UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

IMUNOMARCAÇÃO DE PROTEÍNAS DE ESTRESSE (HSP 27, HSP 72 E HSP 90) E PROTEÍNA P53 EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CADELAS

Ana Carolina Barbosa de Paula
Médica Veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL
Julho de 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

IMUNOMARCAÇÃO DE PROTEÍNAS DE ESTRESSE (HSP 27, HSP 72 E HSP 90) E PROTEÍNA P53 EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CADELAS

Ana Carolina Barbosa de Paula

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Alessi

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (área de concentração Patologia Animal)

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL
Julho de 2010

Paula, Ana Carolina Barbosa de
P324i Imunomarcação de proteínas de estresse (HSP 27, HSP 72, HSP 90) e proteína P53 em neoplasias mamárias de cadelas / Ana Carolina Barbosa de Paula. – – Jaboticabal, 2010
xii, 48 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientador: Antônio Carlos Alessi
Banca examinadora: Karin Werther, Felipe Augusto Ruiz Sueiro
Bibliografia

1. Cães-HSP 2. Cães-imuno-histoquímica. 3. Cães-neoplasias mamárias. 4. Proteína P53. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:636.7

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

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: IMUNOMARCAÇÃO DE PROTEÍNAS DE ESTRESSE (HSP 27, HSP 72 E HSP 90) E PROTEÍNA P53 EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CADELAS.

AUTORA: ANA CAROLINA BARBOSA DE PAULA
ORIENTADOR: Prof. Dr. ANTONIO CARLOS ALESSI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em MEDICINA VETERINÁRIA , Área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ANTONIO CARLOS ALESSI
Departamento de Patologia Veterinaria / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. KARIN WERTHER
Departamento de Patologia Veterinaria / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. FELIPE AUGUSTO RUIZ SUEIRO
Laboratório VETPAT / Campinas/SP

Data da realização: 28 de junho de 2010.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ANA CAROLINA BARBOSA DE PAULA – Nascida na cidade de Pindamonhangaba, SP, aos 16 de Julho de 1982, filha de Neide Xavier Barbosa de Paula e José Zacarias de Paula Filho. Em Outubro de 2006 graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Durante a Graduação, nos anos de 2005 e 2006, foi bolsista do CNPq, na categoria Iniciação Científica na Unidade de Estudos em Sanidade Avícola (UESA) da UFV, onde desenvolveu projeto de pesquisa intitulado: "Produção de Anticorpos Monoclonais para diagnóstico da doença de Gumboro". No ano de 2006 aperfeiçoou-se em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais na UFV, através do Programa de Aperfeiçoamento Profissional. Entre Março de 2007 e Fevereiro de 2008 realizou o curso de Especialização *Lato Sensu* em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais na UFV. Em Março de 2008 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, junto à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp, Câmpus de Jaboticabal), área de concentração em Patologia Animal, em nível de Mestrado, sob orientação do Prof. Dr. Antônio Carlos Alessi. Em Novembro de 2008 ingressou na Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, com o cargo de Assistente Agropecuário, no EDR de Pindamonhangaba.

“Não são as respostas que movem o mundo, mas sim as perguntas.”

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Antônio Carlos Alessi, pela orientação, confiança, incentivo e, principalmente, pelos exemplos de retidão de condutas e caráter.

Ao CNPq, pela bolsa concedida durante o primeiro ano do curso.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, que de muitas formas contribuíram para a minha formação e para a realização deste trabalho.

Às técnicas do Departamento de Patologia da FCAV - Unesp Francisca de Assis Ardison e Maria Ines Yamazaki de Campos, responsáveis pela confecção das excelentes lâminas histológicas.

Aos professores Gener Tadeu Pereira e Antonio Sergio Ferraudo, da Unesp Jaboticabal, e Luiz Fernando Costa Nascimento, da Unesp Guaratinguetá e da UNITAU, pelo auxílio nas análises estatísticas e principalmente pelo gentil atendimento e pela disponibilidade.

Aos amigos da Patologia, em especial Geórgia M. Magalhães, que tanto me auxiliaram nas idas e vindas e a todos os amigos da Pós-Graduação.

Aos meus pais, que me ensinaram a ser quem sou hoje, a lutar por meus ideais e que sempre confiaram em minha capacidade.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. OBJETIVOS	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
5. RESULTADOS	19
6. DISCUSSÃO	30
7. CONCLUSÕES	36
8. REFERÊNCIAS	37

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1: Anticorpos utilizados na reação de imuno-histoquímica, seus códigos comerciais, clones e diluição..... 15

Tabela 2: Classificação e número de amostras (N) e respectivas porcentagens (%) dos tecidos mamários caninos avaliados..... 19

Tabela 3: Distribuição das 58 amostras imunomarcadas (N), para a proteína P53, positivas (N+) e negativas (N-), e suas respectivas porcentagens (%), dentro dos grupos experimentais..... 24

Tabela 4: Valores de p, para intensidade de coloração e escore proporcional da proteína P53 nos grupos experimentais avaliados, quando comparados ao controle negativo..... 25

Tabela 5: Distribuição das 58 amostras imunomarcadas, (N), para a HSP 27, positivas (N+) e negativas (N-), e suas respectivas porcentagens (%), dentro dos grupos experimentais..... 26

Tabela 6: Distribuição das 58 amostras imunomarcadas, (N), para a HSP 72, positivas (N+) e negativas (N-), e suas respectivas porcentagens (%), dentro dos grupos experimentais..... 27

Tabela 7: Valores de p, para intensidade de coloração e escore proporcional das proteínas avaliadas..... 28

Tabela 8: Valores de p, para intensidade de coloração das proteínas avaliadas..... 28

Tabela 9: Valores de p, para escore proporcional das proteínas avaliadas..... 29

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1: Fotomicrografia de carcinoma mamário simples de cadela, com marcação nuclear, em células epiteliais, para proteína P53. Método ABC, obj. 20x..... 20

Figura 2: Fotomicrografia de carcinoma mamário simples de cadela, com marcação nuclear, em células epiteliais, para proteína P53. Método ABC, obj. 20x..... 20

Figura 3: Fotomicrografia de carcinoma mamário simples de cadela, com marcação nuclear em células epiteliais, para proteína P53. Método ABC, obj. 20x..... 21

Figura 4: Fotomicrografia de carcinoma mamário complexo de cadela, com marcação nuclear em células epiteliais, para proteína P53. Método ABC, obj. 20x..... 21

Figura 5: Fotomicrografia de carcinoma mamário complexo de cadela, com marcação citoplasmática, em células epiteliais, para HSP 90. Método ABC, obj. 20x..... 22

Figura 6: Fotomicrografia de carcinoma mamário complexo de cadela, com marcação citoplasmática, em células epiteliais, para HSP 90. Método ABC, obj. 20x..... 22

Figura 7: Fotomicrografia de carcinoma mamário simples de cadela, com marcação nuclear e citoplasmática, em células epiteliais, para HSP 72. Método ABC, obj. 20x..... 23

Figura 8: Fotomicrografia de carcinoma mamário complexo de cadela, com marcação citoplasmática, em células epiteliais e endoteliais, para HSP 27. Método ABC, obj. 20x..... 23

Figura 9: Fotomicrografia de carcinoma mamário simples de cadela, com marcação citoplasmática, em células epiteliais, para HSP 27. Método ABC, obj. 20x..... 24

RESUMO

PAULA, A.C.B. **Imunomarcação de proteínas de estresse (HSP 27, HSP 72 e HSP 90) e proteína P53 em neoplasias mamárias de cadelas.** 2010. 43 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Área de Concentração Patologia Animal) - Universidade Estadual Paulista, Unesp, Jaboticabal, SP

Os tumores de mama são a principal causa de morte em cães e isso vem despertando maior interesse no desenvolvimento de estudos relacionados a este distúrbio. A proximidade com os seres humanos, tanto na convivência quanto aos hábitos, podem influenciar o aparecimento das neoplasias. A semelhança dos tumores mamários caninos com os tumores de mama da mulher leva a um interesse no estudo da patologia comparada, estimulando o uso de modelos animais. Apesar dos muitos estudos, pouco se conhece sobre o prognóstico e as causas dos tumores mamários caninos, observando-se um esforço crescente na tentativa de acrescentar aos fatores prognósticos clássicos novos parâmetros, de natureza molecular, que auxiliem a decisão clínica, à semelhança do verificado em Medicina Humana, estando entre eles os marcadores moleculares, como a proteína P53 e as proteínas de estresse. A expressão de proteína P53 e das proteínas de estresse tem sido observada em muitas neoplasias, incluindo o câncer de mama. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi investigar a imunomarcação de HSP 27, HSP 72, HSP 90 e proteína P53 em tecido mamário normal e neoplásico de cadelas e estabelecer uma relação entre a expressão destas proteínas e o grau histológico das neoplasias. Foi realizada análise estatística e o nível de significância (α) adotado foi de 5%. Dentre os tumores malignos, os carcinomas simples foram o tipo histológico predominante. Para a proteína P53, não houve diferença significativa em sua expressão entre os grupos de tumores malignos avaliados, ocorrendo o mesmo para as HSPs 27, 72 e 90. A sensibilidade do teste de imuno-histoquímica para a proteína P53, nesta amostra, foi de 67,5%, a especificidade foi de 100%, o valor preditivo positivo foi de 100%, o

valor preditivo negativo foi de 25% e acurácia do teste foi de 92%. Ainda para a proteína P53, comparando-se o grupo controle com os outros grupos, com relação à intensidade de coloração e escore proporcional, houve diferença significativa somente entre o grupo de carcinomas simples. Com relação à intensidade de coloração, testou-se a correlação entre as proteínas estudadas, observando-se que existe correlação entre P53 e HSP 27, entre HSP 27 e HSP 72 e entre HSP 72 e HSP 90. Com relação ao escore proporcional, existe correlação entre P53 e HSP 27, entre HSP 27 e HSP 72, entre HSP 27 e HSP 90 e entre HSP 72 e HSP 90. Os resultados observados demonstram a importante participação das proteínas estudadas nos processos de carcinogênese da glândula mamária canina.

PALAVRAS-CHAVE: cães, HSP, imuno-histoquímica, neoplasias mamárias, proteína P53.

ABSTRACT

PAULA, A.C.B. **Immunostaining of stress proteins (HSP 27, HSP 72 and HSP 90) and P53 protein in breast neoplasms of bitches.** 2010. 43 p. Dissertation (Master in Veterinary Medicine, Emphasis on Animal Pathology) - Universidade Estadual Paulista, UNESP, Jaboticabal, SP.

Breast tumors are the leading cause of death in dogs and this has aroused great interest in developing studies related to this disease. The proximity with humans, much as in living habits, may influence the onset of tumors. The similarity of canine mammary tumors with breast tumors of women take an interest in the study of comparative pathology, stimulating the use of animal models. Despite many studies, little is known about the prognosis and causes of canine mammary tumors, observing a growing effort in trying to add to the classic prognostic factors new parameters of molecular nature, that help the clinical decision, like that seen in Human Medicine, and among them the molecular markers such as P53 and stress proteins. The expression of P53 protein and the stress proteins has been observed in many cancers, including breast cancer. Accordingly, the purpose of this study was to investigate the immunostaining of HSP 27, HSP 72, HSP 90 and P53 protein in normal and neoplastic breast tissue of female dogs and establish a relationship between the expression of these proteins and the histological grade of tumors. Statistical analysis was performed and significance level (α) was 5%. Among the malignant tumors, simple carcinomas were the predominant histologic type. Protein P53, presented no significant difference in expression between the evaluated groups of malignant tumors, the same occurring for HSPs 27, 72 and 90. The test sensitivity of immunohistochemistry for protein P53 in this sample was 67,5%, specificity was 100%, positive predictive value was 100%, negative predictive value was 25% and accuracy of test was 92%. Although protein P53, compared to the control group with other groups in relation to staining intensity and proportion score, there was a significant difference only between the group of simple carcinomas. With regard to staining intensity, we tested the correlation

between the proteins studied, observing a correlation between P53 and HSP 27, between HSP 27 and HSP 72 and between HSP 72 and HSP 90. With respect to score, proportional correlation was observed between P53 and HSP 27, between HSP 27 and HSP 72, between HSP 27 and HSP 90 and between HSP 72 and HSP 90. The results demonstrate the important role of the studied proteins in cases of canine mammary gland carcinogenesis.

