaneous canine mammary tumors – a model for monoclonal antibody diagnosis and treatment of human breast cancer. **Laboratory Investigation**, v.71, n.2, p.182-186, 1994.

MOULTON, J. E. Canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.7, n.4, p.289-320, 1970.

MOULTON, J. E. Tumors of the mammary gland. In_____. **Tumors in Domestic Animals**. 3.ed. Los Angeles: University of California Press, 1990. Cap.12, p.518-552.

MURRAY, M. D.; BRATER, D. C. Renal toxicity of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Annual Review Pharmacolgy & Toxicology*, Philadelphia, v. 32, p.435-467, 1993.

O'KEEFE D. A. Tumores do sistema genital e das glândulas mamarias. In: Ettinger S. J. & Feldman E. C. (Eds). **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4.ed. São Paulo: Manole, 1997. p.2344-2354.

OGILVIE, G. K.; MOORE, A. S. Mammary neoplasm. In_____. Managing the Veterinary Cancer Patient: A Practice Manual. Treton: Veterinary Learning Systems Company, 1995, p.430-434.

OSHIMA, M.; DINCHUK, J. E.; KARGMAN, S. L.; OSHIMA, H.; HANCOCK, B.; KWONG, E.; TRAZSKOS, J. M.; EVANS, J. F.; TAKETO, M. M. Suppression of intestinal polyposis in $Apc\Delta^{716}$ Knockout mice by inhibition of cyclooxygenase-2. **Cell**, Cambridge, v.87, p.803-809, 1996.

OWEN, L. M. TNM Classification of tumors in domestic animals. **World Health Organization**, Geneva, p. 26-32, 1980.

PELETEIRO, M. C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.89, n.509, p.10-29, 1994.

PIAZZA, G. A.; RAHM, A. L.; KRUTZSCH, M.; SPERL, G.; PARANKA, N. S.; GROSS, P. H.; BRENDDEL, K.; BURT, R. W.; ALBERTS, D. S.; PAMUKCU, R.; AHNEN, D. J. Antineoplastic drug sulindac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis. **Cancer Research**, Philadelphia, v.55, p.3110-16, 1995.

PINCZOWSKI, P. Mastocitoma canino: **Abordagem histopatológica e imunoistoquímica na busca de biomarcadores prognósticos**. 2008. 68p. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, 2008.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos – Novas perspectivas. **Congresso de Ciencias Veterinárias**, Oeiras, p.183-190, 2002.

RAW, I.; MORO, A. M. **Medicina Molecular**. São Paulo: Roca, 1999. p.75-93.

RISTIMAKI, A.; HONKANEN, N.; JANKALA, H.; SIQQONEN, M.; Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. **Cancer Research**, Philadelphia, v.57, p.1276-80, 1997.

RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J.; MacEWEN, E. G. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S. J.; MacEWEN, E. G. **Small Animal Clinical Oncology**. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 2001. p.455-477.

SARTIN, E. A. Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, n.11, p.2196-2200, 1992.

SONNENSCHN, E. G.; CLICKMAN, L. T.; GOLDSCHMIDT, M. H. Body conformation diet and risk of breast cancer in pet dogs: A case-control study. **American Journal Epiemiology**, v.133, p.694-703, 1991.

SOUZA, C. H. N., et al. Nonsteroidal Anti-inflammatiry Drugs and Câncer: Chemoprevention and treatment. **Veterinary Cancer Society Newsletter**, p.8-11, 2000.

SUBBARAMAIAH, K; TELANG, N.; RAMONETTI, J. T.; ARAKI, R.; DEVITO, B.; WEKSLER, B. B.; DANNENBERG, A.J. Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. **Cancer Research**, Philadelphia, v.54, p.4424-29, 1996.

SUN, L. K.; BACK-SCHIMMER, B.; OERTLI, B.; WÜTHRICH, R. P. Hyaluranan-induced cyclooxygenase-2 expression promotes thromboxane A₂ production by renal cells. **Kidney International**, v.59, p.190-196, 2001.

SURH, Y.J., et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through supression of NF-kB activation. **Mutation Research**, v.480-481, p.243-268, 2001.

THOMPSON, H. J.; JIANG, C.; LU, J. X.; MEHTA, R. G.; PIAZZA, G. A.; PARANKA, N. S.; PAMUKCU, R.; AHNEN, D. J. Sulfone metabolite of sulindac inhibits mammary carcinogenesis. **Cancer Research**, Philadelphia, v.57, p.267-71, 1997.

THORAT, M. A. et al. Prostanoid receptor EP1 expression in breast cancer. **Moder Patology**, Indianapolis, p.15-21, 2008.

