

EDUARDO DE OLIVEIRA COSTA NETO

**EXPRESSÃO EXTRACELULAR DAS PROTEÍNAS DE
CHOQUE TÉRMICO A NÍVEIS MEDULAR E
PERIFÉRICO EM CADELAS (*Canis familiaris*)
PORTADORAS DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS.**

RECIFE

2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA.**

EDUARDO DE OLIVEIRA COSTA NETO

**EXPRESSÃO EXTRACELULAR DAS PROTEÍNAS DE
CHOQUE TÉRMICO A NÍVEIS MEDULAR E
PERIFÉRICO EM CADELAS (*Canis familiaris*)
PORTADORAS DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho

Coorientadora: Profa. Dra. Eneida Wilcox Rêgo

**Recife – Pernambuco
Fevereiro 2011.**

Ficha catalográfica

C837e Costa Neto, Eduardo de Oliveira
Expressão extracelular das proteínas de choque térmico
a níveis medular e periférico em cadelas (*Canis familiaris*) /
Eduardo de Oliveira Costa Neto – 2011.
52 p. : il.

Orientadora: Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento
de Medicina Veterinária, Recife, 2011.

Inclui referências.

1. HSP 2. Tumor de mama 3. Canino I. Coelho, Maria
Cristina de Oliveira Cardoso, orientadora II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

EXPRESSÃO EXTRACELULAR DAS PROTEÍNAS DE CHOQUE
TÉRMICO A NÍVEIS MEDULAR E PERIFÉRICO EM CADELAS
(*Canis familiaris*) PORTADORAS DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS.

Dissertação de Mestrado elaborada por

EDUARDO DE OLIVEIRA COSTA NETO

Aprovada em/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho
(Orientadora - Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco)

Profa. Dra. Eneida Wilcox Rêgo
(Coorientadora - Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco)

Profa. Dra. Mírian Nogueira Teixeira
(Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco)

Dra. Sylvana Pontual de Alencar
(Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco)

Pesquisa realizada no Departamento de Medicina Veterinária e Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, com o apoio financeiro da Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus irmãos e pais e todos familiares por todo o amor, apoio e carinho em todos estes anos de estudos, e especialmente ao meu filho Ricardo e à minha esposa Taciana, por simplesmente existirem na minha vida e compreenderem os momentos em que estive ausente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conferir saúde a cada dia de minha vida.

Agradeço a minha família inteira, avós, pais, tios, irmãos e primos por toda a alegria e prazer que me conferem pelo simples fato de existirem, e por toda a segurança que sinto ao saber que existem e poderei sempre contar com eles, não importando quando ou porquê.

Um obrigado especial para minha esposa e meu filho, que estão sempre dispostos a encarar novas aventuras, não se preocupando com os obstáculos que possam surgir em nossas vidas, por ter a certeza do conforto e segurança de estarmos sempre juntos neste barco...

Muito obrigado à minha orientadora, professora Cristina, por tudo o que ela fez e tem feito por mim durante estes últimos 10 anos de minha vida. Pude sempre contar com ela, aprendi praticamente tudo o que sei a respeito de cirurgia e clínica e tenho a certeza de que dificilmente encontraria um orientador tão bom quanto ela.

Obrigado a todos os meus amigos que de certa forma me ajudaram nesta pesquisas, Flávio, Gisele, Kátia, Thábata, Virgínia, Magda, Raquel, Luciana, Thiago, e tantos outros. Muito obrigado mesmo.

Obrigado também a todos os funcionários da UFRPE e da Clínica Veterinária Pet Dream, que me auxiliaram de qualquer forma não só durante os momentos da pesquisa, mas também em todos os dias em que trabalhei junto a vocês. Muito obrigado.

RESUMO

O tumor de mama é a neoplasia mais frequente nas cadelas, e o aprimoramento de métodos investigatórios sobre sua origem e desenvolvimento fazem com que novas pesquisas surjam no intuito de desvendar os mecanismos elaborados pelo organismo na tentativa de se defender contra esta enfermidade. A expressão da proteína de choque térmico (HSP) tem sido observada em muitas neoplasias, incluindo o câncer de mama. O objetivo deste trabalho foi investigar a expressão extracelular das proteínas de choque térmico (HSPs) a níveis medular e periférico em cadelas portadoras de neoplasias mamárias atendidas no serviço ambulatorial do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foram coletadas amostras de 40 cadelas, destas, 20 eram portadoras de neoplasias mamárias e foram encaminhadas para mastectomia formando o grupo estudo, e outras 20 cadelas clinicamente sadias foram encaminhadas para cirurgia de ovariosalpingohisterectomia (OSH) eletiva (grupo controle). A HSP 90 kDa foi detectada em 20% das amostras do grupo estudo e em 10 % das amostras do grupo controle a nível periférico e a HSP 99 kDa se expressou em 50% das amostras do grupo estudo a nível medular. Outra proteína detectada foi a de peso molecular 150 kDa, também considerada como proteína ligada ao estresse celular, sua expressão foi evidenciada em 25% das amostras a nível medular no grupo estudo. De um modo geral, os resultados obtidos demonstraram haver expressão sorológica das proteínas ligadas ao estresse celular tanto a nível medular quanto a nível periférico em cadelas portadoras de neoplasias mamárias, porém não se pode afirmar que a suas expressões extracelulares estejam ligadas unicamente à presença da neoplasia.

Palavras Chave: HSP, Medula óssea, Canino.

ABSTRACT

Tumor of the breast is the most common tumor in bitches, and how to apprimorate the methods to investigative about its origin and development causes is a new research in order to unravel the mechanisms established by the body in an attempt to defend against this disease. The goal of this study was to investigate the expression of extracellular heat shock protein (HSPs) to the bone marrow and peripheral levels in bitches with mammary tumors, met in the Veterinary Hospital outpatient service of the Universidade Federal Rural de Pernambuco, 40 samples were collected from these bitches, 20 were with mammary tumors, and were forwarded to mastectomy forming the group study, and other clinically healthy 20 bitches were forwarded to sterilization (O.S.H) elective (control group). HSP 90 kDa has been detected in 85% of the samples of peripheral level study group, 60% samples of the bone marrow in the same group and 35% of the samples of peripheral level control group. Another protein detected was the molecular weight 150 kDa, also regarded as linked to cellular stress, her expression was appear in 25% of the samples at bone marrow and in 75% of the samples at peripheral level group study. Generally, the results obtained demonstrate there is expression of sorological proteins linked to cellular stress both at the peripheral and bone marrow levels in bitches with mammary tumors, though we cannot say that their extra-cellular expressions are connected only at presence of tumor.

Key Words: HSP, Bone Marrow, Dogs.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO. | 14 |
| 2. OBJETIVO. | 15 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA. | |
| 3.1. Hematopoiese e coleta da medula óssea. | 15 |
| 3.2. Resposta celular imunológica anti-tumoral. | 18 |
| 3.3. Proteína de choque térmico – Heat Shock Potein (HSP). | 23 |
| 4. REFERÊNCIAS. | 25 |
| 5. ARTIGO CIENTÍFICO. | 34 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- Bas – Valor relativo de leucócitos basófilos expresso em %.
- Bast – Valor relativo de leucócitos neutrófilos bastonetes expresso em %.
- B.eos – Valor relativo de blastos de linhagem eosinofílica expresso em %.
- BID – Administração de medicamentos em intervalo de 12-12 horas.
- CAAs – Células apresentadoras de antígenos.
- CEUA – Comissão de ética no uso de animais.
- CCR-1 – Receptor de superfície de célula dendrítica.
- CCR-2 – Receptor de superfície de célula dendrítica.
- CCR-3 - Receptor de superfície de célula dendrítica.
- CD8 α ⁺ - Células dendríticas especializadas na captura de células mortas e exercem papel na resistência a certas infecções virais.
- CD11b⁺ – Célula dendrítica especializada no processamento de antígenos exógenos para apresentação em associação com moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II (MHC II).
- CD11c – Célula dendrítica plasmocitóide.
- CG – Complexo de golgi.
- CHCM – Concentração hemoglobínica corpuscular média.
- CTH – Célula tronco hematopoiética.
- CXCR-1- Receptor de superfície de célula dendrítica.
- C.agran – Valor relativo de células de linhagem agranulocítica expresso em %.
- DCs - Células dendríticas.
- DP - Desvio padrão.
- EDTA – Acido diaminotetraacético.
- Eos – Valor relativo de leucócitos eosinófilos expresso em %.
- FC – Frequência Cardíaca.
- FR – Frequência Reaspiratória.
- GC – Grupo controle.
- GE – Grupo estudo.
- GEB – Sub-grupo do grupo estudo, portador de neoplasia mamária benigna.
- GEM – Sub-grupo do grupo estudo, portador de neoplasia mamária maligna.
- Hb – Hemoglobina expressa em g/dl.
- HCM – Hemoglobina corpuscula média.
- Hm – Valor absoluto de hemácias expresso por x 10.000.000/mm³.
- HSP – Heat shock protein (proteína de choque térmico).
- HSP 70 – Heat shock protein peso molecular 70.
- IDCs – Células dendríticas intestinais.
- INFs α – Interferons α .
- kDa – Unidade de peso molecular (kiloDalton)
- LCs – Células de Langerhans.

Linf – Valor relativo de leucócitos linfócitos expresso em %.
Leuc – Valor absoluto de leucócitos expresso por $\times 10^3/\text{mm}^3$.
M – Média.
Met – Valor relativo de Metamielócitos expresso em %.
MHC – Complexo de Histocompatibilidade Molecular.
MHC I - Complexo de Histocompatibilidade Molecular tipo I.
MHC II - Complexo de Histocompatibilidade Molecular tipo II.
Mie - Valor relativo de mielócitos expresso em %.
Mieb - Valor relativo de mieloblastos expresso em %.
Miel:Eri – Relação mielóide:eritróide.
moDCs – Células dendríticas derivadas de monócitos.
Mon – Valor relativo de leucócitos monócitos expresso em %.
NaCl 0,9% - Solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%.
Plaq – Valor absoluto de plaquetas expresso por $\times 10^3/\text{mm}^3$.
PPT – Valor de proteínas plasmáticas totais expresso em mg/dl.
Pro - Valor relativo de promielócitos expresso em %.
RCT – Receptores de células T.
RE – Retículo endoplasmático.
Segm - Valor relativo de leucócitos neutrófilos segmentados expresso em %.
SID – Administração medicamentosa em intervalo de 24-24 horas.
TAP – Transporte associado ao processo antigênico.
TLR – Receptores de reconhecimento de padrões (Toll-like receptors).
TNF- α – Fator de necrose tumoral.
ORP- Oxygen-regulated Protein.
O.S.H. – Ovariosalpingohisterectomia.
VCM – Volume corpuscular médio.
VG – Volume globular eritrocitário expresso em %.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Resultados das médias e desvios padrão dos valores hematológicos absolutos e relativos dos grupos estudados. 43

Quadro 2. Valores médios e desvios padrão dos valores hematológicos absolutos e relativos do grupo estudo, referentes às cadelas portadoras de neoplasias mamárias malignas e as portadoras de neoplasias mamárias benignas. 43

Quadro 3. Resultados das médias e desvios padrão dos valores do mielograma do grupo controle e do grupo estudo. 45

Quadro 4. Valores das médias e desvios padrão do mielograma do grupo estudo referentes às cadelas portadoras de neoplasias mamárias malignas e portadoras de neoplasias mamárias benignas. 45

Quadro 5. Número de amostras que demonstraram expressões eletroforética das proteínas de choque térmico e da proteína 150 kDa ligada ao estresse celular e seus respectivos sítios de expressão. 48

Quadro 6. Correlação entre as expressões eletroforéticas e os resultados dos exames histopatológicos. 49