KEY WORDS: dogs, HSP, immunohistochemistry, breast cancer, P53 protein.

1. INTRODUÇÃO

Os tumores, atualmente, são uma das principais causas de morte em cães e, por isso, têm assumido grande importância em Medicina Veterinária. A incidência e a prevalência dos tumores em cães vêm crescendo consideravelmente, e acredita-se ter várias razões, estando entre elas o aumento da longevidade observada nestes animais.

Os tumores de mama na cadela têm ganhado importância nos últimos anos pela frequência com que casos deste tipo surgem na clínica de pequenos animais, já que os tumores mamários constituem a segunda forma mais comum de neoplasias em cães. Além disso, o estreitamento da convivência com os seres humanos promove correspondência em muitos aspectos que podem influenciar o aparecimento das neoplasias e também exige que estes animais sejam objetos de atenção semelhantes aos pacientes humanos. A semelhança dos tumores de mama da cadela com os tumores de mama na mulher, em diversos aspectos, leva também a um interesse no uso destes animais como modelos experimentais.

Apesar dos muitos estudos, pouco se conhece sobre o prognóstico e as causas dos tumores mamários caninos. O aumento na incidência e a variação do comportamento biológico destes tumores torna cada vez mais importante, em Medicina Veterinária, estabelecer-se o prognóstico de um animal com doença oncológica. Dessa forma, novas modalidades terapêuticas podem ser iniciadas, se aconselhadas ou não, procedendo a qualquer tratamento, evitando-se assim custos desnecessários. Além disso, tem-se assistido a um esforço crescente na tentativa de acrescentar aos fatores de prognóstico clássicos (tamanho do tumor, presença de ulceração cutânea, invasão ganglionar linfática) novos parâmetros, de natureza molecular, que auxiliem a decisão clínica, à semelhança do verificado em Medicina Humana.

As principais razões para mensuração de marcadores biológicos nas neoplasias são a de informar sobre o possível curso da doença e a de auxiliar na escolha do tratamento mais indicado. A utilização destes marcadores tem

aumentado nos últimos anos, devido aos avanços na biologia molecular e as correlações com os fatores prognósticos. Dentre esses marcadores estão as proteínas de estresse (HSPs) e a proteína P53.

A expressão da proteína P53 está associada a carcinomas mamários humanos e a mesma desempenha um papel importante na progressão de neoplasias malignas. A identificação de alterações na expressão das proteínas de estresse, dentro do processo de carcinogênese, que antecedem as alterações morfológicas características das lesões malignas, poderia ser utilizada como marcador biológico para o diagnóstico precoce dos tumores malignos. Tais marcadores poderiam também ser úteis como fator determinante da extensão da excisão cirúrgica do tumor e na pesquisa de metástases.

Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi investigar a imunomarcação de HSP 27, HSP 72, HSP 90 e proteína P53 em tecido mamário normal e neoplásico de cadelas atendidas no serviço de anatomia patológica do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV - Unesp, Jaboticabal, SP e estabelecer uma relação entre a expressão destas proteínas e o grau histológico das neoplasias.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As glândulas mamárias são glândulas sudoríparas modificadas sendo, portanto, órgãos especializados da pele, originados embriologicamente pela invaginação de brotos ectodérmicos para o interior do mesoderma subjacente. Desenvolvem-se a partir de linhas mamárias subepidermais (ou cristas mamárias) bilaterais na superfície ventro-lateral do embrião (FRANDSON, 1979; CASSALI, 2003). Em animais do sexo feminino as glândulas mamárias crescem durante o desenvolvimento fetal, aumentando após o nascimento (FRANDSON, 1979). Essas linhas estendem-se da região torácica à região inguinal. As linhas mamárias diferenciam-se então, em brotos mamários, e o número e localização desses brotos ao longo da linha mamária variam entre as espécies. Os brotos mamários, nas espécies multíparas, tais como carnívoros, lagomorfos e suínos, se desenvolvem nas regiões torácica, abdominal e inguinal. A localização dos brotos mamários determina então a localização das glândulas mamárias e estruturas associadas, tais como as papilas mamárias, vasos sanguíneos e tecido conjuntivo de sustentação (CASSALI, 2003).

A cadela possui cinco pares de glândulas mamárias (QUEIROGA & LOPES, 2002), denominadas torácicas craniais, torácicas caudais, abdominais craniais, abdominais caudais e inguinais. Todas elas apresentam a mesma organização estrutural (PELETEIRO, 1994) e são classificadas como glândula apócrina túbulo alveolar composta, consistindo de estroma (estrutura de tecido conjuntivo), parênquima (porção epitelial), ductos, vasos e nervos (FRANDSON, 1979; CASSALI, 2003).

São constituídas por alvéolo (ácino) e ducto terminal (intralobular). Alvéolos agrupados formam lóbulos separados por septos conjuntivos e os ductos terminais drenam para os ductos interlobulares nos septos conjuntivos. Os ductos interlobulares convergem pra formar os ductos lactíferos ou seio lactífero, que desembocam nas papilas mamárias (CAVALCANTI & CASSALI, 2006).

Os ductos apresentam uma dupla camada de células epiteliais cúbicas ou cilíndricas e em suas ramificações se transformam em simples cúbico ou cilíndrico (PELETEIRO, 1994). Os alvéolos das glândulas mamárias são formados por um epitélio cilíndrico simples (KOLB, 1987) e os ductos, assim como os alvéolos, são circundados por células mioepiteliais contráteis (FRANDSON, 1979).

Além do tecido epitelial, ainda há a presença de fibroblastos e células que compõem e sustentam o tecido mamário. As modificações fisiológicas da glândula mamária que ocorrem a cada ciclo podem levar ao aparecimento de alterações neoplásicas, principalmente na região epitelial. Existe uma relação direta entre as células que compõem o tecido neoplásico e o prognóstico, sendo esta formação importante no estudo dos tumores mamários (ZUCCARI *et al.*, 2001).

Os tumores da glândula mamária ocorrem comumente em cães, gatos, ratos e camundongos. Em outras espécies de animais domésticos e de laboratório esses tumores não são freqüentes. Em cadelas, os tumores mamários são a segunda neoplasia mais comum (INOUE & SHIRAMIZU, 1999; QUEIROGA & LOPES, 2002; KUMARAGURUPARAN *et al.*, 2006; PIEKARZ, *et al.*, 2008; GAMA *et al.*, 2009; HSU *et al.*, 2009; PALTIAN *et al.*, 2009), logo após os tumores de pele (QUEIROGA & LOPES, 2002; CASSALI, 2003), enquanto que em camundongos e ratos de laboratório, há variação na frequência das neoplasias mamárias entre as diferentes linhagens (CASSALI, 2003).

A prevalência das neoplasias está aumentando entre os animais domésticos (DAGLI, 2008; GAMA *et al.*, 2010), sobretudo em cães e gatos, devido ao aumento da longevidade ocasionado por um controle mais eficiente da sanidade dos animais. Além disso, o estreitamento da convivência destes animais com os seres humanos promove correspondência no estilo de vida, dieta e fatores ambientais (incluindo a poluição), o que pode contribuir para uma maior incidência dos casos de câncer (DAGLI, 2008). Sabe-se que os cães são uma das espécies mais sensíveis ao desenvolvimento espontâneo de neoplasias (DAGLI, 2008), o que torna de grande importância o uso destes animais como modelos

experimentais para o câncer em humanos (QUEIROGA & LOPES, 2002; SORENMO, 2003; SILVA *et al*., 2004; DAGLI, 2008).

Os tumores mamários correspondem à metade de todos os tumores em cadelas e cerca de 40-50% deles são considerados malignos (LEE *et al.*, 2004; PINHO *et al*., 2007; PIEKARZ, *et al.*, 2008; QIU *et al*., 2008; HSU *et al*., 2009; OLIVEIRA *et al*., 2009).

A incidência dos tumores mamários humanos e caninos aumenta com a idade (KUMARAGURUPARAN *et al*., 2006). Segundo Cassali (2003), Sorenmo (2003) e Cavalcanti & Cassali (2006), a população de risco é constituída por cadelas entre os 6 e os 12 anos de idade, sendo a idade de maior susceptibilidade entre os 9 e os 11 anos, sem predisposição racial específica.

O diagnóstico dos tumores mamários é baseado na idade, histórico reprodutivo e sinais clínicos, seguido da excisão cirúrgica para que se realize então o diagnóstico histopatológico, em que se determina o tipo histológico, o grau de malignidade e o estadiamento clínico. A partir deste diagnóstico é que se torna possível estimar um prognóstico para o paciente em questão (MAGALHÃES, 2010).

Tanto em humanos quanto nos cães, a maioria dos tumores malignos de mama surge a partir de tecido epitelial e provoca metástase nos pulmões e/ou outros órgãos (KUMARAGURUPARAN *et al*., 2006). A progressão do câncer de mama depende da capacidade de invasão e de produzir metástase em locais distantes (DERKSEN *et al*., 2006). Todos os tumores mamários malignos tem potencial para produzir metástases e em geral, estas ocorrem via linfática, para os linfonodos regionais, ou hematógena, para os pulmões (QUEIROGA & LOPES, 2002; PINHO *et al*., 2007).

Apesar das intensas investigações, muito pouco se conhece sobre o prognóstico e as causas dos tumores mamários caninos (INOUE & SHIRAMIZU, 1999; LEE *et al.*, 2004). A incidência aumentada dos tumores mamários caninos e sua complexidade tem aumentado o interesse no estudo dos fatores prognósticos, mas a variação no comportamento biológico dos mesmo dificulta essa

determinação (CAVALCANTI & CASSALI, 2006; PIEKARZ, *et al.*, 2008). A classificação histológica, a invasão sanguínea e/ou dos vasos linfáticos e as metástases têm sido correlacionadas com o prognóstico (DAGLI, 2008).

Dentre os fatores prognósticos identificados nos tumores de mama de cadelas encontram-se: idade, tamanho e estágio da neoplasia, comportamento clínico do tumor, tipo histológico, grau histológico do tumor, status dos receptores de estrógeno, densidade dos microvasos e alterações genéticas moleculares (SORENMO, 2003). Em Medicina Veterinária é difícil a comparação dos resultados de tipos histológicos, pois os autores divergem quanto às características morfológicas na classificação dos tumores de mama (BENJAMIM & SAUNDERS, 1999). Estudos comprovam que o grau histológico tende a ser o mais objetivo indicador prognóstico de malignidade (ELSTON & ELLIS, 1991).

Os recentes avanços com relação à biologia dos tumores levaram a identificação de marcadores que podem servir de base para a classificação dos mesmos (LEE *et al.*, 2004).

Os marcadores tumorais, ou marcadores biológicos, são macromoléculas presentes nos tumores, sangue ou outros fluidos biológicos, produzidos pelo próprio tumor ou pelo paciente, em resposta à presença do tumor (EISENBERG & KOIFMAN, 2001; REIS, 2005; ANDRIOLO, 2008). São componentes celulares, estruturais e bioquímicos, que podem definir alterações celulares e moleculares tanto em células normais quanto nas associadas à transformação maligna (CAPELOZZI, 2001). Consistem em indicadores bioquímicos da presença do tumor, incluindo antígenos de superfície, proteínas citoplasmáticas, enzimas e hormônios (MATOS *et al.*, 2005).

Estes marcadores foram primeiramente descritos em 1847, por Sir Bence Jones, que identificou uma proteína específica na urina de doentes com mieloma múltiplo (CAPELOZZI, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2007).

O marcador ideal deve ser produzido por todos os tumores de mesma linhagem e seus níveis devem ser mensuráveis mesmo com pouca quantidade de células neoplásicas. Os níveis séricos devem refletir precisamente a evolução

clínica ou regressão da doença. Deve ser sensível e específico, com níveis proporcionais ao tamanho do tumor, ser útil para se estabelecer um prognóstico e auxiliar na seleção do tratamento. Nenhum dos marcadores até hoje estudados possui todos estes requisitos (PACHECO, 2002; REIS, 2005).

Existem dois principais motivos para mensuração dos marcadores tumorais: fornecer informações sobre o provável curso da doença e auxiliar na seleção do melhor tratamento (BARNES *et al*., 1993). A detecção de marcadores tumorais é fundamental para o diagnóstico das neoplasias, assim como a presença de metástases e na decisão do tratamento e terapias adjuvantes (MATOS *et al.*, 2005), além da detecção precoce de recidivas (ANDRIOLO, 2008).