TSAI, S.; WILTBANK, M. C. ProstaglandinF2 α induces expression of prostaglandin G/H Synthase-2 in the ovine corpus luteum: a potential positive feedback loop during luteolysis. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1016–1022, 1997.

TSUJII, M.; DUBOIS, R. N. Alterations in celular adhesion and apoptosis in epithelial cells over expressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. **Cell**, Cambridge, v.83, p.493-501, 1995.

WANG, W.; DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase 2 derived prostaglandin E₂ regulates the angiogenic switch. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, n.2, p.415-416, 2004.

WILLIAMS, C. S.; SMALLEY, W.; DUBOIS, R. N. Aspirin use and potential mechanisms for colorectal cancer prevention. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 100, p. 1-5, 1997.

WITHROW, S. J.; SUSANECK, S. J. Tumors of the canine female reproductive tract In: MORROW, D. A. **Current Terapy in Theriogenology**. Philadelphia: Saunders, 1986. p.521-523.

ZUCCARI, D. A. P. C. **Contribuição ao estudo imunoistoquímico dos tumores mamários em cadelas.** 1999. 122p. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, 1999.

ZUCCARI, D. A. P. C. **Estudo imunocitoquímico de marcadores diagnósticos e prognósticos em neoplasias mamárias caninas.** 2001. 92p. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, 2001.

8. ANEXOS

ANEXO 1

TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA:

Para a realização da técnica de imunoistoquímica, os blocos de parafina foram cortados em micrótomo com espessura de três micrômetros e distendidos em lâminas histológicas previamente preparadas com cola líquida a base de organolisano (A3648 – SIGMA) com o objetivo de promover maior aderência dos cortes às lâminas de vidro, evitando assim a perda de material durante a técnica de imunoistoquímica. As lâminas permaneceram em estufa a 60°C durante 24 horas e posteriormente foram submetidas aos processos descritos na sequência:

1- Desparafinização:

- Passagem em xilol I, durante 30 minutos, em temperatura ambiente;
- Passagem em xilol II, durante 20 minutos, em temperatura ambiente.

2- Hidratação:

- Passagem em álcool absoluto I / II / III, 3 minutos em cada etapa;
- Álcool a 95%, durante 3 minutos;
- Álcool a 85%, durante 3 minutos;
- Lavar em água destilada (10 vezes).

3- Recuperação antigênica:

- Passar as lâminas em água destilada levemente aquecida;
- Imergir as lâminas em solução de citrato 10mM, pH 6,0, em microondas: 3 ciclos de 5 minutos em potência máxima;
- Deixar esfriar em temperatura ambiente durante 20 minutos;

- Lavar em água destilada (10 vezes).

4- Bloqueio da peroxidase endógena:

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

5- Lavar duas vezes em solução tampão de TRIS, durante 5 minutos.

6- Incubação com o Anticorpo primário:

- Diluir o anticorpo primário em diluidor de anticorpos com propriedades redutoras de fundo (Dako – S3022) em proporção de 1:200;
- Cobrir os cortes com o anticorpo;
- Deixar as lâminas em câmara úmida durante 18hs a 4°C (geladeira);
- Lavar com solução tampão de TRIS;
- Remover o excesso de TRIS.

7- Incubação com anticorpo secundário conjugado a um polímero e moléculas de peroxidase do kit EnVision Dual-link (Dako – K4065):

- Cobrir os cortes com o anticorpo secundário;
- Deixar as lâminas em temperatura ambiente, durante 30 minutos (recomendação do fabricante);
- Lavar com solução tampão de TRIS. Tempo: 5 minutos.

8- Revelação com o substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB, pronto para uso – Dako - código K3468)

- Cobrir os cortes com o DAB;
- Tempo de DAB: 5 minutos, ao abrigo da luz
- Passar em solução tampão de TRIS;
- Lavar em água destilada (10 vezes).

9- Contra-coloração com Hematoxilina de Harris:

- Imergir as lâminas no corante;
- Tempo: 3 minutos;
- Lavar em água corrente durante 10 minutos;
- Lavar em água destilada (uma vez).

10- Desidratação dos cortes e montagem das lâminas:

- Passagem em álcool 85° e 95°;
- Passagem em álcool absoluto I / II / III – 3 minutos em cada etapa;
- Passagem em xilol I e II – 3 minutos em cada etapa;
- Montar as lâminas com resina sintética e lamínulas.

ANEXO 2

SOLUÇÕES UTILIZADAS NA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA:

TRIS solução tampão:

- 1000mL de água destilada
- 6,0g Trizma base (Sigma – código T1503).
- 8,5g cloreto de sódio
- Acertar o pH em 7,4