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 A e B: Caminho de processamento antigênico pelo Complexo de Histocompatibilidade Molecular tipo I (MHC I) e Complexo de Histocompatibilidade Molecular tipo II (MHC II). 21
- Figura 2: Caminho de processamento antígeno pelo método denominado “cross-presentation”. 22
- Figura 3: Processo de interação entre HSP no meio extracelular, receptor de membrana e antígeno, resultando na liberação de citocinas pró-inflamatórias. 25
- Figura 4: Punção da cavidade medular, com agulha calibre 40 x 12 mm, do sítio localizado na tuberosidade maior do úmero direito com aplicação de força em sentido horário e anti-horário. 39
- Figura 5: Fotografia ilustrando a agulha 40 x 12 mm, após sua introdução no canal medular do sítio localizado na tuberosidade maior do úmero direito em cadela..... 39
- Figura 6: Coleta do material medular por punção aspirativa do sítio localizado na tuberosidade maior do úmero direito em cadela. 39
- Figura 7: Expressões eletroforéticas de proteínas séricas medulares e periféricas de cadelas, utilizando-se como padrão de proteínas (GE healthcare®), miosina (220kDa), α -2-macroglobulina (170 kDa), α -galactosidase (116 kDa), transferrina (76 kDa) e glutamato desidrogenase (53 kDa). 41
- Figura 8: Fotografia de um pró-eritroblasto (objetiva de imersão – 100x) apresentando vacuolização citoplasmática (amostra do grupo estudo). 46
- Figura 9: Esfregaço medular (100x) demonstrando celularidade normal (amostra do grupo estudo). Série mielóide granulocítica = MIE: Mielócito, MET: Metamielócito, BAST: Bastonete, SEG: Segmentado. Série eritróide = PE: Pró-eritroblasto, EP: Eritroblasto policromático, EO: Eritroblasto. 46
- Figura 10: Esfregaço medular demonstrando unidade granulocítica mielóide (amostra do grupo estudo). P MIE: pró-mielócito, MIE: Mielócito, MET: Metamielócito, BAST: Bastonete e SEG: Segmentado. 47

1. INTRODUÇÃO

O estudo do câncer de mama em cadelas reveste-se de importância pela frequência com que surgem na rotina clínica de pequenos animais, constituindo uma das formas mais comuns de neoplasias nesta espécie (OLIVEIRA FILHO et al, 2010). As modificações na expressão de determinadas proteínas, associadas ao processo de malignização celular, necessitam ser caracterizadas e podem se tornar um dos pontos-chave no diagnóstico e na terapia tumoral. Um segmento promissor, são as pesquisas a respeito da resposta celular ao estresse, envolvendo um grupo de proteínas denominadas “proteínas de choque térmico” ou HSP (heat shock protein) (WEI et al., 1995; NYLANDSTED et al., 2004; SOTI et al., 2005). As aplicações clínicas provenientes destes estudos são potencialmente vastas e podem ser fundamentais em diversas doenças, como o câncer (CIOCCA et al., 1993; LIU et al., 1996; VARGAS et al., 1998; SOTI et al., 2005).

O termo “proteína de choque térmico” tem caráter genérico na descrição de eventos biológicos, uma vez que diferentes estímulos podem induzir o mesmo mecanismo de defesa celular. Células de todos os organismos respondem a uma variedade de condições estressantes através de uma rápida transcrição e subsequente tradução desta série de proteínas altamente conservadas (WELCH, 1993). As HSPs surgem na literatura como uma das classes de proteínas de estresse melhor estudadas, o aumento de sua expressão foi inicialmente evidenciado em *Drosophila sp.* por Ritossa em 1962, por meio do choque térmico (incubação em diferentes temperaturas elevadas). Hoje já se sabe que a resposta ao “heat shock” é uma propriedade geral de todas as células, tanto em condições de hipertemia quanto de demais estados que levem à alterações homeostáticas (WELCH, 1993).

As HSPs como proteínas intracelulares são de fundamental importância para a sobrevivência das células, não apenas em condições de estresse, onde se vê aumento na síntese de proteínas dirigidas à reparação de danos celulares, mas também em eventos de transporte e enovelamento de proteínas em formação (MORIMOTO, 1993; STUART et al., 1994). Porém alguns estudos demonstram que a presença das HSPs não se restringe apenas ao meio intracelular, elas se apresentam no compartimento extracelular também, porém sua origem e os mecanismos que utilizam para afetar as funções celulares ainda são pouco conhecidos. Estudos recentes como os de Milani (2005), sugerem que as HSPs expressas em meio extracelular podem provir de necrose celular, e que as mesmas adquirem propriedades que lhes permitem realizar funções específicas como a apresentação de antígenos tumorais às células de defesa, funcionando como uma terapia imunológica contra o câncer.

2. OBJETIVO

Investigar a expressão extracelular das proteínas de choque térmico (HSPs) a níveis medular e periférico em cadelas (*Canis familiaris*) portadoras de neoplasias mamárias.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. HEMATOPOIESE E A COLETA DA MEDULA ÓSSEA

A hematopoiese ou hemopoiese (hemato ou hemo significa sangue, poiesis significa fazer) é realizada no sistema hematopoiético, o qual é constituído por células-tronco hematopoiéticas (CTH), células precursoras, células sanguíneas morfofuncionalmente maduras e tecido de sustentação da hematopoiese (microambiente hematopoiético), localizado nas cavidades medulares de ossos chatos e longos, baço, fígado, linfonodos e timo. O sistema hematopoiético é uma rede integrada de células que inicia o ciclo contínuo de diferenciação de uma pequena população de CTH que dão origem a todas as células heterogêneas funcionais do sangue e do sistema imune, fundamentando a teoria monofilética da origem do sangue (GASPER, 2000).

O desenvolvimento do sistema vascular e hematopoiético se inicia em uma fase precoce da vida embrionária e continua no feto podendo ser dividida em três períodos distintos: mesoblástico, hepático e mielóide. Após a fertilização e implantação do óvulo, pode-se observar o aparecimento de grupos de células no mesênquima embrionário, estes grupos de células são denominadas ilhotas sanguíneas e representam os elementos progenitores do sistema vascular e hematopoiético. As células periféricas das ilhotas sanguíneas formam a parede dos primeiros vasos sanguíneos e as mais centrais originam as células sanguíneas primitivas denominadas hemocitoblastos (GASPER, 2000).

No interior do saco vitelino, as células mesenquimais primitivas produzem as chamadas células-tronco hematopoiéticas. As células-tronco do saco vitelino, por sua vez, semeiam fígado, baço, linfonodos e timo do feto, expandindo o território de formação das células sanguíneas. Ao final do primeiro terço de vida intra-uterina, o fígado fetal assume o papel principal na hematopoiese. Observam-se aglomerados de células hematopoiéticas nos sinusóides hepáticos, e apesar da presença de células granulocíticas e megacariocíticas, os elementos precursores da série vermelha representam 50% das células nucleadas encontradas no fígado. Sua atividade começa a diminuir no segundo terço da gestação, porém continua produzindo células sanguíneas durante as primeiras semanas da vida extra-uterina (LATIMER, 1997).

As hemácias são as primeiras células sanguíneas que aparecem no embrião. É possível distinguir duas linhagens celulares, ambas derivadas de hemocitoblastos de aspectos semelhantes que amadurecem em sítios diferentes; intravascular e extravascular. No início da vida embrionária, os glóbulos vermelhos derivam dos eritroblastos primitivos, que se formam principalmente na luz dos vasos, chamados de megablostos. São células volumosas com citoplasma policromatófilo, núcleo de cromatina fina e regularmente distribuída; estas células dão origem a eritrócitos grandes, hipocrômicos e de contornos irregulares (CHRISTENSEN, 1989).

Por volta da metade do período de vida intra-uterina, formam-se cavidades medulares no interior dos ossos e inicia-se rapidamente a hematopoiese em sítio ósseo, ao final deste período, a medula óssea torna-se o principal local de desenvolvimento das células sanguíneas, precedidas pelo baço, produzindo granulócitos, monócitos, eritrócitos, megacariócitos e alguns linfócitos. A princípio a celularidade dos espaços medulares é pequena sendo predominantemente leucopoética, porém ocorre rapidamente a proliferação dos tecidos eritropoiéticos e a medula óssea torna-se totalmente celular com representação de todas as linhagens celulares (RASKIN, 1998).

O volume medular do feto e do neonato é consideravelmente menor quando comparado ao de indivíduos jovens e adultos, devido ao fato de que a maior parte do esqueleto é ainda cartilaginosa, sendo os ossos longos dos membros proporcionalmente pequenos. Assim, o volume verdadeiro da medula óssea é mais ou menos igual ao volume total de células hematopoiéticas, desta maneira a reativação ou persistência de hematopoiese extra medular, sobretudo nos órgãos abdominais como fígado e baço, é o único processo pelo qual o feto ou neonato podem aumentar a produção e a reserva hematopoiética (RASKIN, 1998).

A medula ativa (medula vermelha) participa na formação e liberação de várias linhagens de células sanguíneas, armazenamento e reciclagem de ferro, fagocitose de restos celulares e produção de anticorpos (THRALL, 2007). A celularidade normal da medula óssea é variável e depende principalmente da idade do indivíduo. Normalmente cerca de 50% é de medula vermelha e consiste em células nucleadas, outros 50% são medula amarela e correspondem à gordura. Os elementos celulares nucleados encontrados correspondem às linhagens eritróide, mielóide, monocítica, linfocítica, megacariocítica e do estroma medular (GRINDEM, 2002). Indivíduos adultos são capazes de aumentar a produção medular de eritrócitos de seis a oito vezes quando submetidos a estresse hemolítico crônico, transformando os espaços ocupados com gordura em medula óssea vermelha ativa, particularmente em estados neoplásicos (LATIMER, 1997).

Segundo Grindem (2002), os tipos celulares presentes na medula óssea são bastante heterogêneos em relação ao tamanho, formato e ao imunofenótipo. Em estudos iniciais, apenas as células-tronco hematopoiéticas eram consideradas como sendo células-tronco pluripotenciais comuns.

Estudos recentes têm revelado a plasticidade das células-tronco, que podem se diferenciar em células não hematopoiéticas de vários tecidos, incluindo aquelas do sistema nervoso central, pulmões, músculos esqueléticos, do fígado, pâncreas, pele, trato gastrointestinal e coração (LEE et al., 1993; GUSSONI et al., 2002; OKAMOTO, 2002; BADIIVAS et al., 2003).

A capacidade proliferativa das células-tronco declina com o passar do tempo (LIPSCHITZ et al., 1994), podendo causar implicações clínicas à recuperação da medula óssea em animais idosos, após agressão medular.

A avaliação citológica da medula óssea deve ser feita de acordo com informações do histórico, sinais clínicos, exame físico e resultados laboratoriais do paciente além dos parâmetros hematológicos de uma amostra de sangue periférico coletado horas antes da coleta da amostra de medula óssea para citologia (TYLER et al., 2009). O exame da medula óssea é geralmente gratificante na avaliação de animais com anemias arregenerativas, neutropenia persistente ou trombocitopenia persistente

(KEARNS; EWING, 2006; WEISS, et al. 2006). A avaliação citológica também pode ser empregada para a verificação do envolvimento da medula em algumas condições neoplásicas como em linfomas e mastocitomas, para a identificação de agentes etiológicos e em pacientes com evidências de quadros de hiperglobulinemia (WELLMAN; RADIN, 1999; GRINDEM, 2002). Com o material coletado pode-se realizar diversos exames, como o mielograma, proteinograma, imunohistoquímica, citogenética e bioquímica. Desta forma, a avaliação ideal da celularidade medular requer a integração das informações obtidas do aspirado à luz dos achados da avaliação do sangue periférico (FLEURY, 2007).

Os principais distúrbios mieloproliferativos estão relacionados ao aumento da celularidade das linhagens mielóides ou eritróides podendo estar diretamente ligados com a resposta à perda sanguínea e destruição celular. Elevações inexplicadas no número de células são exemplos de anormalidades proliferativas em que o mielograma está indicado, e incluem a policitemia, leucocitose ou trombocitose persistentes. Existem várias condições secundárias que resultam em policitemia, como a hipóxia, desidratação, neoplasias, hipertireoidismo ou contração esplênica. A elevação inexplicada de qualquer linha leucocitária sem uma doença inflamatória aparente é um também um fator indicativo para a avaliação da medula. O aumento no número de plaquetas pode ser secundário à perda crônica de sangue, inflamação crônica, esplenectomia, síndrome de "Cushing" e diabetes mellitus. Entretanto, uma trombocitose inexplicada pode ser resultado de uma neoplasia da linhagem plaquetária e o exame da medula óssea torna-se necessário. (THRALL, 2007).