A utilização desses marcadores para determinação do prognóstico das neoplasias mamárias tem crescido nos últimos anos, devido aos avanços na biologia molecular e evidências de correlação com o grau de malignidade tumoral e evolução clínica (QUEIROGA & LOPES, 2002; CAVALCANTI & CASSALI, 2006; PIEKARZ, *et al.*, 2008), mas deve-se ter cuidado ao se lidar com os mesmos, sendo necessários mais estudos que confirmem as associações entre eles e outros fatores prognósticos importantes para o câncer de mama (EISENBERG & KOIFMAN, 2001). Mesmo com os estudos comprovando a correlação dos marcadores com o grau de malignidade e evolução clínica, sua aplicabilidade na Veterinária ainda é pequena, devido aos altos custos (CAVALCANTI & CASSALI, 2006).

A Medicina Veterinária tem melhorado progressivamente seu espectro terapêutico, especialmente na área da Oncologia, exigindo um diagnóstico mais preciso. Com isso, os patologistas veterinários atentaram para a necessidade de melhorar a aplicação da imuno-histoquímica em sua rotina diária, seguindo a tendência de diagnóstico da Patologia Humana (SUEIRO *et al.*, 2005).

Ao longo da evolução, as células dos mamíferos desenvolveram mecanismos de manutenção da integridade genômica. A proteína P53 é uma das moléculas de maior destaque, sendo considerada a "guardiã do genoma" por seu envolvimento em processos críticos para preservar e manter a integridade

genômica e a homeostase celular (SILVA *et al*., 2004; MOLL *et al*., 2005; HUSSAIN & HARRIS, 2006). Se ocorrerem falhas nestes mecanismos de segurança, uma das consequências pode ser o desenvolvimento do câncer (HUSSAIN & HARRIS, 2006). O câncer é um processo de vários estágios, que envolvem a inativação de genes supressores de tumor e a ativação de oncogenes (HUSSAIN *et al*., 2001; ANDRIOLO, 2008).

Os antioncogenes ou genes supressores são sistemas de controle que os organismos possuem, para evitar a instalação e desenvolvimentos das neoplasias. Os produtos destes genes modulam o crescimento celular com a regulação da divisão e da diferenciação, reparando e sintetizando DNA e induzindo à apoptose, no caso de lesões extensas no DNA (MATOS *et al*., 2005).

Há muito interesse no efeito da presença de oncogenes e genes supressores de tumor na etiologia e progressão de diversos tipos de carcinomas (BARNES *et al,*, 1993). Acredita-se que as mutações do gene p53 são as alterações genéticas mais comuns em tumores mamários humanos e caninos (BARNES *et al*., 1993; ERIKSSON *et al*., 1994; EISENBERG & KOIFMAN, 2001; HUSSAIN *et al*., 2001; SORENMO, 2003; LEE *et al*., 2004; SUEIRO *et* al., 2004; KELLER *et al*., 2007), aparecendo em cerca de metade dos casos de câncer humano (HUSSAIN *et al*., 2001; SANGRAJRANG *et* al., 2003; FUSTER *et al*., 2007).

Em vários estudos, uma associação entre expressão aumentada de proteína P53 e o prognóstico do câncer de mama foi encontrada (ERIKSSON *et al*., 1994; KELLER *et al*., 2007). Muitos estudos relatam ainda que sua mutação está relacionada à progressão do tumor e também estão associadas a tumores mais agressivos e a um pior prognóstico (EISENBERG & KOIFMAN, 2001; LEE *et al*., 2004). A imunodetecção desta proteína no câncer de mama parece estar relacionada a um pior prognóstico e associada a um alto grau histológico, à positividade do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e negatividade de Bcl-2 e receptor estrogênico (MEGHA *et al*., 2002).

O gene supressor de tumor p53, localizado no cromossomo 17p13.1, codifica uma fosfoproteína de 53 kDa que desempenha um importante papel no controle do ciclo celular e previne o aparecimento do câncer. Foi identificado pela primeira vez por Lane, em 1990, e, como já dito, codifica uma fosfoproteína nuclear que se expressa, em níveis baixos, em todas as células normais (ERIKSSON *et al.*, 1994). A proteína P53 tipo "primitiva" não se acumula nas células, por ter uma meia-vida curta, de 20 a 30 minutos. Assim, é indetectável por meio de imuno-histoquímica. Em contrapartida, a proteína P53 "mutante" tem uma meia-vida significativamente mais longa, se acumulando no núcleo, podendo assim ser evidenciada através de métodos imuno-histoquímicos (ERIKSSON *et al.*, 1994; NAKANISHI *et al.*, 1996; INOUE & SHIRAMIZU, 1999; SANGRAJRANG *et al.*, 2003; KELLER *et al*., 2007). Além disso, forma complexos estáveis com as proteínas de choque térmico (HSP 70) e outras proteínas (FINLAY *et al.*, 1988; NAGAO *et al.*, 1995). Por esta razão, a detecção desta oncoproteína é um indicativo indireto de uma mutação no gene p53 (NAKANISHI *et al.*, 1996; INOUE & SHIRAMIZU, 1999; EISENBERG & KOIFMAN, 2001; SORENMO, 2003). Uma boa correlação entre os resultados de imuno-histoquímica e ocorrência de mutação, com detecção por métodos moleculares, tem sido observadas em tumores que apresentam pelo menos 25% de células imunomarcadas (EISENBERG & KOIFMAN, 2001). Com o uso de anticorpos específicos, pode-se obter evidências de que a expressão aumentada dessa proteína está associada à desdiferenciação das células tumorais. Em muitos estudos encontrou-se correlação entre a expressão aumentada da proteína p53 e o prognóstico, em casos de tumor de mama (ERIKSSON *et al.*, 1994).

A função da proteína P53 normal ainda não está totalmente clara, mas esta parece inibir a progressão de células da fase G1 para a fase S (ERIKSSON *et al.*, 1994; NAGAO *et al.*, 1995; SILVA *et al*., 2004). A proteína P53 tem o papel de bloquear a divisão celular em células que sofreram injúrias no seu DNA (INOUE & SHIRAMIZU, 1999; SILVA *et al*., 2004; KELLER *et al*., 2007, COLEGROVE *et al*., 2009), dando tempo para a sua reparação; se esta falha, a expressão mantida do

gene p53 dispara a cascata da apoptose (EISENBERG & KOIFMAN, 2001; HUSSAIN *et al*., 2001; SILVA *et al*., 2004; KELLER *et al*., 2007; COLEGROVE *et al*., 2009). A perda da função desse gene pode estar relacionada tanto à iniciação quanto à progressão tumoral (EISENBERG & KOIFMAN, 2001).

O gene p53 foi primeiramente associado com carcinomas mamários, em 1982, quando Crawford *et al.* informaram que 9% de uma série de pacientes com câncer de mama tinham anticorpos circulantes da proteína P53. Desde então, anticorpos monoclonais e policlonais contra a proteína P53 humana foram gerados. Através do uso destes anticorpos, foram obtidas provas de que a expressão aumentada da proteína P53 é significativamente associada com a desdiferenciação das células tumorais e com a proliferação celular em carcinomas mamários humanos (ERIKSSON *et al.*, 1994; INOUE & SHIRAMIZU, 1999).

A exposição dos tecidos a fatores estressantes interfere no funcionamento celular, promovendo alterações na homeostase. As células desenvolveram inúmeras estratégias para lidar com as mudanças adversas em seu ambiente, na tentativa de promover a manutenção de sua integridade. Dentre essas estratégias estão as proteínas de stress ou proteínas de choque térmico (HSPs) (WELCH, 1992; PROHÁSZKA & FÜST, 2004).

Como o próprio nome sugere, HSPs são induzidas em células expostas a choques térmicos subletais. O primeiro relato sobre essas proteínas ocorreu em 1962, por Ritossa. Após as células das glândulas salivares da *Drosophila* serem submetidas a temperatura de 37ºC por 30min e depois retornar a temperatura normal de 25ºC, observou-se a expressão de um conjunto de genes no cromossomo das células recuperadas, acompanhada do aumento da expressão de proteínas com pesos moleculares de 26 e 70 kDa. Essas proteínas foram então denominadas de proteínas de “choque térmico” (KIANG & TSOKOS, 1998; WHITLEY *et al*., 1999; SREEDHAR & CSERMELY, 2004; DAUGAARD *et al*., 2007; MULTHOFF, 2007).

O choque térmico não é o único estímulo que pode induzir e aumentar a síntese destas proteínas (KIANG & TSOKOS, 1998). Estresses ambientais e

metabólicos, anóxia, isquemia, etanol, agentes virais, análogos de aminoácidos, metais pesados, ionóforos e inúmeros produtos do metabolismo também podem ser responsáveis pelo aumento na expressão das HSPs (WELCH, 1992; WHITLEY *et al*., 1999; MULTHOFF, 2007). A maioria destas proteínas são, na verdade, expressas constitutivamente nas células normais (WELCH, 1992; PROHÁSZKA & FÜST, 2004), participando de uma série de importantes vias biológicas (WELCH, 1992), como o ciclo celular, desenvolvimento e diferenciação celular. Além disso, estão envolvidas no metabolismo, morte celular programada através da montagem de proteínas e transporte e influência na ativação de enzimas e receptores (PROHÁSZKA & FÜST, 2004).

As HSPs são classificadas em famílias, de acordo com seu peso molecular aproximado: HSP 27, HSP 60, HSP 70, HSP 90 e HSP 104 (PRZEPIORKA & SRIVASTAVA, 1998; WHITLEY *et al*., 1999; PROHÁSZKA & FÜST, 2004; SREEDHAR & CSERMELY, 2004; ROMANUCCI *et al*., 2006; BEACHY *et al*., 2007).

As “small HSP” (sHSP) constituem uma família de proteínas com peso molecular entre 12 e 43 kDa, que podem formar estruturas multimétricas e exibir uma ampla gama de funções celulares. (HORVÁTH *et al*., 2008). A HSP 27 é uma proteína associada à actina, predominantemente expressa na pele e células normais de órgãos alvo de estrógeno (ROMANUCCI *et al*., 2006). O estresse fisiológico aumenta a fosforilação de HSP 27 (WHITLEY *et al*., 1999).

Os membros da família HSP 70 são os mais extensivamente estudados (BOONE & VIJAYAN, 2002; ASEA, 2007; WISÉN & GESTWICKI, 2008). Alguns membros são expressos constitutivamente (HSP 73) e outros induzidos exclusivamente por estresse (HSP 72) (WHITLEY *et al*., 1999; BEERE *et al*., 2000; ROMANUCCI *et al*., 2006), localizados tanto no citoplasma quanto no núcleo de células de todos os tecidos (ROMANUCCI *et al*., 2006). A forma induzida da HSP 70 é expressa em níveis basais, mas é rapidamente induzida pelo calor e outros estresses, além da progressão do ciclo celular (BEERE *et al*., 2000).

Os membros da família HSP 90 são as proteínas mais abundantes nas células dos mamíferos (WHITLEY *et al*., 1999; ROMANUCCI *et al*., 2006; POWERS & WORKMAN, 2007; FERRARIO & GOMER, 2009), compondo de 1 a 2% das proteínas do citosol (POWERS & WORKMAN, 2007), mas sua síntese ainda aumenta com o estresse (WHITLEY *et al*., 1999). A família é composta de duas isoformas: HSP 90α (forma indutível) e HSP 90β (forma constitutiva) (ROMANUCCI *et al*., 2006).

As HSPs são uma das classes mais evolutivamente conservadas de moléculas e desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostase celular (WELCH, 1992; WHITLEY *et al*., 1999; BOONE & VIJAYAN, 2002; SREEDHAR & CSERMELY, 2004; ROMANUCCI *et al*., 2006; BEACHY *et al*., 2007). Em condições fisiológicas, atuam como "chaperonas moleculares", auxiliando no dobramento de proteínas, transporte e degradação (KIANG & TSOKOS, 1998; WHITLEY *et al*., 1999; BOONE & VIJAYAN, 2002). Por outro lado, durante o estresse, evitam a agregação e promovem a renaturação de proteínas danificadas. Estão presentes no citoplasma, mitocôndrias, retículo endoplasmático e núcleo das células (KIANG & TSOKOS, 1998; BEACHY *et al*., 2007), normalmente apresentando uma meia vida longa, de aproximadamente 48h (KIANG & TSOKOS, 1998).