A coleta de medula óssea é considerada como um procedimento pouco invasivo, rápido e fácil quando comparado à biópsia. Além de não causar prejuízos ao animal, ela tem poucas contra-indicações e as complicações são raras. A contenção, a sedação e a anestesia geralmente oferecem mais riscos aos pacientes do que o procedimento em si.

A hemorragia é uma preocupação teórica mesmo em animais trombocitopênicos. As infecções iatrogênicas são possíveis, mas o risco é mínimo, especialmente se a pele da área pela qual é realizado o aspirado estiver adequadamente preparada (HARVEY, 1984; HOFF, et al. 1985 e GRINDEM, et al. 2002).

Em 1929, utilizou-se pela primeira vez a punção aspirativa da medula óssea para o estudo citológico sistemático, proporcionando o reconhecimento e a descrição das células precursoras hematopoiéticas. Três décadas mais tarde, Macfarland relatou as vantagens da retirada de um fragmento ósseo, utilizando agulha de Silverman. Com este método, obtinha-se uma maior quantidade de material, o que possibilitava maior número de cortes e de colorações histológicas. Em 1971, Jamshidi criou uma nova agulha para realização de biópsia de medula óssea, a qual apresentava a vantagem de ser menos traumática e mais confortável ao manuseio. A agulha de Jamshidi foi modificada por Inwood alguns anos depois, a fim de melhorar a obtenção do material celular (CURY, 2003).

De acordo com Raskin (1998), existem diversas agulhas para uso clínico. Tais agulhas servem tanto para a administração de diversos produtos sanguíneos, soluções e agentes farmacológicos em situações de emergência, quanto para a coleta de material para exames cito e histopatológicos e transplantes (JUNIOR, et al., 2008).

Quando é preciso uma grande quantidade de medula óssea, sugere-se a utilização de agulhas com um calibre maior a fim de aumentar o volume coletado em

menor tempo (OLIVEIRA, 2008; TOGNOLI et al., 2009). Situações assim são requeridas nas coletas visando à obtenção de células para transplantes de medula óssea nos casos de pacientes oncohematológicos e transplantes de células-tronco obtidas do isolamento da fração total colhida, o que difere dos cultivos celulares, que requerem uma quantidade menor de células da medula óssea. No isolamento, a quantidade de medula óssea a ser colhida é maior, pois nesse material deverá conter o número de células suficientes para o transplante.

Em cães e gatos, a medula óssea pode ser obtida na epífise dos ossos longos e nas regiões do íleo, como crista ilíaca ou borda acetabular. A crista ilíaca em cães é referida como via de acesso para coleta de medula óssea pela facilidade de localização, tanto para obtenção das células mononucleares, quanto para aquisição de células medulares, em exames histopatológicos (SAMOTO, 2006; CASTANIA, 2007; ZAMPROGNO, 2007; SALGADO, 2008).

Em cães de pequeno porte ou gatos, é preferível realizar a coleta de amostras medulares na região trans-ilíaca ou porção proximal do fêmur. Punções trans-ilíacas reduzem o risco de lesões provocadas pelo deslizamento acidental de agulha pela crista ilíaca (RASKIN, 1998). Para cães obesos ou musculosos, a porção crânio-lateral da tuberosidade maior do úmero é a melhor opção para coleta de material (RASKIN, 1998; ZAMPROGNO, 2007).

Em medicina veterinária, as pesquisas envolvendo transplante de células-tronco hematopoiéticas vêm crescendo e a terapia autóloga com células-tronco provenientes da medula óssea mostra-se efetiva para estimulação celular em reparos teciduais (ZAMPROGNO, 2007; OLIVEIRA, 2008; TOGNOLI et al., 2009).

Os modelos experimentais de transplantes de sangue periférico e medula óssea em cães têm propiciado informações pré-clínicas de extrema importância nos transplantes em humanos (NAKAGE et al., 2003).

3.2. RESPOSTA CELULAR IMUNOLÓGICA ANTITUMORAL: EFEITOS CELULARES E MECANISMOS

O ciclo celular consiste em uma sequência de processos: divisão nuclear (mitose) e divisão citoplasmática (citocinese), mas antes de uma célula típica poder se dividir deve ocorrer uma dobra no volume celular e duplicação de todos os conteúdos. Esse controle do sistema de ciclo celular tem atividade de enzimas e proteínas responsáveis por conduzir cada etapa do processo no tempo apropriado. Ele se baseia em duas famílias de proteínas que são chave para seu funcionamento, a primeira é a família das proteinoquinases, enquanto que a segunda é uma família de proteínas ativadoras especializadas, chamadas ciclinas (PELÚZIO, et al., 2006).

Grande parte da defesa imunológica provém da ação de dois mecanismos básicos, a imunidade inata específica não antigênica e a imunidade adquirida específica antigênica (FEARON et al. 1996; MEDZIHITOV et al. 1997). Nos mamíferos, os mecanismos-chave presentes no sistema imune inato incluem a habilidade de reconhecer o patógeno ou o tecido injuriado e sinalizar a presença dos mesmos para as células responsáveis pela resposta imune adquirida. O sistema imune inato é o responsável pelo processo inflamatório primário e seus componentes incluem células fagocíticas, células “natural killer” e interferon. Evolutivamente dá-se o

desenvolvimento da imunidade adquirida cujos mecanismos-chave são a habilidade de realizar o rearranjo genético na família das imunoglobulinas e nos receptores de células T (RCT) permitindo a criação de uma ampla diversidade de anticorpos antígeno-específicos e consequente memória antigênica específica (MATZINGER, 1994).

O sistema imune adquirido é altamente sofisticado e eficaz, mas para isto precisa ser regulado e conduzido por células denominadas de células apresentadoras de antígenos (CAAs). As células dendríticas (DCs) são caracterizadas de CAAs, pois possuem a habilidade de induzir a resposta imune primária e isto permite o estabelecimento de uma memória imunológica (BANCHEREAU et al. 1998). DCs progenitoras encontradas na medula óssea dão origem às precursoras que irão atuar a nível de tecidos e órgãos e onde irão residir como células imaturas com alta capacidade fagocítica. Estão presentes em órgãos não linfóides, incluindo o epitélio (epiderme e mucosa), a derme e interstício de órgãos em geral. Também são encontradas no sangue, na linfa e em todos os órgãos linfóides (SOUZA et al., 1999; KELLER, 2001). Seguindo a injúria tecidual ou orgânica, DCs imaturas capturam o antígeno e subsequentemente migram para os órgãos linfóides onde é capturada pelas células T antígeno-específicas, cujos receptores de membrana encontrados nas mesmas, reconhecem e captam os antígenos ligados às DCs (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998).

As células dendríticas quando imaturas são definidas como células marcadoras de superfície que possuem grande capacidade funcional, elas expressam receptores como CCR-1, CCR-2, CCR-3 e CXCR-1. São fagocíticas e apresentam alta capacidade de macropinocitose, o que lhes confere a capacidade de capturar os antígenos (BANCHEREAU et al. 2000) e são capazes de interagir com linfócitos T e B e modular as suas respostas (SOUZA et al., 1999; KELLER, 2001).

As células dendríticas progenitoras são originadas de duas linhagens, mielóide e linfóide (BANCHEREAU et al., 2000; SHORTMAN e LIU, 2002). Células dendríticas derivadas de linhagens distintas diferem na sua distribuição tecidual, produção de citocinas e condições de crescimento (ADAMS et al., 2005). A linhagem mielóide dá origem às DCs convencionais ou “mielóides”, compostas por: células de Langerhans (LCs), células dendríticas intersticiais (IDCs) e células dendríticas derivadas de monócitos (moDCs) (SZABOLCS et al., 1996; GATTI et al., 2000). As moDCs podem ser encontradas em órgãos linfóides periféricos e na circulação sanguínea, onde produzem grandes quantidades de fatores de necrose tumoral (TNF- α) em resposta a patógenos e outras causas de inflamação (ROSSI e YOUNG, 2005). As LCs e IDCs estão distribuídas em locais “estratégicos” do organismo em que possivelmente pode ocorrer o primeiro encontro do antígeno com o sistema imune. Assim, as LCs estão presentes na superfície epitelial da pele e mucosas, e as IDCs nos tecidos subepiteliais da derme e interstício de órgãos sólidos (ROSSI e YOUNG, 2005).

Células dendríticas “mielóides” são, ainda, subdivididas em sub-populações; porém, não foram claramente descritas as funções de cada sub-população (HEATH et al., 2001). A sub-população de DCs CD11b+ parece ser especializada no processamento de antígenos exógenos para apresentação em associação com moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II (MHC II). As DCs CD8 α + são especializadas na captura de células mortas e exercem papel na resistência a certas infecções virais. Esta sub-população também têm sido associada ao mecanismo de

apresentação cruzada, que é a capacidade de processar antígenos que não se replicam, para apresentação às células T através de moléculas de classe I (DUDZIAK et al., 2007).

A linhagem linfóide, por sua vez, é precursora das células dendríticas plasmocitóides, as quais exercem importante papel na imunidade antiviral. São também encontradas no sangue e órgãos linfóides e são produtoras de IFNs α associando-se à resposta imune antitumoral (GROUARD et al., 1997; ADAMS et al., 2005).

Células dendríticas utilizam diversos mecanismos para capturar os antígenos: fagocitose, endocitose, pinocitose e interação com receptores específicos. As proteínas dos antígenos são processadas em peptídeos e apresentadas na superfície celular ligadas às moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I ou II, onde serão reconhecidas por células T antígeno-específicas (ADAMS et al., 2005).

Antígenos adquiridos no ambiente extracelular são tipicamente processados e apresentados associados às moléculas de MHC de classe II, ao passo que moléculas de MHC de classe I associam-se a antígenos presentes no compartimento citosólico (GUERMONPREZ et al., 2003; HOUDE et al., 2003; ACKERMAN et al., 2005).

A interação entre as DCs e células T provém primeiramente pela existência de moléculas que promovem esta interação. Esta relação requer primeiramente a existência de dois sinais: o reconhecimento do complexo de peptídeos na DC pelo receptor de antígeno-específico na célula T, e o segundo sinal é a interação entre a molécula expressada pelas DCs (CD 40, CD 80 e CD 86) e seus “ligantes” nas células T. Os dois sinais devem ser promovidos pela mesma célula, e as células T que recebem estes sinais tornam-se ativadas e começam a produzir citocinas (ADLER et al. 1998).

As citocinas são agentes secretados por um tipo de célula imunológica que estimula outro tipo de célula. São proteínas com atividades diversificadas como mediação de respostas imunes e inflamatórias; atuação sobre vários tipos de células e atuação sobre processos de síntese de RNAm. Dentre as citocinas, estão as interleucinas e os interferons (HEATH et al. 2001).

As células T reconhecem o antígeno exclusivamente como peptídeo apresentado pelo Complexo de Histocompatibilidade Molecular tipo I (MHC I) ou II (MHC II). Todas as células nucleadas são equipadas com o mecanismo de processo endógeno antigênico guiado pelo MHC I. O processo pelo MHC II (exógeno) é restrito às células apresentadoras de antígenos. Dentre elas as DCs são equipadas com os dois mecanismos e em adição podem ainda empregar um terceiro processo de apresentação denominado “cross-presentation” (HEATH et al., 2001)

Pelo processo denominado exógeno (MHC II) partículas antigênicas solúveis são capturadas por macropinocitose e subsequentemente degradadas no endossomo. Geralmente neste processo as cadeias de peptídeos têm de 13-20 aminoácidos. Nas células dendríticas imaturas o MHC II está retido em um compartimento celular especial (Figura 1B). Um estímulo inflamatório desencadeia a maturação da DC, resultando em uma translocação do MHC II para a superfície da célula, onde lá permanece estável por vários dias até ser reconhecido pelas células CD 4+T (ADLER et al, 1998).