Suas funções incluem o transporte de outras proteínas entre os compartimentos intracelulares, facilitação de mudanças na estrutura da proteína secundária e terciária e montagem de multímeros de proteínas (PRZEPIORKA & SRIVASTAVA, 1998; BEACHY *et al*., 2007).

Níveis anormais destas proteínas podem ser encontrados em inúmeras desordens como arterosclerose, insuficiência cardíaca congestiva, febre, infecções, idade, mal de Alzheimer, neoplasias e doenças auto-imunes (WHITLEY *et al*., 1999). As células tumorais parecem ser dependentes de níveis elevados destas proteínas, uma vez que a expressão elevada de diferentes HSPs tem sido observada em várias neoplasias. A possível relação entre a expressão anormal e o prognóstico da doença ou uma resposta a uma terapia específica tem sido muito

estudada. Sugere-se também que as HSPs estão diretamente relacionadas à resistência a drogas utilizadas nos tratamentos do câncer de mama. No entanto, estas proteínas parecem ser promissores alvos terapêuticos para vários tipos de tumores, incluindo os de mama (ROMANUCCI *et al*., 2006).

3. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- Investigar a imunomarcação de HSP 27, HSP 72, HSP 90 e proteína P53 em tecido mamário normal e neoplásico de cadelas;
- Estabelecer uma relação entre a expressão destas proteínas e o grau histológico das neoplasias;

4. MATERIAL E MÉTODOS

As atividades experimentais foram realizadas no Departamento de Patologia Veterinária (DPVE) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) Unesp - Jaboticabal.

Foram coletadas amostras de tecido mamário de cinco cadelas sem histórico de neoplasia mamária, provenientes do serviço de anatomopatologia do DPVE - Unesp - Jaboticabal, que constituíram o grupo controle (C). As amostras de tumores mamários foram adquiridas do arquivo do DPVE - Unesp - Jaboticabal, classificadas e divididas nos seguintes grupos experimentais: tumores benignos (TB), carcinomas simples (CS) e carcinomas complexos (CC) .

As amostras foram fixadas em formol tamponado a 10%, por 18 a 24hs, incluídas em parafina e cortadas em micrótomo calibrado para cortes de 5µm, sendo coradas com hematoxilina-eosina (HE) e analisadas em microscópio de luz.

Os parâmetros utilizados para determinar a presença de neoplasia foram: densidade celular, arquitetura das células, dimensões dos núcleos e figuras de mitoses. Posteriormente, as neoplasias foram classificadas de acordo com o critério da Organização Mundial da Saúde (OMS) para as neoplasias mamárias (MISDORP *et al.*, 1999) e graduadas segundo o sistema de Elston & Ellis (1991).

Na análise imuno-histoquímica foram utilizados os anticorpos contra HSP 27, HSP 72, HSP 90 e P53 (Tabela 1).

Tabela 1: Anticorpos utilizados na reação de imuno-histoquímica, seus códigos comerciais, clones e diluição.

Proteína	Marca	Código	Clone	Diluição
HSP 27	Assay Designs	SPA-585 F	(Policlonal)	1:600
HSP 72	Assay Designs	SPA-810 J	C92F3A-5	1:100
HSP 90	Assay Designs	SPA-830 F	AC88	1:2500
P53	Assay Designs	KAM-CC002 F	PAb122	1:500

Os cortes de tecido com 5µm foram desparafinizados, mantendo-os em estufa a 60ºC, por pelo menos 1h, passados em bateria de xilol e álcool (para término da desparafinização e reidratação, respectivamente) e, então, incubados em câmara escura, por 30min em uma solução a 2% ou 8% de peróxido de hidrogênio em metanol absoluto (para as HSPs e P53, respectivamente), para bloqueio da peroxidase endógena. A recuperação antigênica foi através de calor úmido (*steamer* a 100ºC, por 20min, em Tampão Citrato, pH 6,0). A seguir, os sítios inespecíficos foram bloqueados incubando-se as lâminas com Protein Block (Dako, X0909), por 30min, a temperatura ambiente, em câmara úmida e escura, antes da incubação overnight com anticorpo primário, também em câmara úmida, a 4ºC. Decorrido o tempo e após estabilização da temperatura (15min em temperatura ambiente), os complexos imunes foram tratados com um anticorpo secundário biotinilado, incubando-os por 30min, em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente. Em seguida procedeu-se a incubação com o complexo streptoavidina-peroxidase, em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente, por 30min. No caso do P53, foi utilizado o Advance®. A atividade da peroxidase foi detectada utilizando-se 0,1% de peróxido de hidrogênio em solução de 3-3'-diaminobenzidina (DAB, Dako K3468) aplicados aos cortes de tecido por 2min. Foi realizada contracoloração com hematoxilina de Harris por 30s, antes da lavagem (por 10min em água corrente), desidratação e montagem.

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (Nikon E200), com equipamento de fotomicrografia digital. A imunomarcação das proteína foi avaliada, primeiramente, considerando-se a presença ou ausência de marcação (positivo ou negativo). A expressão das proteínas foi avaliada baseando-se na intensidade de coloração e escore proporcional. A intensidade de coloração foi determinada através de ranqueamento, como se segue: 0 - sem coloração; 1 - leve; 2 - moderada e 3 - intensamente corado, segundo o proposto por Amorim *et al.* (2010). Todas as amostras testadas para as HSPs apresentavam controle interno positivo (pele), que foi considerada com intensidade 2. O escore proporcional foi determinado através da contagem aleatória de 100 células, em

quatro campos, em aumento de 400x e a porcentagem de células positivas foi distribuída nas faixas: 0 - zero; 1 - < 25%; 2 - 26-50%; 3 - 51-75% e 4 - > 76%, de acordo com o proposto por Barnes *et al.* (1993).

Com os resultados positivos e negativos de imunomarcação da proteína P53 foram obtidos os valores de sensibilidade (S), especificidade (E), valores preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN) e acurácia (A) da reação de imuno-histoquímica, de acordo com as fórmulas listadas a seguir (PEREIRA, 1995):

$$S\ (\%) = [(VP) / (VP + FN)] \times 100$$
$$E\ (\%) = [(VP) / (VP + FP)] \times 100$$
$$VPP\ (\%) = [(VP) / (VP + FP)] \times 100$$
$$VPN\ (\%) = [(VN) / (VN + FN)] \times 100$$
$$A\ (\%) = [a + d] / N$$

onde:

VP= verdadeiros positivos;

VN = verdadeiros negativos;

FP = falsos positivos;

FN = falsos negativos

	Doentes	Não doentes	
Testes -	a	b	
Testes +	c	d	
			Total (N)

A análise estatística utilizou a técnica da análise de variância (ANOVA) para comparação de três ou mais grupos, o teste *t* de Student, para comparação de dois grupos, e a correlação de Pearson. No caso das variáveis não apresentarem distribuição normal, foram utilizados os testes de Kruskall-Wallis, Mann-Whitney e a correlação de Spearman. O nível de significância (α) adotado foi de 5%. O programa computacional utilizado para a análise foi o SPSS v15.0, versão para estudantes.

5. RESULTADOS

As amostras obtidas neste estudo foram classificadas em: tecido mamário normal (cinco amostras), tumores benignos simples (quatro amostras), tumores benignos mistos (seis amostras), carcinomas simples (28 amostras) e carcinomas complexos (15 amostras), conforme relacionado na Tabela 2.

Tabela 2: Classificação e número de amostras (N) e respectivas porcentagens (%) dos tecidos mamários caninos avaliados.

Diagnóstico Histopatológico	**N (%)**
Tecido mamário normal (C)	5 (100,0)
Total Parcial	5 (100,0)
Tumores Benignos (TB)	
Simples	4 (40,0)
Mistos	6 (60,0)
Total Parcial	10 (100,0)
Tumores Malignos	
Carcinomas simples (CS)	28 (65,12)
Carcinomas complexos (CC)	15 (34,88)
Total Parcial	43 (100,0)
Total Geral	58 (100,0)

Realizou-se a reação de imuno-histoquímica, para observação da presença de marcação, para as proteínas que constituíram o presente estudo. Os resultados podem ser observados nas Figuras 1 a 9.

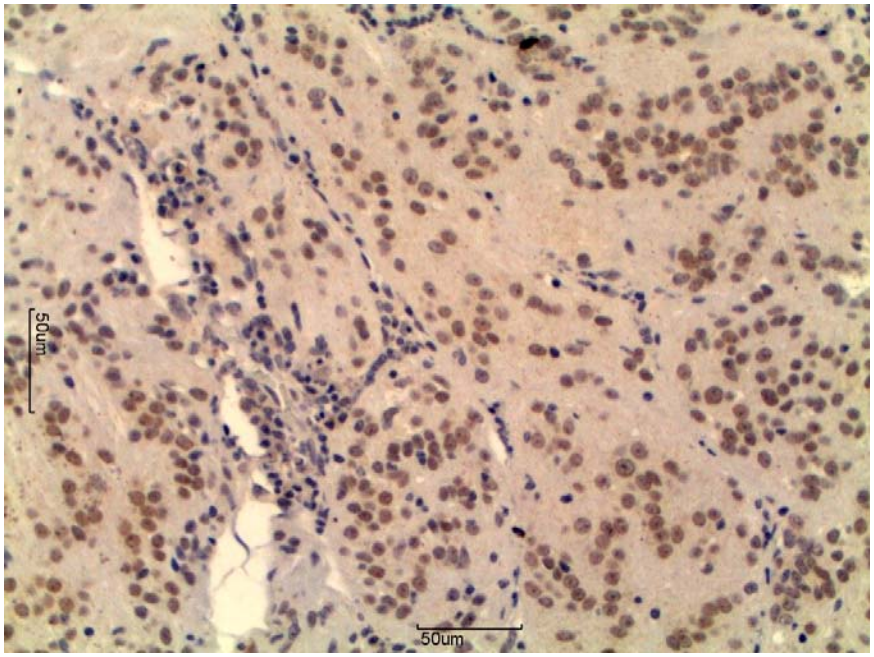

Figura 1: Fotomicrografia de carcinoma mamário simples de cadela, com marcação nuclear, em células epiteliais, para proteína P53. Método ABC, obj. 20x.

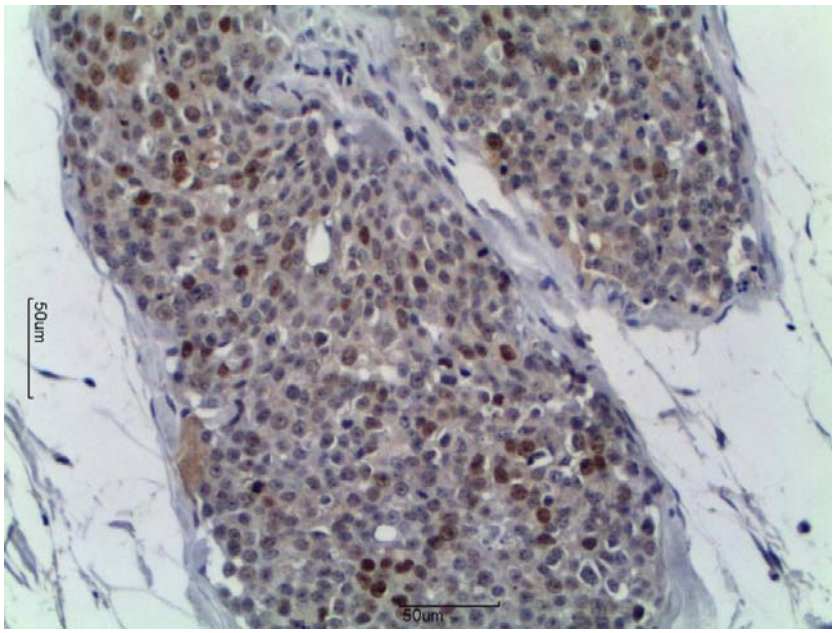

Figura 2: Fotomicrografia de carcinoma mamário simples de cadela, com marcação nuclear, em células epiteliais, para proteína P53. Método ABC, obj. 20x.