Antígenos apresentados às células T pelo MHC I (Figura 1A) são geralmente derivados de proteínas intracelulares e degradados em peptídeos de oito a nove aminoácidos (KURST et al. 1996). O processo se inicia no citosol pelo proteossoma, os peptídeos são geralmente transportados para o retículo endoplasmático (RE) pelo TAP

(transporte associado ao processo antigênico) Várias “chaperonas” residentes no RE facilitam e controlam o processo guiado para o MHC I. Os peptídeos migram então através do complexo de golgi (CG) para a superfície da célula onde então serão reconhecidos pelas células CD8+T (HEATH et al. 2001).

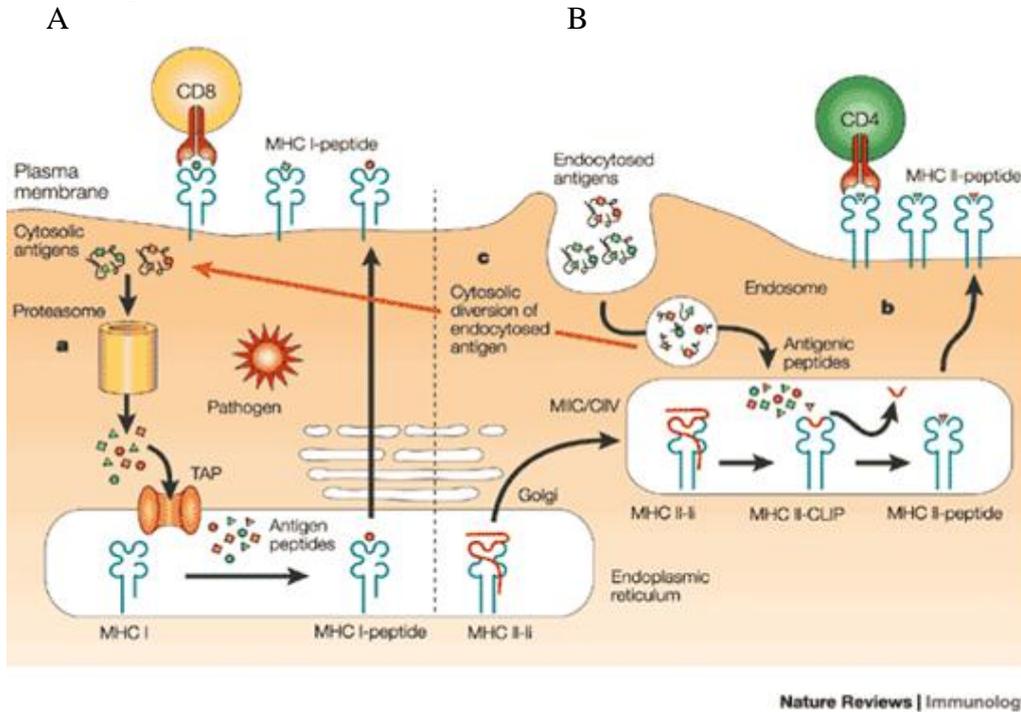


Figura 1 A e B: Caminho de processamento antigênico pelo MHC I e MHC II respectivamente (HEATH, et al. 2001).

Dentre as células apresentadoras de antígenos (CAAs) as DCs têm a habilidade única de guiar peptídeos de origem exógena ao MHC I e este processo é denominado de “cross-presentation” (Figura 2), porém a localização intracelular do complexo de peptídeos - MHC I durante este processo permanece uma incógnita (YEWDELL et al. 1999; AMIGORENA, 2003).

A descoberta científica de que células T são capazes de reconhecer antígenos tumorais *in vitro*, indica claramente que o sistema imune tem potencial para identificar e eventualmente eliminar as células neoplásicas, contudo, o fato pelo qual os tumores desenvolvem-se e crescem indicam falhas no controle imunológico do crescimento tumoral. Vários passos estão envolvidos na indução da imunidade tumoral como: a apresentação das moléculas tumorais pelas DCs precursoras que envolvem a captura das mesmas e apresentação na forma de antígeno-específico associado ao tumor (TAA) pelas DCs imaturas; a seleção e ativação de células T pelo antígeno tumoral e o reconhecimento dos elementos específicos que levam à eliminação do tumor após os efeitos do reconhecimento dos TAAs pelas células T (HEATH et al., 2001).

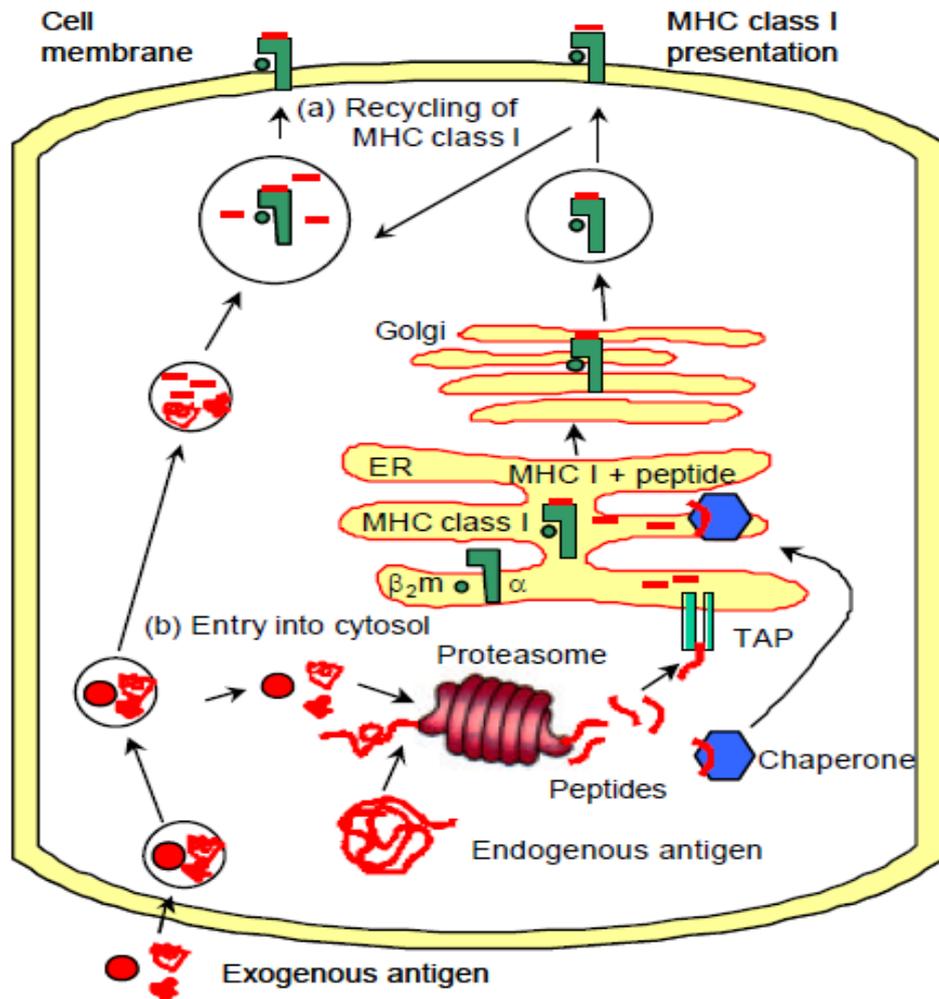


Figura 2: Caminho de apresentação do antígeno pelo método “cross-presentation” (HEATH, et al. 2001).

Tumores têm desenvolvido mecanismos para escapar da vigilância imunológica influenciando negativamente na habilidade das células CAAs às células T específicas, tanto bloqueando o reconhecimento antigênico pelo sistema imune, quanto afetando a atividade das células T (HEATH et al., 2001).

Células tumorais produzem uma grande quantidade de citocinas com capacidade imunossupressora que afetam negativamente na maturação e função das células imunológicas. *In vitro* estudos mostram que elas podem inibir a diferenciação e maturação das DCs, inibir a apresentação de antígenos e a proliferação e atividade dos linfócitos, além de causar apoptose das células T. (KHONG et al. 2002).

O surgimento da teoria da imunovigilância tumoral vêm do conhecimento da estrutura bem definida do antígeno associado ao tumor e a determinação do “caminho molecular” para a indução e manutenção de uma resposta imune anti-tumoral (HEATH et al., 2001).

Estudos científicos que demonstram o surgimento de células T citotóxicas no combate aos TAAs funcionam como provas imunológicas e têm importância crítica para o desenvolvimento de imunoterapias como as vacinas no combate ao câncer. Porém, contrário aos resultados obtidos em testes laboratoriais, a resposta clínica em pacientes

humanos não vêm obtendo o mesmo resultado. Avalisando-se detalhadamente o mecanismo, percebe-se dois desafios para o desenvolvimento e aplicações da imunoterapia contra o câncer que são a baixa imunogenicidade dos TAAs e a habilidade do tumor em escapar ao reconhecimento e destruição pelo sistema imune (MILANI et al. 2005).

3.3. PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO – HEAT SHOCK PROTEINS (HSP)

As HSPs foram descobertas por Ritossa em 1962, ao observar que a exposição de células da glândula salivar de *Drosophila sp.* ao calor, dinitrofenol ou salicilatos causaram o surgimento de um novo padrão de espessamento em cromossomos que representam sítios específicos de transição para a síntese de proteínas. O estresse térmico ou químico induz a expressão de genes, até então quiescentes, que fazem com que as células estressadas fabriquem grande quantidade de determinada classe de proteínas, chamadas de proteínas de choque térmico. O processo pelo qual essas células respondem ao estresse ficou conhecido como “Heat Shock Response” (HRS) ou resposta ao choque térmico (NEFTI; DAVIS, et al., 2005).

Nas décadas seguintes, vários pesquisadores demonstraram que as HSPs são filogeneticamente uma das mais bem conservadas famílias de proteínas encontradas em todos os organismos, desde procariontes a eucariontes, animais e vegetais. Em sua função clássica as HSPs são moléculas “chaperonas” que fornecem assistência ao processo de desdobramento das proteínas e sua translocação (GEORGOPOULOS; WELCH, 1993; BUKAU; HORWICH, 1998).

Chaperona é uma palavra inexistente no dicionário português e serve para designar substâncias que, sem fazer parte da estrutura final das proteínas, evitam interações incorretas entre estas, auxiliam em sua montagem final, bem como em sua síntese, dobramento e degradação (HENDRIK, 1993; HIGHTOWER et al. 1994). O dobramento de proteínas, processo onde são convertidas cadeias lineares de polipeptídeos em estruturas tridimensionais, é muito importante em biologia, pois possibilita que as proteínas exerçam todas as suas atividades vitais (PEETERMANS, 1995).

O sistema HSP e suas “chaperonas” estão envolvidos em uma série de funções do metabolismo proteico, tais como: enovelamento proteico, prevenção de agregação induzida por diferentes tipos de estresses e recuperação de agregados de proteínas (MAYER et al., 2001). Também participam do transporte de proteínas por membranas e da degradação protéica, estabilizando fatores de transição celular e exercem funções de controle de qualidade de proteínas recém-sintetizadas (HENDRICK et al., 1993; MAYER et al., 2001).

A indução à síntese de HSPs, a nível molecular, provém da resposta celular para uma grande variedade de estímulos ameaçadores como o choque térmico, metais pesados, estresse oxidativo, febre, inflamações e desidratação. Elas não são induzidas apenas pelo estresse, mas estão associadas também em processos fisiológicos como o ciclo celular, proliferação e diferenciação celular (MILARSKI; MORIMOTO, 1986). A expressão de HSPs associa-se igualmente com estados patológicos, em particular como o câncer, interagindo com a proteína p53 e protegendo a célula tumoral de apoptoses

(JOLLY; MORIMOTO, 2000; MOSSER et al., 2000; BEERE e GREEN, 2001; GUZHOVA; TYTELL, 2001; PARK, 2002).