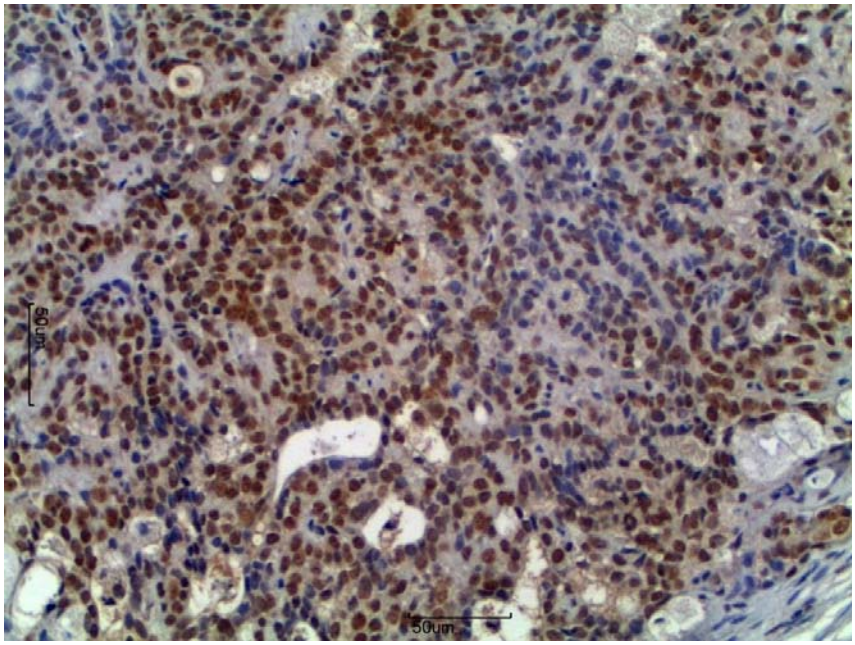

Figura 3: Fotomicrografia de carcinoma mamário simples de cadela, com marcação nuclear em células epiteliais, para proteína P53. Método ABC, obj. 20x.

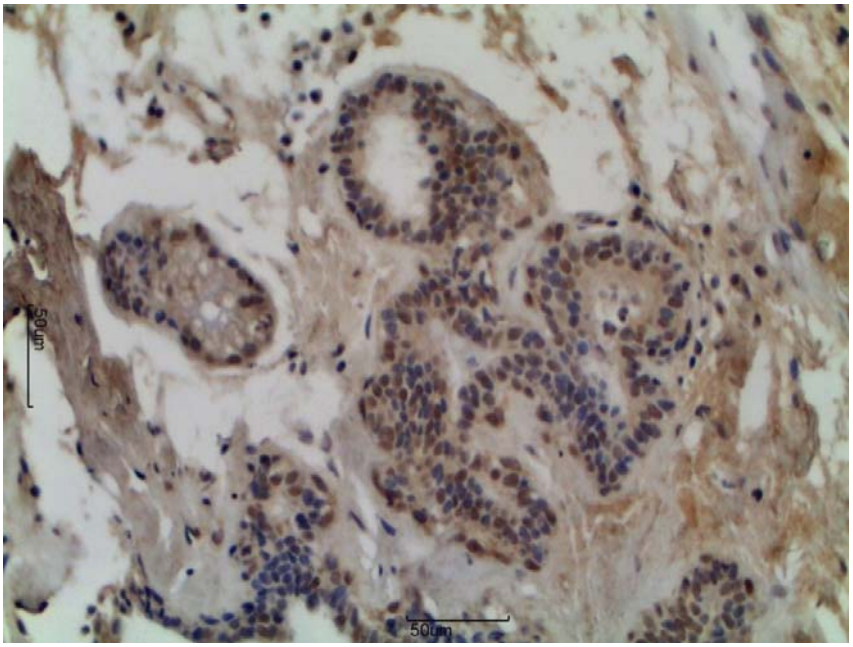

Figura 4: Fotomicrografia de carcinoma mamário complexo de cadela, com marcação nuclear em células epiteliais, para proteína P53. Método ABC, obj. 20x.

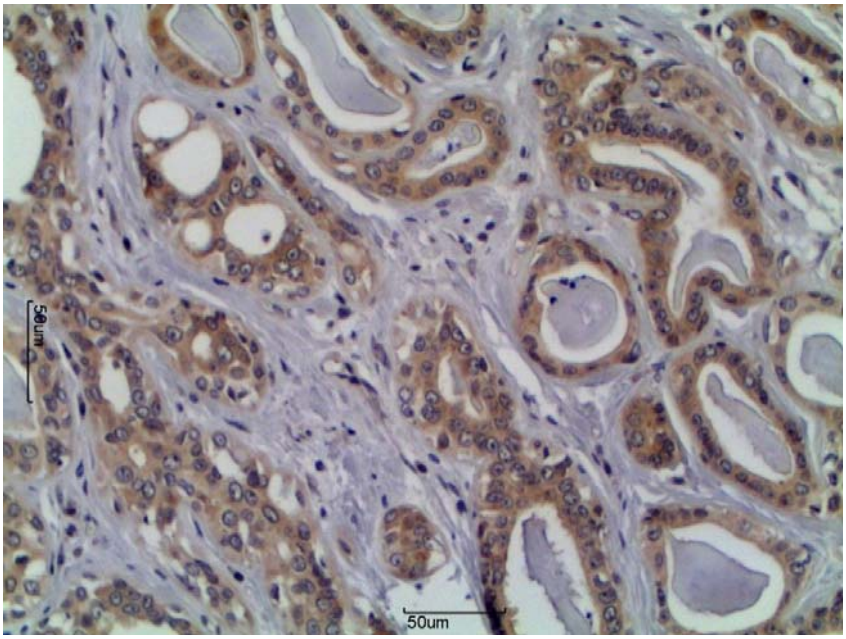

Figura 5: Fotomicrografia de carcinoma mamário complexo de cadela, com marcação citoplasmática, em células epiteliais, para HSP 90. Método ABC, obj. 20x.

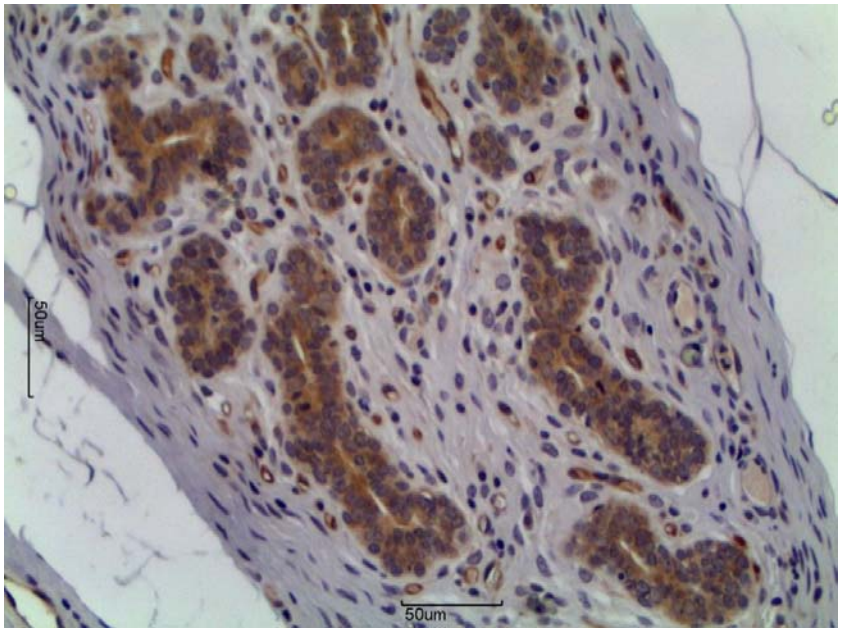

Figura 6: Fotomicrografia de carcinoma mamário complexo de cadela, com marcação citoplasmática, em células epiteliais, para HSP 90. Método ABC, obj. 20x.

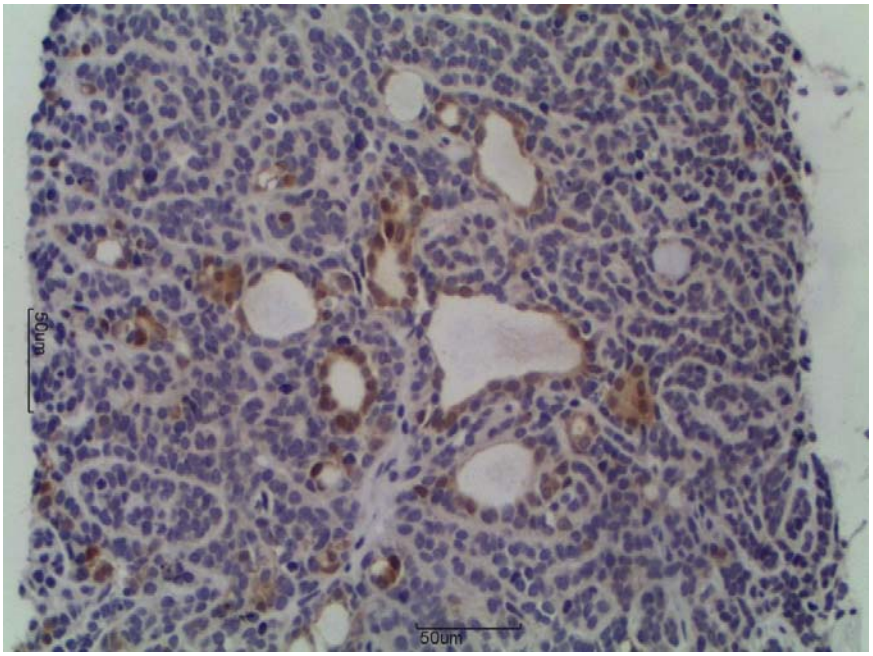

Figura 7: Fotomicrografia de carcinoma mamário simples de cadela, com marcação nuclear e citoplasmática, em células epiteliais, para HSP 72. Método ABC, obj. 20x.

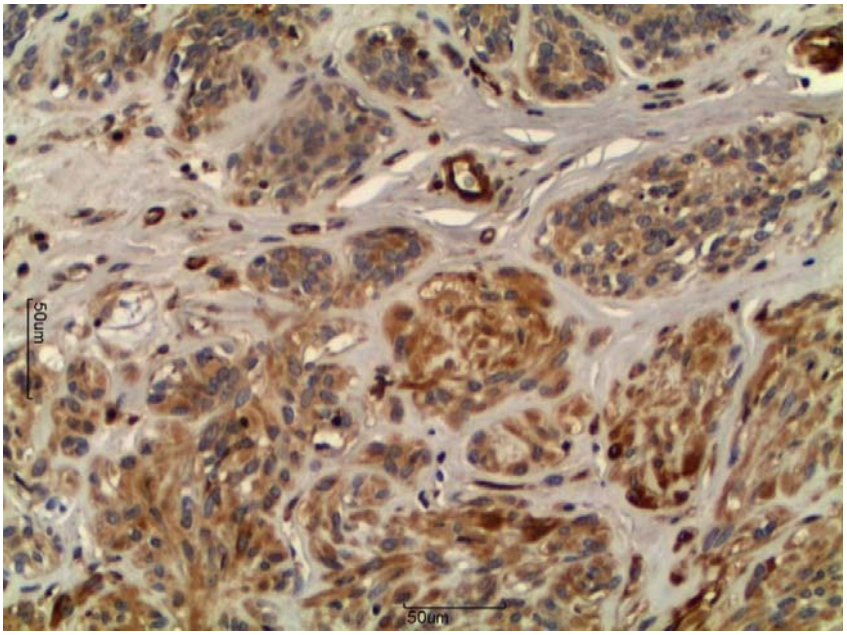

Figura 8: Fotomicrografia de carcinoma mamário complexo de cadela, com marcação citoplasmática, em células epiteliais e endoteliais, para HSP 27. Método ABC, obj. 20x.