As HSPs são conhecidas primariamente por suas atividades intracelulares, contudo, algumas pesquisas vêm demonstrando que as mesmas podem também atuar a nível extracelular, interagindo com o plasmalema e estando presente no sangue periférico. A primeira evidência desta inesperada função das HSPs foi sugerida na década de 80, quando foi demonstrada a transferência da mesma pelas células gliais aos axônios em células cultivadas *in vitro* (TYTELL et al., 1986; HIGHTOWER e GUIDON, 1989). Mais recentemente, observou-se que a HSP 70 sintética tem a capacidade de se fundir com outras proteínas (ex: NF-kB-HSP 70) para serem carregadas do meio extracelular ao citoplasma e ao núcleo de diferentes tipos de células em culturas *in vitro* (FUJIHARA e NADLER, 1999).

Recentemente a HSP vêm sendo proposta como uma ferramenta na terapia imunológica contra o câncer, elas podem funcionar como estrutura de ativação associada ao tumor, e se detectada na superfície de determinadas células tumorais, vão ativar a resposta imune pela ativação das células “natural killer” ou células T (HEATH et al., 2001); ou como molécula apresentadora de antígeno, gerando uma resposta imune específica através de um complexo determinado de complexo peptídeo-HSP (HSP-PC) (SRIVASTAVA; UDONO, 1994; WELLS et al, 2000).

Para a maior parte das famílias de HSPs existe pelo menos um membro que exerce uma função importante na resposta imune. As funções são diversas, entre elas estão a “sinalização de perigo” (CHEN et al., 1999; BREOLER et al., 2001), induzir a liberação de citocinas (ASEA et al., 2000; SINGH-JASUJA et al., 2000; KUPPNER et al., 2001; ZHENG et al., 2001), estimular a função de outras chaperonas (PANJWANI et al., 1999) e participar do mecanismo de “cross-presentation” e consequente estímulo de células T (UDONO et al., 1993 e 1994; SUTO et al., 1995; BINDER et al., 2001 e CASTELLI et al., 2001).

Nas últimas décadas esforços vêm sendo realizados na direção de identificar receptores e mecanismos que envolvam a ativação das HSPs e sua ligação com o sistema imune adquirido e inato. Identificou-se o CD 91 como receptor para HSPs de forma universal para a família HSP 70 e HSP 90 (BASU et al., 2001) posteriormente outros dois receptores foram identificados, foram eles o CD 40 e o LOX-1, que podem estar envolvidos no mecanismo de “cross-presentation” de antígenos mediados pelas HSPs (BECKER et al., 2002; DELNESTE et al., 2002).

Outros estudos vêm demonstrando que receptores denominados “Toll-like receptors” (TLR) estão envolvidos na ativação e maturação das células dendríticas pelas HSPs (VABULAS et al., 2002). Esses receptores de proteínas são importantes mediadores na tradução do sinal de resposta imune inata contra processos inflamatórios e infecciosos (AKIRA et al., 2000). A ligação do antígeno com o TLR na superfície celular resulta em uma cascata de eventos (Figura 3) que se inicia com o recrutamento de adaptadores moleculares e finaliza com a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias (MEDCHITOV et al., 1997; AKIRA et al., 2001).

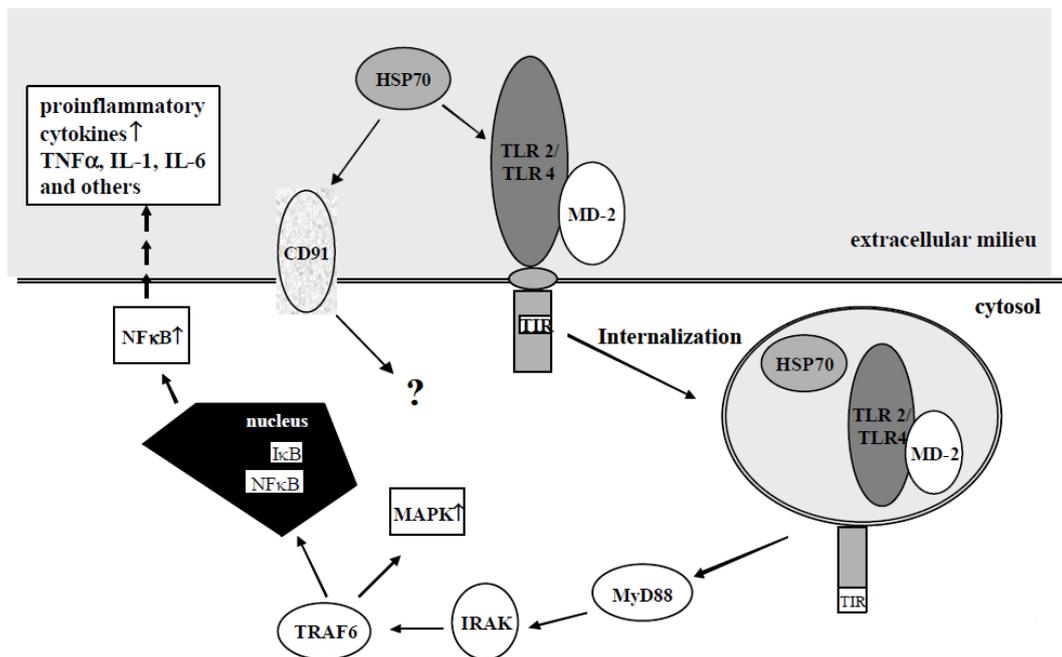


Figura 3: Interação entre HSP no meio extracelular, receptor de membrana e antígeno, resultando na liberação de citocinas pró-inflamatórias (MILANI et al., 2002).

Em 2005, Milani et al. demonstraram que a HSP livre no meio extracelular adquire propriedade imunoestimulatória colaborando com as CDs na apresentação do antígeno tumoral às células T, seguindo o mecanismo de “cross-presentation”.

4. REFERÊNCIAS

- ACKERMAN, A.L.; KYRITSIS, C.; TAMPE, R.; CRESSWELL, P. Access of soluble antigens to the endoplasmic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells. *Nat Immunol*, v.6, p.107-113, 2005.
- ADAMS, S.; O'NEILL, D.W.; BHARDWAJ, N. Recent advances in dendritic cell biology. *J. Clin. Immunol*, v.25, p.87-98, 2005.
- ADLER, A.J.; MARSH, G.S.; GUZZO, J.L. CD4+T cell tolerance to parenchymal self-antigens requires presentation by bone marrow-derived antigen-presenting cells. *Journal of Experimental Medicine*, v.187, n.10, pag.1555-1564, 1998.
- AKIRA, S.K.; KAISHO, T. The role of Toll-like receptors in innate immune responses. *Journal of endotoxin response*, v.6, n.5, pag. 383-387, 2000.
- AKIRA, S.K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *American Journal of Immunology*, v.2, n.8, pag. 675-680, 2001.
- AMIGORENA, S. (2003). "Y in X priming." *Nat Immunol* 4(11): 1047-8.

ASEA, A.; KRAEFT, S. K.; STEVENSON, M. A.; et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Journal of experimental medicine*, v.6, n.4, pag. 435-42, 2000.

BADIAVAS, E.V. et al. Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. *Journal of Cellular Physiology*, Philadelphia, v. 196, n.2, p. 245-250, 2003.

BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, v.18, pag. 767-811, 2000.

BANCHEREAU, J. and STEINMAN, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, v.392, pag. 245-252, 1998.

BASU S.; BINDER, R. J.; RAMALINGAM, T. et al. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity*, v.14, n.3, pag. 303-313, 2001.

BECKER, T.; HARTL, F. U. and WIELAND, F. CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *Journal of Cellular Biology*, v.158, n.7, pag. 1277-1285, 2002.

BEERE, H.M.; GREEN, D.R. Stress management-heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Rev. Trends Cell Bio*, vol. 11, p. 6-10, 2001.

BINDER, R. J.; BLACHERE, N. E and SRIVASTA, P. K. Heat shock protein-chaperoned peptides but not free peptides introduced into the cytosol are presented efficiently by major histocompatibility complex I molecules. *Journal of Biology Chem*. v.276 (20), pag. 17163-17171, 2001.

BRELOER, M.; DORNER, B.; MORE, S. H. et al. Heat shock proteins as danger signals : eukaryotic Hsp60 enhances and accelerates antigen-specific IFN-gamma production in T cells. *European Journal of Immunology*, v.31 (7), pag. 2051-2059, 2001.

BUKAU, B. and HORWICH, A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Journal of Cellular Biology*, v.92, n.3, pag. 351-366, 1998.

CASTANIA, V.A. Enxerto corticoesponjoso homogêneo processado quimicamente, esterelizado em óxido de etileno e embebido em medula óssea autógena. 2007. 67f. Tese (doutorado em ortopedia, traumatologia e reabilitação) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

CASTELLI, C.; CIUPITU, A. M.; RINI, F. et al. Human heat shock protein 70 peptide complexes specifically activate antimelanoma T cells. *Cancer Responses*, v.61, n.1, pag. 222-227, 2001.

CHEN, W.; SYLDATH, U.; BELLMAN, K.; BURKART, V. and KOLB, H. Human 60-kDa heatshock protein: a danger signal to the innate immune system. *Journal of Immunology*, v.162 (6), pag 3212-3219, 1999.

CHRISTENSEN, R.D. Hematopoiesis in the fetus and neonate. *Pediatric Research*. Baltimore, v. 26, n.6, p.531-535, 1989.

CIOCCA, D.R.; CLARCK, GM. Heat shock protein HSP70 in patients with axillary lymph node negative breast cancer: prognostic implications. *Journal of the national cancer institute*. v. 85, p. 570-574, 1993.

CURY, P.M. Biópsia de medula óssea e sua interpretação – o papel do hematopatologista. *Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia*, Rio de Janeiro, v.2, n.25, p.79-80, 2003.

DELNESTE, Y.; MAGISTRELLI, J.; GAUCHAT, J.; HAEUW, J.; AUBRY, K. et al. Involvement of LOX-1 in dendritic cell- mediated antigen cross-presentation. *Immunity*, v.17 (3), pag. 353-362, 2002.

DUDZIAK, D.; KAMPHORST, A.O.; HEIDKAMP, G.F.; BUCHHOLZ, V.R.; TRUMPFHELLER, C.; YAMAZAKI, S.; CHEONG, C.; LIU, K.; LEE, H-W.; PARK, C.G.; STEINMAN, R.M.; NUSSENZWEIG, M.C. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. **Science**, v.315, p.107-111, 2007.

FEARON, D. T. and LOCKSLEY, R. M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, v.272, pag. 50-53, 1996.

FLEURY, S.A. Biópsia de medula óssea (BMO) e sua relação com o aspirado de medula óssea (AMO). 2007. Acessado em 20 de Novembro de 2009. Online. Disponível em: <http://www.fleury.com.br/publico/laboratorioreferencia/manualhematologia/pages>

FUJIHARA, S.M.; NADLER, S.G. Intranuclear targeted delivery of functional NF-kB by 70 kDa heat shock protein, *EMBO J*. Vol. 18, pag. 411-419, 1999.

GASPER, P.W. The hemopoietic system. In: Feldman, B.F. et al. *Schalm's veterinary hematology*. Philadelphia: Williams & Wilkins, cap. 11, p. 63-68, 2000.

GATTI, E.; VELLECA, M.A.; BIEDERMANN, B.C.; MA, W.; UNTERNAEHRER, J.; EBERSOLD, M.W. ; MEDZHITOV, R.; POBER, J.S.; MELLMAN, I. Large-scale culture and selective maturation of human Langerhans cells from granulocyte colony-stimulating factormobilized CD34_ progenitors. **J. Immunol**, v.164, p.600-607, 2000.

GEORGOPOULOS, C. and WELCH, W. J. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annual Review of Cellular Biology*, v.9, pag. 601-634, 1993.

GRINDEM C.B. Cytology of Bone Marrow. *Veterinary Clinic of Small Animals*, v.32, p. 1313-1374, 2002.

GROUARD, G.; RISSOAN, M.C.; FILGUEIRA, L.; DURAND, I.; BANCHEREAU, J.; LIU, Y.J. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with IL-3 and CD40- ligand. *J Exp Med*, v.185, p.1101-1111, 1997.