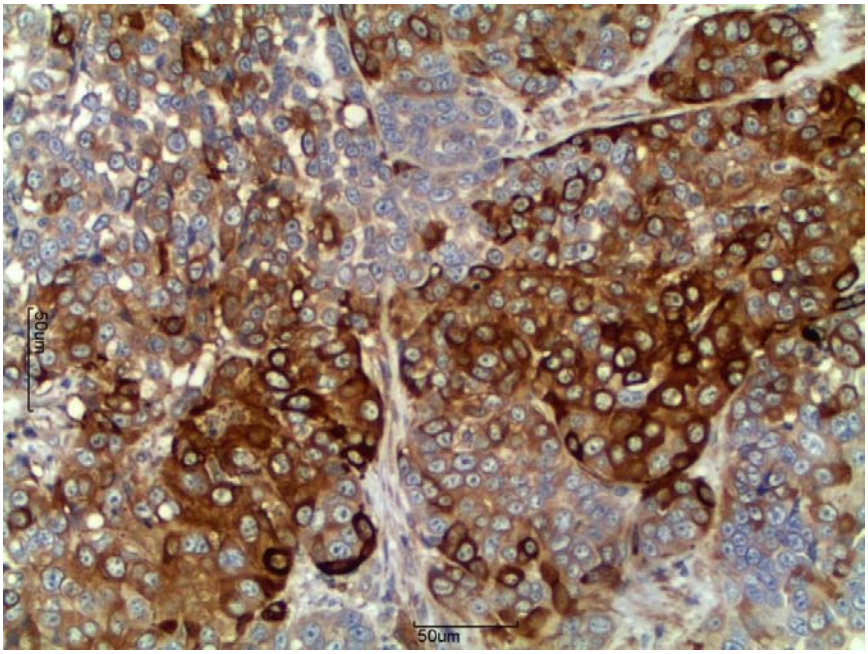

Figura 9: Fotomicrografia de carcinoma mamário simples de cadela, com marcação citoplasmática, em células epiteliais, para HSP 27. Método ABC, obj. 20x.

Para a proteína P53, observou-se a imunomarcação apresentadas pelas 58 amostras e esta teve sua distribuição de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3: Distribuição das 58 amostras imunomarcadas (N), para a proteína P53, positivas (N+) e negativas (N-), e suas respectivas porcentagens (%), dentro dos grupos experimentais.

Diagnóstico Histopatológico	**N**	**N+ (%)**	**N- (%)**
C*	5	0 (0,0)	5 (100)
TB	10	0 (0,0)	10 (100)
Tumores Malignos			
CS	28	19 (67,86)	9 (32,14)
CC	15	10 (66,67)	5 (33,33)
Total	43		
Total	58		

*C = tecido mamário normal; TB = tumores benignos; CS = carcinomas simples; CC = carcinomas complexos

Não houve diferença significativa na expressão da proteína P53 no grupo dos tumores malignos, de acordo com a classificação histológica (p = 0,89).

Com relação ao escore proporcional para a proteína P53, os grupos CS e CC tiveram média de escore proporcional 1, ou seja, menos de 25% das células apresentavam coloração. Os grupos C e TB não apresentaram marcação.

Para a proteína P53, comparando-se os grupos avaliados com o controle negativo (C), com relação à IC e EP, houve diferença significativa somente entre C e CS, de acordo com as Tabela 4.

Tabela 4: Valores de p, para intensidade de coloração e escore proporcional da proteína P53 nos grupos experimentais avaliados, quando comparados ao controle negativo.

Grupos	**IC***	**EP**
	p	**p**
TB	1,00	1,00
CS	0,049	0,077
CC	0,116	0,690

*IC = intensidade de coloração; EP = escore proporcional; TB = tumores benignos; CS = carcinomas simples; CC = carcinomas complexos

A sensibilidade do teste de imuno-histoquímica para a proteína P53, nesta amostra, foi de 67,5%, a especificidade foi de 100%, o VPP foi de 100%, o VPN foi de 25% e acurácia do teste foi de 92%.

Para a HSP 27, observou-se a imunomarcação apresentada pelas 58 amostras e esta teve sua distribuição de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5: Distribuição das 58 amostras imunomarcadas, (N), para a HSP 27, positivas (N+) e negativas (N-), e suas respectivas porcentagens (%), dentro dos grupos experimentais.

Diagnóstico Histopatológico	**N**	**N+ (%)**	**N- (%)**
C*	5	4 (80,0)	1 (20,0)
TB	10	10 (100,0)	0 (0,0)
Tumores Malignos			
CS	28	28 (100,0)	0 (0,0)
CC	13	13 (100,0)	0 (0,0)
Total	43		
Total	58		

*C = tecido mamário normal; TB = tumores benignos; CS = carcinomas simples; CC = carcinomas complexos

Não houve diferença significativa na expressão da proteína HSP 27 no grupo dos tumores malignos, de acordo com a classificação histológica (p=0,319).

Com relação ao escore proporcional para a HSP 27, os grupos tiveram média de escore proporcional 3, ou seja, entre 51 e 75% das células apresentavam coloração.

Para a HSP 72, observou-se a imunomarcação apresentadas pelas 58 amostras e esta teve sua distribuição de acordo com a Tabela 6.

Tabela 6: Distribuição das 58 amostras imunomarcadas, (N), para a HSP 72, positivas (N+) e negativas (N-), e suas respectivas porcentagens (%), dentro dos grupos experimentais.

Diagnóstico Histopatológico	**N**	**N+ (%)**	**N- (%)**
C*	5	3 (60,0)	2(40,0)
TB	10	9 (90,0)	1 (10,0)
Tumores Malignos			
CS	28	27 (96,43)	1(3,57)
CC	13	13 (100,0)	0 (0,0)
Total	43		
Total	58		

*C = tecido mamário normal; TB = tumores benignos; CS = carcinomas simples; CC = carcinomas complexos

Não houve diferença significativa na expressão da proteína HSP 72 no grupo dos tumores malignos, de acordo com o grau histológico (p=0,833).

Com relação ao escore proporcional para a HSP 72, os grupos tiveram média de escore proporcional 2, ou seja, entre 26 e 50% das células apresentavam coloração.

Para a HSP 90, todas as amostras apresentaram imunomarcação e a média de escore proporcional foi de 3, ou seja, entre 51 e 75% das células apresentavam coloração. Não houve diferença significativa entre os grupos avaliados (p=0,812).

Para a intensidade de coloração (IC) e escore proporcional (EP), houve diferença significativa somente para a proteína P53 (quando comparada às HSPs), de acordo com a Tabela 7.

Tabela 7: Valores de p, para intensidade de coloração e escore proporcional das proteínas avaliadas.

Proteínas	IC*	EP
	p	p
P53	0,003	0,003
HSP 27	0,718	0,755
HSP 72	0,698	0,764
HSP 90	0,357	0,550

*IC = intensidade de coloração; EP = escore proporcional

Com relação à intensidade de coloração, testou-se a correlação entre as proteínas estudadas, observando-se que existe correlação entre P53 e HSP 27, entre HSP 27 e HSP 72 e entre HSP 72 e HSP 90, como mostra a Tabela 8.

Tabela 8: Valores de p, para intensidade de coloração das proteínas avaliadas.

	P53	HSP 27	HSP 72	HSP 90
P53	1.00			
HSP 27	0,008**	1.00		
HSP 72	0,305	0,043*	1.00	
HSP 90	0,199	0,205	0,033*	1.00

*=Significância: p≤0,05; **=Significância p≤0,01

Com relação ao escore proporcional, testou-se a correlação entre as proteínas estudadas, observando-se que existe correlação entre P53 e HSP 27, entre HSP 27 e HSP 72, entre HSP 27 e HSP 90 e entre HSP 72 e HSP 90, como mostra a Tabela 9.

Tabela 9: Valores de p, para escore proporcional das proteínas avaliadas.

	P53	**HSP 27**	**HSP 72**	**HSP 90**
P53	1.00			
HSP 27	0,004**	1.00		
HSP 72	0,669	0,000**	1.00	
HSP 90	0,492	0,005**	0,000**	1.00

*=Significância: p≤0,05; **=Significância p≤0,01

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, dentre o tumores malignos, os carcinomas simples foram o tipo histológico predominante. O mesmo resultado foi encontrado por Sorenmo (2003), Karayannopoulou *et al.* (2005), Pinho *et al.* (2007), Oliveira *et al*. (2009), Queiroga *et al*. (2009), Dias Pereira *et al.* (2010) e Gama *et al.* (2010). Segundo Cavalcanti & Cassali (2003) o prognóstico dos animais piora progressivamente com a perda de diferenciação histopatológica dos carcinomas de mama. Acredita-se que cadelas portadoras de tumores complexos apresentam melhor prognóstico do que as que apresentam tumores com componente exclusivamente epitelial, que estão diretamente relacionadas com a progressão e disseminação da doença.

As mutações do gene P53 são as alterações genéticas mais comuns nos tumores malignos e podem ser detectadas, indiretamente, através da imuno-histoquímica, mas essa correlação não é absoluta (NAKANISHI *et al*., 1996). Neste estudo, observou-se a presença de marcação nuclear em células epiteliais, com diferentes intensidades, nos casos de tumores malignos. A presença de marcação nuclear nos tumores malignos corresponde ao resultado obtido por diversos autores (ERIKSSON *et al*., 1994; NAKANISHI *et al*., 1996; IOACHIM *et al*., 1998; INOUE & SHIRAMIZU, 1999; PARK *et al*., 1999; SANGRAJRANG *et al*., 2003; LEE *et al*., 2004; KUMARAGURUPARAN *et al*., 2006; COUTINHO-CAMILLO *et al*., 2010). Em alguns casos, foram observadas marcações citoplasmáticas, sem entretanto as amostras apresentarem marcação nuclear. Estas, portanto, foram desconsideradas. Relatos de marcação citoplasmática foram citados por Nagao *et al.* (1995).

Segundo Barnes *et al.* (1993) os métodos imuno-histoquímicos de detecção da proteína P53 devem ser vistos com cuidado porque não se pode assumir que a imunomarcação é sempre indicativo de mutação. Hussain & Harris (2006) observaram a ocorrência de mutações no gene P53 em 50% dos casos de neoplasias em humanos. Além disso, ainda não é claro em qual estágio de

transição dos tumores benignos para os malignos ocorrem as mutações do gene p53 e como os níveis de expressão desta proteína mudam durante a progressão do tumor. Inúmeros estudos relacionam o aumento na expressão da proteína P53 com a rápida proliferação das células tumorais e progressão tumoral (IOACHIM *et al*., 1998; INOUE & SHIRAMIZU, 1999; SANGRAJRANG *et al*., 2003; LEE *et al*., 2004; HUSSAIN & HARRIS, 2006; KUMARAGURUPARAN *et al*., 2006, COLEGROVE *et al*., 2009).

A não ocorrência de marcação para a proteína P53 em algumas amostras de tumores malignos pode ser explicada pela diversidade de epítopos que ela apresenta. Neste caso, o clone utilizado foi o PAb122, que segundo Keller *et al*. (2007) parece ter uma sensibilidade menor que a de outros clones mais utilizados, como o PAb240 e o CM-1. Segundo Nakanishi *et al.* (1996) utilizando-se uma combinação de vários anticorpos, mais epítopos seriam reconhecidos, resultando em uma maior acurácia do valor prognóstico da imunomarcação. Os imunomarcadores mais freqüentemente utilizados para os animais no diagnóstico de rotina são policlonais, porque contêm anticorpos para uma ampla gama de epítopos, aumentando a sensibilidade do método, por vezes em detrimento da especificidade (SUEIRO *et al.*, 2005). Além disso, variações nos métodos de fixação, tempo de armazenamento e até mesmo interpretações subjetivas dos padrões de coloração podem interferir na variação de resultados encontrados (SUEIRO *et al.*, 2005). Segundo Nagao *et al.* (1995), Finley *et al.* (1998) e Park *et al.* (1999) a proteína P53 pode formar complexos com a HSP 70, o que modifica a estrutura de seus epítopos, resultando em variação nos resultados obtidos. A correlação encontrada por Finlay *et al.* (1998) entre o aumento da atividade de transformação e ligação entre a proteína P53 e a HSP 70 não prova que este complexo formado está envolvido nos processo de transformação. Seus experimentos fornecem uma primeira evidência de que as HSPs podem afetar o nível de expressão ou a meia-vida dos produtos dos oncogenes.

Neste estudo, nenhuma das amostras não neoplásicas e as amostras de tumores benignos apresentaram imunomarcação para a proteína P53. Isto indica

que a expressão da proteína P53 é estritamente associada aos tumores mamários malignos, como o observado por Eriksson *et al.* (1994) e Ioachim *et al.* (1998). A diferença estatística encontrada na comparação entre o grupo C e o grupo CS, com relação à IC e EP, para a proteína P53 confirma que a expressão desta proteína está relacionada aos tumores malignos e também que os carcinomas complexos apresentam um melhor prognóstico do que os carcinomas simples.