GUERMONPREZ, P.; SAVEANU, L.; KLEIJMEER, M.; et al. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature*, v. 425, pag. 397-402, 2003.

GUSSONI, E. ET AL. Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular Dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *Journal of Clinical Investigation*, New York, v. 110, n. 6, p. 807-814, 2002.

GUZHOVA, I.; TYTELL, M. In Vitro studies show that Hsp 70 can be released by glia and exogenous Hsp 70 can enhance neuronal stress tolerance. *Brain Res. Vol. 914*, pag. 66-73, 2001.

HARVEY, J.W. Canine bone marrow: Normal hematopoiesis, biopsy techniques and cells identification and evaluation. *Comp. Ed. Pract. Vet.*, v.6, pag. 909, 1984.

HEATH, W. R. and CARBONE, F. R. Cross-presentation in viral immunity and selftolerance. *Nature Review of Immunology*, v.1, n.2, pag. 126-134, 2001.

HENDRICK, J.P. Molecular chaperone functions of heat shock proteins. *Annual Rev. Biochem.* v. 62, pag. 84-349, 1993.

HIGHTOWER L.E., TAKENAKA, I.M. Interactions of vertebrate hsc 70 and hsp 70 with unfolded proteins and peptides. In: R. Morioto, A., Tissières and C. Georgopoulos, editors. *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; pag. 179-207, 1994.

HOFF. B.; LUMSDEN, J.H. and VALLI, V. An appraisal of bone marrow biopsy in assessment of sick dogs. *Can. J. Comp. Med.*, v. 49, pag. 34-42, 1985.

HOUDE, M.; BERTHOLET, S.; GAGNON, E.; BUNET, S.; GOYETTE, G.; et al. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature*, v.425 pag. 402-406, 2003.

JOLLY, C. and MORIMOTO, R. I. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *Journal National of Cancer Institute*, v.92, pag 1564-1572, 2000.

JUNIOR, I.F. et al. Punção e Infusão intra-óssea, 2008. Acessado em 15 de Agosto, 2009. Online, disponível em: www.uff.br/ph/artigos/intraossea.pdf

KEARNS, S.H. and EWING, P. Causes of canine and feline pancytopenia. *Comp. Cont. Ed Pract Vet*, v. 28, pag. 122, 2006.

KHONG, H. T. and RESTIFO, N. P. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Journal of National Immunology*, v.3, n.11, pag. 999-1005, 2002.

KUPPNER, M. C.; GASTPAR, R.; GELWER, S.; ISSELS, R. D. The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. *European Journal of Immunology*, v.31, pag. 1602-1609, 2001.

KURTS, C.; HEATH, W. R.; CARBONE, F. R.; ALLISON, J.; MILLER, J. F. and KOSAKA, H. Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, v.184, n.3, pag. 923-930, 1996.

LATIMER, K.S. Leukocytes in health and disease. In Ettiger S.J. (ed): *Text book of veterinary internal medicine: disease of dog and cat*. 4^a ed. Philadelphia, WB Saunders, p. 2616-2666, 1997,

LEE, G.R. et al. (Ed): *Wrintrobe's clinical hematology*. 9th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

LIPSCHITZ, D.A. et al. Effect of age on hematopoiesis in man. *Blood*, New York, v. 63, n. 3, p. 502, 1994.

LIU, F.F.; MILLER, N. The potential role of HSP 70 as an indicator of response to radiation and hyperthermia treatments for recurrent breast cancer. *International Journal of Hyperthermia*. v. 12, p. 197-208, 1996.

MATZINGER, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annual Review of Immunology*, v.12, pag. 991-1045, 1994.

MAYER M.P., BREHMER, D. Hsp 70 chaperone machines. *J. Adv. Protein Chemin.* v. 59; pag. 1-44, 2001.

MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P. and JANEWAY, C. A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, v.388, pag. 394-397, 1997.

MILANI, V.; NOESSNER, E.; GHOSE, S.; KUPPNER, M.; AHRENS, B.; SCHARNER, A.; GASTPAR, R. and ISSELS, R. D. Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation. *International Journal of Hyperthermia*, v.18, n.6, pag. 563-575, 2005.

MILARSKI, K. L.; MORIMOTO, R. I. Expression of human HSP70 during the synthetic phase of the cell cycle. *Nathional Academic Science USA*, v.83, pag. 9517-9521, 1986.

MORIMOTO, R.I. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock gens. *Sciense*, v.259, p. 1409-1410, 1993.

MOSSER, D. D.; CARON, A.W.; BOURGET, L.; MERIIN, A. B.; SHERMAN, M. Y.; MORIMOTO, R. I. and MASSIE, B. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Molecular Cell Biology*, v.20, pag. 7146-7159, 2000.

NAKAGE, A.P.M. et al. Estudo da células sanguíneas do cordão umbilical de cães. In: Congresso Brasileiro de Clínicos de Pequenos Animais (Anclivepa), 24., Belo Horizonte, MG, Anais... Belo Horizonte: Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais, 2003.

NEFTI, O.; DAVID, J.C. Overexpression of alpha B crystalin in the gastrointestinal tract of the newborn piglet after hypoxia. *Lab. Press.*, v. 24, pag. 455-461, 2005.

NYLANDSTED, J.; DANIELEWICS, A. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 200, n. 4, pag. 425-435, 2004.

OKAMOTO, R. Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nature Medicine*, New York, v. 8, p. 1011-1017, 2002.

OLIVEIRA FILHO, J.C.; MAZUDA, E.K. e BARROS, C.S.L. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Rio de Janeiro, vol.30, n. 2. 2010.

OLIVEIRA, G.K. Células-tronco mononucleares autólogas na cicatrização de defeitos tibiais agudos experimentais de cão. 2008. 50f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

PANJWANI, N.; AKBARI, O.; GARCIA, S.; BRAZIL, M. and STOCKINGER, B. The HSC73 molecular chaperone: involvement in MHC class II antigen presentation. *Journal of Immunology*, v.163, pag. 1936-1942, 1999.

PARK, H.S. Heat shock protein hsp 72 is a negative regulator of apoptosis signal-regulating kinase 1. *J. Cell. Biol.* Vol. 22, pag. 7721-7730, 2002.

PEETERMANS, W.E. Heat shock proteins in medicine. *Acta Clin. Belg.* v.50, cap. 3, pag. 131, 1995.

- PELÚZIO, M.C.G.; VOLP, A.C.P.; QUEIROZ, I.C. As proteínas supressoras em neoplasias malignas – Conhecendo seu papel. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, v3, n.21, p.233, 2006.
- RASKIN, R. Medula óssea. In: SLATTER, D. Manual de cirurgia de pequenos animais. São Paulo: Manole, Cáp. 64, p. 1135-1142, 1998.
- ROSSI, M.; YOUNG, J.W. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. **J. Immunol.**, v.175, p.1373-1381, 2005.
- SALGADO, V.R. Avaliação do cultivo microbiológico de aspirados de medula óssea e sangue no diagnóstico da brucelose canina. *Pubvet, Botucatu*, v.2, n.24, p. 66-71, 2008.
- SAMOTO, V.Y. Terapia celular cardíaca: vias de infusão de células mononucleares em cães e gatos srd. 2006. 105f. Dissertação (Mestrão em Ciência Veterinária) – Curso de Pós- graduação em anatomia dos animais domésticos e silvestres, USP.
- SHORTMAN, K.; LIU, Y.J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nature Rev. Immunol.**, v.2, p.151-161, 2002.
- SINGH-JASUJA, H.; SCHEDER, H. U. and SCHILD, H. The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *European Journal of Immunology*, v.30, pag. 2211-2215, 2000.
- SOTI, C.; NAGY, E.; FERDINANDY, P. Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. *British Journal of Pharmacology*. v. 146, pag. 769-780, 2005.
- SRIVASTAVA, P. K. and UDONO, H. Heat shock protein-peptide complexes in cancer immunotherapy. *Journal of Immunology*, v.6, pag. 728-732, 1994.
- STUART, R.A.; CYR, D.M.; NEUPERT, W. HSP 70 in mitochondrial biogenesis: from chaperoning nascent polypeptide chains to facilitation of protein degradation. *Experientia*, v. 50, p. 1002-1011, 1994.
- SUTO, R. and SRIVASTAVA, P. K. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science*, v.269, pag.1585-1588, 1995.
- SZABOLCS, P.; AVIGAN, D.; GEZELTER, S.; CIOCON, D.H.; MOORE, M.A.S.; STEINMAN, R.M.; YOUNG, J.W. Dendritic cells and macrophages can mature independently from a human bone marrow-derived, post-CFU intermediate. **Blood**, v.87, p.4520-4530, 1996.
- THRALL, M.A. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. 1ª ed., Ed. Roca, p. 141-169, 2007.

TOGNOLI G.K. et al. Transplante autólogo de células mononucleares da medulla óssea em úlcera de córnea experimental em cães. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.39, n.1, p.148-155, 2009.

TYLER, R.D.; COWELL, R.L.; DENICOLA, D.B. Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos. Ed. Medvet, 3ed. pag. 423-451, 2009.

TYTELL, M. Heat shock-like protein is transferred from glia to axon. *Brain Res.* v. 363, pag. 161-164, 1986.

UDONO, H. and SRIVASTAVA, P. K. Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity." *Journal of Experimental Medicine*, v.178, n.4, pag.1391-1396, 1993.

UDONO, H. and SRIVASTAVA, K. Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced proteins gp96, hsp90, and hsp70. *Journal of Immunology*, v.152, pag. 5398-5403, 1994.

VABULAS, R. M., P. Ahmad-Nejad, S. Ghose, C. J. Kirschning, R. D. Issels and H. Wagner (2002). "HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway." *J Biol Chem* **277**(17): 15107-12.

VARGAS ROIG, L.M.; TELLO, O.; et al. Heat shock protein expressions and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *International Journal of Cancer*, v. 79, pag. 468-475, 1998.

WEI, Y.Q.; ZHAO, X.; KARIYA, Y. et al. Inhibitors of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat shock protein (HSP 70) expression in tumor cells. *Cancer Immunology and Immunotherapy*, v. 40, p. 73-78, 1995.

WEISS, D.J. A retrospective study of the incidence and the classification of bone marrow disorders in the dog at a veterinary teaching hospital. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 20, pag. 955, 2006.

WELCH, W. J. and J. P. Suhan (1993). "Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress." *J Cell Biol* **103**(5): 2035-52.
WELLMAN, M.L.; RADIN, M.J. *Bone Marrow Evaluations in Dogs and Cats*. Wilmington, Del, The Gloyd Group, 1999.

WELLS, A. D.; MALKOVSKY, M. Heat shock proteins, tumor immunogenicity and antigen presentation: an integrated view. *Immunology Today*, v.21, n.3 pag 129-132, 2000.

YEWDELL, J. W.; BENNINK, J. R. Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: implications for generating CD8+ T cell

responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines. *Advance in Immunology*, v.73 pag.1-77, 1999.

ZAMPROGNO, H. Células-tronco esqueléticas para o tratamento da não união de fraturas. *Acta Scientiae Veterinarie*, Porto Alegre, v.35, v.2, p.289-290, 2007.

ZHENG, H.; DAI, J.; STOILOVA, D.; LI, Z. Cell surface targeting of heat shock protein gp96 induces dendritic cell maturation and antitumor immunity. *Journal of Immunology*, v.167, n.12 pag.6731-6735, 2001.

ARTIGO CIENTÍFICO

EXPRESSION EXTRACELULAR DAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO A NÍVEIS MEDULAR E PERIFÉRICO EM CADELAS (*Canis familiaris*) PORTADORAS DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS.

EXTRACELLULAR EXPRESSION OF HEAT SHOCK PROTEINS FROM BONE MARROW AND PERIPHERAL BLOOD LEVELS IN BITCHES (*Canis familiaris*) WITH MAMMARY TUMORS.