Nas amostras positivas para a proteína P53, menos de 25% das células apresentavam coloração. Eisenberg & Koifman (2001) observaram uma boa correlação entre os resultados de imuno-histoquímica e a ocorrência de mutação do gene p53 em tumores que apresentavam pelo menos 25% de células imunomarcadas.

A sensibilidade (67,5%), especificidade (100%), VPP (100%), VPN (25%) e acurácia (92%) do teste, encontradas no presente estudo, indicam que a expressão da proteína P53 é estritamente relacionada aos tumores malignos, ou seja, o valor encontrado para a especificidade garante que 100% das amostras imunomarcadas referem-se a tumores malignos. Os testes de rastreamento não foram realizados para as outras proteínas porque não se observou diferença estatística na expressão das mesmas.

Não se observou diferença estatística na expressão da proteína P53 de acordo com o grau histológico das neoplasias. O mesmo foi encontrado por Ioachim *et al.* (1998) e O'Hanlon *et al.* (2002). Este resultado difere do encontrado por Barnes *et al.* (1993), Eriksson *et al.* (1994), Nakanishi *et al.* (1996) e Sueiro *et al.* (2004). Isso pode ser justificado pelo pequeno número de amostras.

Segundo Nakanishi *et al.* (1996) o valor prognóstico da imunomarcação da proteína P53 varia com o sítio do tumor. Nos casos de câncer de mama e próstata, pode ser considerado como fator prognóstico, diferentemente dos casos de neoplasias colorretais e uterinas. Entretanto, não pode ser considerado um fator prognóstico independente. Já O'Hanlon *et al.* (2002) consideram o valor prognóstico da proteína P53 ainda incerto. Lee *et al.* (2004) consideram que a

expressão da proteína P53 não é um adequado marcador prognóstico para os carcinomas mamários caninos e câncer de mama feminino.

A diferença estatística encontrada com relação à IC e EP entre a proteína P53 e as HSPs deve-se ao fato de que a proteína P53 é estritamente associada aos tumores malignos, enquanto que as HSPs são constitutivamente expressas, em níveis baixos, em todas as células, segundo relatam diversos autores (WELCH, 1992; KIANG & TSOKOS, 1998; BOONE & VIJAYAN, 2002; PROHÁSZKA & FÜST, 2004; SREEDHAR & CSERMELY, 2004; ROMANUCCI *et al.*, 2006; DAUGAARD *et al*., 2007).

As HSPs atuam como “chaperonas moleculares” e como mecanismo de defesa contra estresses ambientais e metabólicos, de modo que as células possam manter a homeostase (PARK *et al*., 1999), além disso, têm funções essenciais no ciclo celular, bem como no desenvolvimento e diferenciação celular (PROHÁSZKA & FÜST, 2004).

Com relação à HSP 72, foi observado, no presente estudo, a marcação nuclear e citoplasmática e somente citoplasmática, em alguns casos, das células epiteliais. O mesmo foi observado em diversos estudos (PARK *et al*., 1999; ROMANUCCI *et al*., 2006; WANG *et al*., 2008)

Daugaard *et al.* (2007) relatam que a HSP 70 é abundantemente expressa em tumores malignos de diversas origens e sua expressão se correlaciona com o aumento da proliferação celular, pobre diferenciação, metástases linfonodais e resultados terapêuticos ruins no câncer de mama humano. O importante papel da família HSP 70 na tumorigênese é ratificado por dados que indicam que sua elevada expressão é necessária para a sobrevivência das células tumorais de várias origens. Dados recentes indicam ainda que a expressão aumentada da HSP 72 é observada em casos de cânceres de mama primários e metastáticos e que esta tem efeito promotor de crescimento e sobrevivência das células cancerosas. Com relação a outros sítios de neoplasias, essa informação é ainda limitada. Park *et al.* (1999) observaram que nos casos de tumor de mama, os

pacientes que apresentavam uma expressão aumentada de HSP 72 tiveram uma sobrevivência significativamente menor livres da doença.

A HSP 90 é a proteína de estresse mais abundantemente encontrada nas células, correspondendo entre 1 e 2 % do total das proteínas (POWERS & WORKMAN, 2007; FERRARIO & GOMER, 2009) o que ratifica os resultados obtidos neste estudo, em que todas as amostras apresentaram expressão desta proteína.

Para a HSP 90, a marcação encontrada nas células epiteliais foi citoplasmática, assim como o resultado obtido por Romanucci *et al.* (2006). Ainda segundo estes autores, a HSP tem sua expressão aumentada nas neoplasias, independente de invasão ou tipo histológico do tumor. Nos casos de câncer de mama em humanos a expressão aumentada da HSP90α também tem sido observada e parece estar intimamente associada à proliferação celular e a um pior prognóstico.

Entretanto, assim como Romanucci *et al.* (2006), não foi possível definir nenhum significado prognóstico para esta HSP, devido à sua elevada imunorreatividade em todos os casos avaliados neste estudo.

A proteína HSP 27 demonstrou marcação citoplasmática de células epiteliais e também de células endoteliais. No tecido mamário normal, praticamente todas as amostras apresentaram marcação, tanto de células epiteliais quanto endoteliais (estas intensamente coradas em todos os casos), diferentemente do encontrado por Romanucci *et al.* (2006), que não observaram marcação significativa nas células epiteliais e observaram marcação moderada nas células endoteliais. Segundo Michils *et al.* (2001) há expressão aumentada de HSP 27 nos carcinomas mamários humanos.

A marcação de células endoteliais não foi avaliada quantitativamente, mas qualitativamente, e estas parecem apresentar-se em maior número nos casos de tumores malignos. Estudos indicam haver maior densidade de vascularização nos tumores malignos, quando comparados aos benignos, sugerindo que a capacidade angiogênica pode refletir malignidade, além de desempenhar um

papel importante no processo de metastatização (QUEIROGA & LOPES, 2002). Além disso, as células endoteliais apresentam uma maior quantidade de peroxidase endógena, o que pode ter contribuído para uma marcação mais intensa deste tipo celular, não estando esta marcação, portanto, diretamente relacionada à maior capacidade angiogênica dos tumores malignos.

A correlação encontrada entre as HSPs já era esperada, visto que estas proteínas tem função essencial em diversas funções biológicas, visando a manutenção da homeostase celular, frente aos fatores de estresse. A correlação da proteína P53 com a HSP 27 pode ser explicada pela maior vascularização observada nos tumores malignos, ou seja, há maior expressão da HSP 27 em tumores malignos, o que contribui para a rápida proliferação das células tumorais e progressão tumoral e este fato está relacionado à maior expressão da proteína P53.

7. CONCLUSÕES

- A presença de imunomarcação da proteína P53 nas amostras neoplásicas demonstra a relação desta com os eventos de transformação maligna, expansão e crescimento tumoral;
- A presença de imunomarcação das HSPs tanto em tecidos normais quanto em neoplásicos demonstra que a expressão destas proteínas ocorre também em decorrência de eventos celulares fisiológicos e que estas desempenham ainda um importante papel no processo de carcinogênese da glândula mamária canina;
- A não existência de correlação entre a expressão das proteínas de estresse avaliadas e o grau histológico das neoplasias decorre da expressão das mesmas em eventos celulares fisiológicos;
- A correlação encontrada entre a proteína P53 e a HSP 27 indica tendência de que a capacidade angiogênica reflete malignidade.

8. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.R.C.; PEDROSA, N.L.; LEITE, J.B.; FLEMING, T.R.P.; CARVALHO, V.H.; CARDOSO, A.A.A. Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v.53, n.3, p.305-316, 2007.

AMORIM, I.; LOPES, C.C.; FAUSTINO, A.M.R.; DIAS PEREIRA, P. Immunohistochemical Expression of Caveolin-1 in Normal and Neoplastic Canine Mammary Tissue. **Journal of Comparative Pathology.** v.143, n.1, p.39-44, 2010.

ANDRIOLO, A. Marcadores Tumorais Bioquímicos Circulantes (Mesa: Papel da Medicina Laboratorial na Promoção da Saúde). **1º Congresso Nacional de Saúde da Faculdade de Medicina da UFMG: Desafios da Promoção da Saúde.** UFMG, Belo Horizonte, 2008.

ASEA, A. Hsp 72 release: Mechanisms and methodologies. **Methods.** v.43, p.194-198, 2007.

BARNES, D.M.; DUBLIN, E.A.; FISHER, C.J.; LEVISON, D.A.; MILLIS, R.R. Immunohistochemical Detection of p53 Protein in Mammary Carcinoma: An Important New Independent Indicator of Prognosis? **Human Pathology**. v.24, n.5, p.469-476, 1993.

BEACHY, S.H.; KISAILUS, A.J.; REPASKY, E.A.; SUBJECK, J.R.; WANG, X.Y.; KAZIM, A.L. Engineering secretable forms of chaperones for immune modulation and vaccine development. **Methods.** v.43, p.184-193, 2007.

BEERE, H.M.; WOLF, B.B.; CAINT, K.; MOSSERT, D.; MAHBOUBI, A.; KUWANA, T.; TAILOR, P.; MORIMOTO, R.I.; COHEN, G.M.; GREEN, D.R. Heat-shock

protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 the Apaf-1 apoptosome. **Nature Cell Biology.** v.2, p.469-475, 2000.

BENJAMIN S. A.; LEE A. C.; SAUNDERS W.J. Classification and Behavior of Canine Mammary Epithelial Neoplasms Based on Life-span Observations in Beagles. **Veterinary Pathology**, v. 36, p. 423-436, 1999.

BOONE, A.N.; VIJAYAN, M.M. Constitutive heat shock protein 70 (HSC 70) expression in rainbow trout hepatocytes: effect of heat shock and heavy metal exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C.** v.132, p.223-233, 2002.

CAPELOZZI, V.L. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.27, n.6, p.321-328, 2001.

CASSALI, G.D. Patologias da Glândula Mamária. In: NASCIMENTO, E.L.; SANTOS, R.L. **Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos.** 2ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003. p.119-132.

CAVALCANTI, M.F.; CASSALI, G.D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas - revisão. **Clínica Veterinária.** n.61, p.56-63, 2006.

COLEGROVE, K.M.; GULLAND, F.M.D.; NAYDAN, D.K.; LOWENSTINE, L.J. Tumor Morphology and Immunohistochemical Expression of Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, p53, and Ki67 in Urogenital Carcinomas of California Sea Lions (*Zalophus californianus*). **Veterinary Pathology.** v.46, p.642-655, 2009.

COUTINHO-CAMILLO, C.M.; LOURENÇO, S.V.; NISHIMOTO, I.N.; KOWALSKI, L.P.; SOARES, F.A. Nucleophosmin, p53, and Ki67 expression patterns on an oral

squamous cell carcinoma tissue microarray. **Human Pathology.** v.41, n.8, p.1079-1086, 2010.

CRAWFORD, L.V.; PIM, D.C.; BULBROOK, R.D. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. **International Journal of Cancer.** v.30, p.403-408, 1982.

DAGLI, M.L.Z. The search for suitable prognostic markers for canine mammary tumors: A promising outlook. **The Veterinary Journal.** v.177, 3-5, 2008.

DAUGAARD, M.; ROHDE, M.; JÄÄTTELA, M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. **FEBS Letters.** v.581, p.3702-3710, 2007.

DERKSEN, P.W.B.; LIU, X.; SARIDIN, F.; VAN DER GULDEN, H.; ZEVENHOVEN, J.; EVERS, B.; VAN BEIJNUM, J.R.; GRIFFIOEN, A.W.; VINK, J.; KRIMPENFORT, P.; PETERSE, J.L.; CARDIFF, R.D.; BERNS, A.; JONKERS, J. Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. **Cancer Cell.** v.10, p.437-449, 2006.

DIAS PEREIRA, P.; LOPES, C.C.; MATOS, A.J.F.; CORTEZ, P.P.; GÄRTNER, F.; MEDEIROS, R.; LOPES, C. Caveolin-1 in Diagnosis and Prognosis of Canine Mammary Tumours: Comparison of Evaluation Systems. **Journal of Comparative Pathology**. v.143, n.2-3, p.87-93, 2010.