RESUMO

O tumor de mama é a neoplasia mais frequente nas cadelas, e o aprimoramento de métodos investigatórios sobre sua origem e desenvolvimento fazem com que novas pesquisas surjam no intuito de desvendar os mecanismos elaborados pelo organismo na tentativa de se defender contra esta enfermidade. A expressão da proteína de choque térmico (HSP) tem sido observada em muitas neoplasias, incluindo o câncer de mama. O objetivo deste trabalho foi investigar a expressão extracelular das proteínas de choque térmico (HSPs) à níveis medular e periférico em cadelas portadoras de neoplasias mamárias atendidas no serviço ambulatorial do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foram coletadas amostras de 40 cadelas, destas, 20 eram portadoras de neoplasias mamárias e foram encaminhadas para mastectomia formando o grupo estudo, e outras 20 cadelas clinicamente sadias foram encaminhadas para cirurgia de ovariosalpingohisterectomia (OSH) eletiva (grupo controle). A HSP 90 kDa foi detectada em 20% das amostras do grupo estudo e em 10 % das amostras do grupo controle a nível periférico e a HSP 99 kDa se expressou em 50% das amostras do grupo estudo a nível medular. Outra proteína detectada foi a de peso molecular 150 kDa, também considerada como proteína ligada ao estresse celular, sua expressão foi evidenciada em 25% das amostras a nível medular no grupo estudo. De um modo geral, os resultados obtidos demonstraram haver expressão sorológica das proteínas ligadas ao estresse celular tanto a nível medular quanto a nível periférico em cadelas portadoras de neoplasias mamárias, porém não se pode afirmar que a suas expressões extra-celulares estejam ligadas unicamente à presença da neoplasia.

Palavras Chave: HSP, Medula óssea, Canino.

ABSTRACT

Tumor of the breast is the most common tumor in bitches, and how to apprimorate the methods to investigative about its origin and development causes is a new research in order to unravel the mechanisms established by the body in an attempt to defend against this disease. The goal of this study was to investigate the expression of extracellular heat shock protein (HSPs) to the bone marrow and peripheral levels in bitches with mammary tumors, met in the Veterinary Hospital outpatient service of the Universidade Federal Rural de Pernambuco, 40 samples were collected from these bitches, 20 were with mammary tumors, and were forwarded to mastectomy forming the group study, and other clinically healthy 20 bitches were forwarded to sterilization (O.S.H) elective (control group). HSP 90 kDa has been detected in 85% of the samples of peripheral level study group, 60% samples of the bone marrow in the same group and 35% of the samples of peripheral level control group. Another protein detected was the molecular weight 150 kDa, also regarded as linked to cellular stress, her expression was appear in

25% of the samples at bone marrow and in 75% of the samples at peripheral level group study. Generally, the results obtained demonstrate there is expression of sorological proteins linked to cellular stress both at the peripheral and bone marrow levels in bitches with mammary tumors, though we cannot say that their extra-cellular expressions are connected only at presence of tumor.

Key Words: HSP, Bone Marrow, Dogs.

INTRODUÇÃO

O estudo do câncer de mama em cadelas reveste-se de importância pela frequência com que surgem na rotina clínica de pequenos animais, constituindo uma das formas mais comuns de neoplasias nesta espécie (OLIVEIRA FILHO et al, 2010). As modificações na expressão de determinadas proteínas, associadas ao processo de malignização celular, necessitam ser caracterizadas e podem se tornar um dos pontos-chave no diagnóstico e na terapia tumoral. Um segmento promissor, são as pesquisas a respeito da resposta celular ao estresse, envolvendo um grupo de proteínas denominadas “proteínas de choque térmico” ou HSP (heat shock protein) (WEI et al., 1995; NYLANDSTED et al., 2004). As aplicações clínicas provenientes destes estudos são potencialmente vastas e podem ser fundamentais em diversas doenças, como o câncer (CIOCCA; CLARCK, 1993; LIU; MULLER, 1996; VARGAS; TELLO, 1998; SOTI et al., 2005).

As HSP foram descobertas por Ritossa em 1962, ao observar que a exposição de células da glândula salivar de *Drosophila* sp. ao calor, dinitrofenol ou salicilatos causaram o surgimento de um novo padrão de espessamento em cromossomos que representam sítios específicos de transição para a síntese de proteínas. O estresse térmico ou químico induz a expressão de genes, até então quiescentes, que fazem com que as células estressadas fabriquem grande quantidade de determinada classe de proteínas, chamadas de proteínas de choque térmico. O processo pelo qual essas células respondem ao estresse ficou conhecido como “Heat Shock Response” (HRS) ou resposta ao choque térmico (NEFTI; DAVID, 2005).

Essas proteínas são conhecidas primariamente por suas atividades intracelulares, contudo, algumas pesquisas vêm demonstrando que as mesmas podem também atuar a nível extracelular, interagindo com o plasmalema e estando presente no sangue periférico. A primeira evidência desta inesperada função das HSPs foi sugerida na década de 80, quando foi demonstrado a transferência da mesma pelas células gliais aos axônios em células cultivadas *in vitro* (TYTELL, 1986; HIGHTOWER e GUIDON, 1989).

Recentemente a HSP vem sendo proposta como uma ferramenta na terapia imunológica contra o câncer, pode funcionar como estrutura de ativação associada ao tumor, e se detectada na superfície de determinadas células tumorais, vai ativar a resposta imune através das células “natural killer” ou células T (HEATH et al, 2001).

As células T, assim como outras células fagocíticas, fazem parte do sistema imune inato, que é o responsável pelo processo inflamatório primário. Evolutivamente dá-se o desenvolvimento da imunidade adquirida a qual permite a criação de uma ampla diversidade de anticorpos antígeno-específicos e conseqüente memória antigênica específica (MATZINGER, 1994).

O sistema imune adquirido é altamente sofisticado e eficaz, mas para isto precisa ser regulado e conduzido por células denominadas de células apresentadoras de antígenos (CAA). As células dendríticas (DC) são caracterizadas de CAA, pois possuem a habilidade de induzir a resposta imune primária e isto permite o estabelecimento de uma memória imunológica (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998). DC progenitoras encontradas na medula óssea dão origem às precursoras que irão atuar a nível de tecidos e órgãos e onde irão residir como células imaturas com alta capacidade fagocítica. Estão presentes em órgãos não linfóides, incluindo o epitélio (epiderme e mucosa), a derme e interstício de órgãos em geral. Também são encontradas no sangue, na linfa e em todos os órgãos linfóides (SOUZA et al., 1999; KELLER, 2001). Seguindo a injúria tecidual ou orgânica, DC imaturas capturam o antígeno e subsequentemente migram para os órgãos linfóides onde são capturadas pelas células T antígeno-específicas, cujos receptores de membrana encontrados nas mesmas, reconhecem e captam os antígenos ligados às DC (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998).

A interação entre as DC e células T provém primeiramente pela existência de moléculas que promovem esta interação. Esta relação requer primeiramente a existência de dois sinais: o reconhecimento do complexo de peptídeos na DC pelo receptor de antígeno-específico na célula T, e o segundo sinal é a interação entre a molécula expressada pelas DC (CD 40, CD 80 e CD 86) e seus “ligantes” nas células T. Os dois sinais devem ser promovidos pela mesma célula, e as células T que recebem estes sinais tornam-se ativadas e começam a produzir citocinas (ADLER et al. 1998).

Nas últimas décadas, esforços vêm sendo realizados na direção de identificar receptores e mecanismos que envolvam a ativação das HSP e sua ligação com o sistema imune adquirido e inato. Identificou-se o CD 91 como receptor para HSP de forma universal para a família HSP 70 e HSP 90 (BASU et al., 2001) posteriormente outros dois receptores foram identificados, foram eles o CD 40 e o LOX-1, que podem estar envolvidos no mecanismo de “cross-presentation” de antígenos mediados pelas HSP (BECKER et al., 2002; DELNESTE et al., 2002).

Outros estudos vêm demonstrando que receptores denominados “Toll-like receptors” (TLR) estão envolvidos na ativação e maturação das células dendríticas pelas HSP. Esses receptores de proteínas são importantes mediadores na tradução do sinal de resposta imune inata contra processos inflamatórios e infecciosos (AKIRA; KAISHO, 2000). A ligação do antígeno com o TLR na superfície celular, resulta em uma cascata de eventos (Figura 3) que se inicia com o recrutamento de adaptadores moleculares e finaliza com a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias (MEDCHITOV et al., 1997; AKIRA; KAISHO, 2001).

A descoberta científica de que células T são capazes de reconhecer antígenos tumorais *in vitro*, indica claramente que o sistema imune tem potencial para identificar e eventualmente eliminar as células neoplásicas, contudo, o fato pelo qual os tumores desenvolvem-se e crescem indicam falhas no controle imunológico do crescimento tumoral (HEATH et al., 2001).

Devido à importância que a neoplasia mamária representa na rotina clínica e cirúrgica de pequenos animais, e frente às descobertas das atividades imunológicas conferidas a determinadas proteínas que se expressam em condições celulares de desequilíbrio homeostático, fez-se necessário a avaliação da expressão das proteínas de

choque térmico frente à presença da neoplasia, no intuito de fornecer dados para futuros estudos voltados ao aprimoramento do diagnóstico e terapia antitumoral em animais.

Objetivou-se com este estudo investigar a expressão das proteínas de choque térmico a níveis medular e periférico em cadelas portadoras de neoplasias mamárias.

MATERIAL E MÉTODOS

SELEÇÃO DOS PACIENTES

O projeto foi primeiramente encaminhado à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (decisão CTA-DMV n° 79/10). Após aprovação da CEUA e autorização dos tutores dos animais, o estudo foi realizado no Hospital Veterinário do Departamento de Medicina Veterinária da mesma Universidade, e em uma clínica veterinária particular. Foram utilizadas 40 cadelas adultas, de idade, peso e raças variadas, atendidas na rotina ambulatorial e cirúrgica. Os animais foram então divididos em dois grupos, o primeiro grupo foi formado por cadelas saudáveis, encaminhadas ao centro cirúrgico para realização de ovariossalpingohisterectomia (OSH) eletiva, e foi considerado como grupo controle. O segundo grupo, que foi considerado como grupo estudo, foi formado por cadelas portadoras de neoplasias mamárias e encaminhadas ao bloco cirúrgico para mastectomias.

Ainda no atendimento ambulatorial, todos os animais foram examinados clinicamente e foi solicitada a radiografia torácica das cadelas com neoplasias mamárias a fim de evidenciar a existência de metástases, só participando do estudo as cadelas que não apresentaram tal alteração. Nos pacientes aptos foi realizada a colheita de três mL de sangue periférico pela veia cefálica esquerda, esta alíquota foi depositada em frasco contendo solução de EDTA a 10% (Ácido etilenodiaminotetraacético) como substância anticoagulante e então destinada à realização de hemograma pré-operatório.

PROCEDIMENTO CIRÚRGICO E ANESTESIA

Os pacientes que não apresentaram alterações hematológicas, foram encaminhados para a sala de preparação pré-operatória, onde foram administrados os protocolos pré-anestésico e analgésico composto por Acepromazina 0,2% (0,1 mg/kg I.M.) e Cloridrato de tramadol (2 mg/kg I.M.) respectivamente. Posteriormente foi realizada a tricotomia do campo operatório e do sítio de coleta da medula óssea e administrou-se por venóclise solução fisiológica 0,9% (NaCl). Como protocolos anti-inflamatório e antibiótico pré-operatório, todos os animais receberam Cetoprofeno (1 mg/kg I.V.) e Cefalotina sódica (30 mg/kg I.V.), protocolos estes que se estenderam no período pós-cirúrgico por via oral e na mesma dosagem SID e BID, respectivamente, durante cinco dias. Foi realizada indução anestésica nos pacientes com a utilização de Propofol 10% (4 mg/kg I.V.), após a perda do reflexo laringo-traqueal foi realizada sondagem orotraqueal e manutenção de plano anestésico com Isoflurano (MASSONE, 1999).