EISENBERG, A.L.A.; KOIFMAN, S. Câncer de Mama: Marcadores Tumorais (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.47, n.4, p.377-388, 2001.

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology.** v.19, p.403-410, 1991.

ERIKSSON, E.T.; SCHIMMELPENNING, H.; ASPENBLAD, U.; ZETTERBERG, A.; AUER, G.U. Immunohistochemical Expression of the Mutant p53 protein and Nuclear DNA Content During the Transition From Benign to Malignant Breast Disease. **Human Pathology**. v.25. n.11. p.1228-1233, 1994.

FERRARIO, A.; GOMER, C.J. Targeting the 90 kDa heat shock protein improves photodynamic therapy. **Cancer Letters**. v.289, n.2, p.188-194, 2009.

FINLAY, C.A.; HINDS, P.W.; TAN, T.H.; ELIYAHU, D.; OREN, M.; LEVINE, A.J. Activating Mutations for Transformation by p53 Produce a Gene Product That Forms an hsc70-p53 Complex with an Altered Half-Life. **Molecular and Cellular Biology.** v.8, n.2, p.531-539, 1998.

FRANDSON, R.D. Anatomia das glândulas mamárias. In: FRANDSON, R.D. **Anatomia e Fisiologia dos Animais Domésticos.** Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 1979. p.366-373.

FÜSTER, J.J.; SANZ-GONZÁLEZ, S.M.; MOLL, U.M.; ANDRÉS, V. Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy. **TRENDS in Molecular Medicine.** v.13, n.5, p.192-199, 2007.

GAMA, A.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Expression and prognostic significance of CK19 in canine malignant mammary tumours. **The Veterinary Journal.** v.184, p.45-51, 2010.

GAMA, A.; GÄRTNER, F.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Immunohistochemical expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGRF) in canine mammary tissues. **Research in Veterinary Science.** v.87, p.432-437, 2009.

HORVÁTH, I.; MULTHOFF, G.; SONNLEITNER, A.; VÍGH, L. Membrane-associated stress proteins: More than simply chaperones. **Biochimica et Biophysica Acta.** v.1778, p.1653-1664, 2008.

HSU, W.; HUANG, H.; LIAO, J.; WONG, M.; CHANG, S. Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine *HER-2* gene. **The Veterinary Journal.** v.180, p.116-123, 2009.

HUSSAIN, S.P.; HARRIS, C.C.. P53 Biological Network: At theCrossroads of the Cellular-Stress Response Pathway and Molecular Carcinogenesis. **Journal of Nippon Medical School.** v.73, n.2, p.54-64, 2006.

HUSSAIN, S.P.; HOFSETH, L.J.; HARRIS, C.C. Tumor suppressor genes: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology and human risk assessment. **Lung Cancer.** v.34, p.7-15, 2001.

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.

IOACHIM, E.; SKOPELITOU, A.; KAMINA, S.; NONNI, A.; AGNANTIS, N.J. p53 protein expression in human breast cancer: an immunohistochemical study including correlation with steroid receptor status, proliferation indices, collagen type IV, laminin, C-erB-2 oncoprotein and Cathepsin D. **The Breast.** v.7, p.42-48, 1998.

KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T.C.; DESSIRIS, A. Histological Grading and Prognosis in Dogs with Mammary Carcinomas: Application of a Human Grading Method. **Journal of Comparative Pathology.** v.133, p.246-252, 2005.

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.

KIANG, J.G.; TSOKOS, G.C. Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology. **Pharmacology & Therapeutics.** v.80, n.2, p.183-201, 1998.

KOLB, E. Fisiologia da glândula mamária. In KOLB, E. **Fisiologia Veterinária.** 4 ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. 612p.

KUMARAGURUPARAN, R.; KARUNAGARAN, D.; BALACHANDRAN, C.. Of humans and canines: A comparative evaluation of heat shock and apoptosis associated proteins in mammary tumors. **Clinica Chimica Acta**, v.365, n.1-2, p.168-176, 2006.

LANE, D.P, BENCHIMOL, S. p53: Oncogene or anti-oncogene? **Genes & Development.** v.4, p.1-8, 1990.

LEE, C.; KIM, W.; LIM, J.; KANG, M.; KIM, D.; KWEON, O. 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.

MAGALHÃES, G.M. Imunomarcação de micrometástases de neoplasias mamárias espontâneas em linfonodos de cadelas por meio do receptor CD44. Dissertação de mestrado. 2010. 56 f. **Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal**, 2010.

MATTOS, L.L.; MACHADO, L.N.; SUGIYAMA, M.M.; BOZZETTI, R.M.; PINHAL, M.A.S. Tecnologia aplicada na detecção de marcadores tumorais. **Arquivo Médico ABC**, v.30, p.19-25, 2005.

MEGHA, T.; FERRARI, F.; BENVENUTO, A.; BELLAN, C.; LALINGA, A.V.; LAZZI, S.; BARTOLOMMEI, S.; CEVENINI, G.; LEONCINI, L.; TOSI, P. P53 mutation in breast cancer. Correlation with cell kinetics and cell of origin. **Journal Clinical of Pathology**, v.55, p.461-6, 2002.

MICHILS, A.; REDIVO, M.; BEYL, V.Z.; MAERTELAER, V.; JACOBOVITZ, D.; ROCMANS, P.; DUCHATEAU, J. Increased expression of high but not low molecular weight heat shock proteins in resectable lung carcinoma. **Lung Cancer.** v.33, p.59-67, 2001.

MISDORP, W.; ELSE, R.; HELLMAN, E., Histologic classification of mammary tumors of the dog and cat. In: **World Health Organization Internacional Histological Classification of Tumors of Domestic Animals**, Armed Forces Institute of Pathology Washington DC, s.2, v.7, n.2, 1999.

MOLL, U.M.; WOLFF, S.; SPEIDEL, D.; DEPPERT, W. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. **Current Opinion in Cell Biology.** v.17, p.631-636, 2005.

MULTHOFF, G. Heat shock protein 70 (Hsp 70): Membrane location, export and immunological relevance. **Methods.** v.43, p.229-237, 2007.

NAGAO, T.; KONDO, F.; SATO, T.; NAGATO, Y.; KONDO, Y. Immunohistochemical Detection of Aberrant p53 Expression in Hepatocellular Carcinoma: Correlation With Cell Proliferative Activity Indices, Including Mitotic Index and MIB-1 Immunostaining. **Human Pathology.** v.26, n.3, p.326-333, 1995.

NAKANISHI, K.; KAWAI, T.; TORIKATA, C. Immunohistochemical Evaluation of p53 Oncoprotein in Transitional Cell Carcinoma of the Upper Urinary Tract. **Human Pathology.** v.27, n.12, p.1336-1340, 1996.

O'HANLON, D.M.; KIELY, M.; MACCONMARA, M.; AL-AZZAWI, R.; CONNOLY, Y.; JEFFERST, M.; KEANE, F.B.V. An immunohistochemical study of p21 and p53 expression in primary node-positive breast carcinoma. **European Journal of Surgical Oncology.** v.28, p.103-107, 2002.

OLIVEIRA, J.T.; PINHO, S.S.; MATOS, A.J.; HESPANHOL, V.; REIS, C.A; GÄRTNER, F. MUC1 expression in canine malignant mammary tumours and relationship to clinicopathological features. **The Veterinary Journal.** v.182, p.491-493, 2009.

PACHECO, F.A.; PASCHOAL, M.E.M.; CARVALHO, M.G.C. Marcadores tumorais no câncer de pulmão: um caminho para a terapia biológica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia.** v.28, n.3, p.143-149, 2002.

PALTIAN, V.; ALLDINGER, S.; BAUMGÄRTNER, W.; WOHLSEIN, P. Expression of CD44 in Canine Mammary Tumours. **Journal of Comparative Pathology.** v.141, p.237-247, 2009.

PARK, C.; JOO, I.; SONG, S.; KIM, D.; BAE, D.; LEE, J. An Immunohistochemical Analysis of Heat Shock Protein 70, p53, and Estrogen Receptor Status in Carcinoma of the Uterine Cervix. **Gynecologie Oncology.** v.74, p.53-60, 1999.

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

PEREIRA, M.G. Epidemiologia: teoria e prática. Rio de Janeiro: Guanabara Kooogan, p.358-376, 1995.

PIEKARZ, C.H.; BIONDO, A.W.; AMORIM, R.L.; RODASKI, S.; BARROS FILHO, I.R.; DE NARDI, A.B. Expressão das caderinas nos tumores mamários em cadelas. **Archives of Veterinary Science.** v.13, n.1, p.13-21, 2008.

PINHO, S.S.; MATOS, A.J.F.; LOPES, C.; MARCOS, N.T.; CARVALHEIRA, J.; REIS, C.A.; GÄRTNER, F. Sialyl Lewis x expression in canine malignant mammary tumours: correlation with clinicopathological features and E-Cadherin expression. **BMC Cancer.** v.7, p.124-133, 2007.

POWERS, M.V.; WORKMAN, P. Inhibtors of the heat shock response: Biology and pharmacology. **FEBS Letters.** v.581, p.3758-3769, 2007.

PROHÁSZKA, Z.; FÜST, G. Immunological aspects of heat-shock proteins-the optimum stress of life. **Molecular Immunology.** v.41, p.29-44, 2004.

PRZEPIORKA, D.; SRIVASTAVA, P.K. Heat shock protein-peptide complexes as immunotherapy for human cancer. **Molecular Medicine Today.** v.4, n.11, p. 478-484, 1998.

QIU, C.; LIN, D.; WANG, J.; WANG, L. Expression and significance of PTEN in canine mammary gland tumours. **Research in Veterinary Science.** v.85, p.383-388, 2008.

QUEIROGA, F.; PIRES, I.; LOBO, L.; LOPES, C.S. The role of COX-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. **Research in Veterinary Science**. v.88, n.3, p.441-445, 2009.

QUEIROGA, F. & LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias.** v.97, n.543, p.119-127, 2002.

REIS, F.J.C. Rastreamento e diagnóstico das neoplasias de ovário - papel dos marcadores tumorais. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.** v.27, n.4, p.222-227, 2005.

RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia.** v.18, p.571-573, 1962.

ROMANUCCI, M.; MARINELLI, A.; SARLI, G.; SALDA, L. D. Heat shock protein expression in canine malignant mammary tumours. **BMC Cancer**, v.6, p.171-182, 2006.

SANGRAJRANG, S.; ARPORNWIRAT, W.; CHEIRSILPA, A.; THISUPHAKORN, P.; KALALAK, A.; SORNPROM, A.; SOUSSI, T. Serum p53 antibodies in correlation to other biological parameters of breast cancer. **Cancer Detection and Prevention.** v.27, p.182-186, 2003.

SILVA, A.E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes - Revisão Bibliográfica. **Ciência Rural.** v.34, n.2, p.625-633, 2004.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **The Veterinary Clinics: Small Animal Practice.** v.33, p.573-596, 2003.

SREEDHAR, A.S.; CSERMELY, P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy A comprehensive review. **Pharmacology & Therapeuties.** v.101, p.227-257, 2004.

SUEIRO, F.A.R.; ALESSI, A.C.; CHAGAS, C.A.; PINTO, G.A.; VASSALLO, J. Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. **Jornal Brasileiro de Patologia**. v.41, n.4, p.263 - 270, 2005.

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.

WANG, X.; CHEN, W.; LI, X.; LIN, H.; WANG, Q. Heat shock protein 72 associated with CD44v6 in human colonic adenocarcinoma. **Cell Biology International.** v.32, p.860-864, 2008.

WELCH, W. J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. **Physiological Reviews**. v.72, n.4, p.1063-81, 1992.

WHITLEY, D; GOLDBERG, S.P.; JORDAN, W.D. Heat shock proteins: A review of the molecular chaperones. **Journal of Vascular Surgery.** v.29, n.4, p.748-751, 1999.

WINSÉN, S.; GESTWICKI, J.E. Identification of small molecules that modify the protein folding activity of heat shock protein 70. **Analytical Biochemistry.** v.374, p.371-377, 2008.

ZUCCARI, D.A.P.C.; SANTANA, A.E.; ROCHA, N.S. Fisiopatologia da neoplasia mamária em cadelas – Revisão. **Clínica Veterinária**. n.32, p.50-54, 2001.