Em seguida à anti-sepsia do campo operatório com álcool 70° e Iodo-povidona a 10%, as cirurgias de mastectomia e ovariossalpingohisterectomia foram realizadas seguindo técnica descrita por Fossum (2002), os pacientes foram reavaliados a cada 48 horas para limpeza da ferida cirúrgica e troca de curativos e após sete dias, foram removidos os pontos cirúrgicos.

PUNÇÃO E COLHEITA DA MEDULA E DO SANGUE PERIFÉRICO.

No bloco cirúrgico e imediatamente após o término das cirurgias, foi realizada a anti-sepsia da região a ser manuseada para coleta da medula, utilizando-se álcool 70° e Iodopovidona 10%. A amostra da medula foi então coletada por punção da tuberosidade maior do úmero, por intermédio de seringas estéreis de cinco mL. Para penetrar no canal medular, foram utilizadas agulhas de calibre 40 x 12 mm (Figuras 4, 5 e 6) e 25 x 7 mm proporcionalmente ao tamanho do animal e à espessura da cortical óssea, segundo técnica descrita por Castania (2007).

Foi determinado como protocolo a colheita de dois mL de material medular de cada cadela. Metade da alíquota coletada de cada paciente foi acondicionada em tubos plásticos tipo ependorf® contendo EDTA 2% como substância anticoagulante para realização do mielograma e a outra metade da alíquota foi acondicionada em tubos de ensaio sem anticoagulante que foram destinados à centrifugação, após centrifugado o material foi então depositado em frascos tipo ependorf® e mantido congelado à temperatura de - 4°C para posterior determinação da expressão das HSP por eletroforese.



Figura 4: Punção da cavidade medular, com agulha calibre 40 x 12 mm, do sítio localizado na tuberosidade maior do úmero direito.



Figura 5: Agulha 40 x 12 mm, após introdução no canal medular do sítio localizado na tuberosidade maior do úmero direito em cadela.



Figura 6: Coleta do material medular por punção aspirativa do sítio localizado na tuberosidade maior do úmero direito em cadela.

As amostras de sangue periférico destinadas à investigação da expressão da HSP a nível periférico, foram coletadas por venopunção da jugular esquerda, com o paciente ainda anestesiado e em decúbito lateral esquerdo, utilizou-se seringas estéreis de três mL e agulhas de calibre 25 x 7 mm. A alíquota de cada paciente foi acondicionada em tubos de ensaio identificados, sem substância anti-coagulante, para posterior centrifugação e obtenção do soro.

PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Imediatamente após a colheita, as amostras de medula óssea, assim como do sangue periférico, foram submetidas a análises nos Laboratórios de Patologia Clínica do Departamento de Medicina Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco, de Patologia Clínica Veterinária (Clínica Particular) e do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA).

Avaliação do hemograma

Determinou-se a contagem dos valores de hemácias, leucócitos, plaquetas assim como determinação da concentração de hemoglobina, volume globular e índices hematimétricos (Volume Corpuscular Médio – VCM e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média – CHCM). O sangue foi analisado com auxílio do contador automático de células de marca Celm®, modelo C-530 (UFRPE) e por contagem de hemácias e leucócitos em câmara de Neubauer® (Clínica Particular), a contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em esfregaço sanguíneo corado por panótico rápido.

Mielograma

Para a realização do mielograma, a amostra medular foi imediatamente acondicionada em frasco plástico tipo ependorf® contendo solução de EDTA a 2% como substância anticoagulante. No Laboratório de Patologia Clínica foram confeccionados estiraços do material, respeitando intervalo menor que 30 minutos entre coleta e elaboração, no intuito de evitar possíveis alterações celulares estruturais iatrogênicas. Após a verificação da presença de grumos formados pelas espículas ósseas na amostra, esta pequena alíquota foi coletada do tubo plástico com o auxílio de um capilar de vidro e então depositada em lâmina de vidro para realização imediata do

estiraço como protocolo descrito por Tyler et al (2009). As lâminas foram então coradas com May-Grunwald e Giemsa (MGG) para avaliação e contagem citológica e determinação da relação mielóide:eritróide segundo técnica descrita por Thraal (2007).

Determinação da eletroforese

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com o método de Laemmli (1970), usando-se um gel de concentração de 4% e um gel de separação de 10%. Os géis foram corados por três horas em solução de Comassie brilliant blue 0,25% e descorados em solução de metanol 45%, ácido acético 10%, até a visualização das bandas, sendo posteriormente corado com nitrato de prata. A massa molecular das bandas foi determinada através do software LabImage 1D® (locus) utilizando-se como padrão de proteínas GE healthcare®, miosina (220kDa), α -2-macroglobulina (170 kDa), α -galactosidase (116 kDa), transferrina (76 kDa) e glutamato desidrogenase (53 kDa) (figura 7).

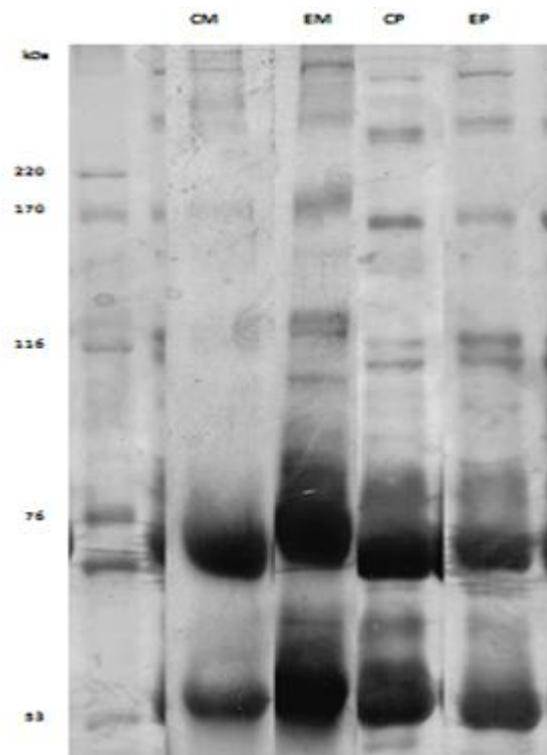


Figura 7: Expressão eletroforética de proteínas séricas medulares e periféricas de cadelas (*Canis familiaris*), utilizando-se como padrão de proteínas (GE healthcare®), miosina (220kDa), α -2-macroglobulina (170 kDa), α -galactosidase (116 kDa), transferrina (76 kDa) e glutamato desidrogenase (53 kDa).

Histopatológico

Fragmentos do tecido neoplásico de cada paciente foram recolhidos e encaminhados em frascos plásticos contendo formaldeído 10%, ao Laboratório de Patologia do Instituto Hermes Pradini© localizado na cidade de Belo Horizonte-MG, para realização dos exames histopatológicos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

HEMOGRAMA

Os valores médios de hemácias; hemoglobina; volume globular; proteína plasmática total e concentração hemoglobínica corpuscular; plaquetas e leucócitos dos grupos estudados estão apresentados nos quadros 1 e 2.

No presente estudo, os valores hematológicos médios expressos pelos animais do grupo controle, apresentaram-se dentro da normalidade quando comparados aos valores padrões para a espécie citados por Jain (1993) e Thrall (2007). Porém, a média dos valores de hemácias, hemoglobina e volume globular do grupo estudo apresentou-se inferior aos de referência, visto que seis dos 20 pacientes (30%) do grupo em questão apresentaram valores de hemoglobina abaixo de 12 g/dl. Paladini et al (2009), citam em seu estudo realizado com pacientes portadores de neoplasias que 39% apresentam valores hemoglobínicos abaixo de 12 g/dl e que 10% apresentam-se em valores abaixo de 10 g/dl onde a prevalência de anemia variou de acordo com o tipo de neoplasia, sendo mais frequentes em pacientes com linfoma/mieloma (53%) e menos frequente em pacientes com neoplasias mamárias (30%).

Segundo Latimer, Meyer. (1992); Kerr (2003) e Bush (2004), animais portadores de neoplasias podem expressar variados quadros imunocitológicos que variam entre neutrofilia, linfocitose e pancitopenia dependendo da natureza do tumor e de sua capacidade de afetar ou não a atividade das unidades formadoras de colônias granulocíticas ou agranulocíticas a nível de medula óssea ou tecido linfóide. Supõe-se que os pacientes portadores de neoplasias que participaram do presente estudo não sofreram, no momento das análises, qualquer influência sobre a atividade linfoproliferativa, não apresentando, portanto alterações em comparação aos valores padrões para espécie citados por Jain (1993) e Thrall (2007).

| | | <i>Hm</i> | <i>Hb</i> | <i>VG</i> | <i>PPT</i> | <i>VCM</i> | <i>HCM</i> | <i>CHCM</i> | <i>Plaqu</i> | <i>Leuc</i> | <i>Bast</i> | <i>Segm</i> | <i>Eos</i> | <i>Linf</i> | <i>Bas</i> | <i>Mon</i> |
|----|----|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|
| GC | M | 5,68 | 12,4 | 38,2 | 6,65 | 67,0 | 21,6 | 32,3 | 270,9 | 11,1 | 1,4 | 71,8 | 7 | 18,2 | 0,1 | 1,6 |
| | DP | 0,81 | 2,58 | 7,55 | 1,16 | 1,17 | 0,87 | 0,51 | 29,81 | 4,19 | 2,50 | 15,45 | 4,62 | 13,92 | 0,44 | 2,25 |
| GE | M | 5,15 | 11,9 | 35,4 | 6,73 | 66,8 | 21,4 | 32,0 | 283,2 | 12,4 | 1,3 | 71,7 | 6,3 | 19,7 | 0 | 1,2 |
| | DP | 0,44 | 4,05 | 10,08 | 1,07 | 1,5 | 0,77 | 0,5 | 24,76 | 6,94 | 2,24 | 15,48 | 4,47 | 14,19 | 0 | 1,14 |

Quadro 1. Resultados (média M e desvio padrão DP) dos valores hematológicos absolutos e relativos do grupo controle (GC) e estudo (GE).

| | | <i>Hm</i> | <i>Hb</i> | <i>VG</i> | <i>PPT</i> | <i>VCM</i> | <i>HCM</i> | <i>CHCM</i> | <i>Plaqu</i> | <i>Leuc</i> | <i>Bast</i> | <i>Segm</i> | <i>Eos</i> | <i>Linf</i> | <i>Bas</i> | <i>Mon</i> |
|-----|----|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|
| GEB | M | 5,38 | 13,4 | 34,2 | 7,26 | 67,2 | 21,6 | 32,1 | 279,1 | 14,6 | 1,1 | 78 | 5 | 14,6 | 0 | 1,3 |
| | DP | 1,32 | 5,14 | 12,26 | 0,76 | 1,3 | 0,62 | 0,6 | 15,5 | 8,24 | 2,18 | 13,19 | 3,52 | 13,0 | 0 | 1,49 |
| GEM | M | 5,16 | 11,7 | 36,6 | 6,20 | 66,3 | 21,2 | 32,0 | 287,4 | 10,3 | 1,5 | 65,4 | 7,7 | 24,9 | 0 | 1,1 |
| | DP | 1,22 | 2,58 | 7,81 | 1,11 | 1,62 | 0,58 | 0,38 | 10,24 | 4,86 | 2,41 | 15,6 | 5,07 | 13,98 | 0 | 0,73 |

Quadro 2. Resultados (média M e desvio padrão DP) dos valores hematológicos absolutos e relativos do grupo estudo, onde o grupo de cadelas portadoras de neoplasias mamárias malignas é representado por (GEM), enquanto que o grupo de cadelas portadoras de neoplasia mamárias benignas é representado por (GEB).

MIELOGRAMA

De acordo com Harvey (2001), Grindem (2002) e Thrall (2007), para a coleta de material medular são necessários: agulhas para biópsia de medula óssea com calibre de 15 a 18 gauge por uma a duas polegadas e seringas de dez a 20 mL. As coletas das

amostras medulares do presente estudo foram realizadas segundo técnica descrita por Castania (2007) com o uso de agulhas estéreis de calibre 40x12 mm, e seringas estéreis de três e cinco mL, o que não demonstrou ser obstáculo algum para obtenção do material.

Segundo Tyler et al (2009), a celularidade normal da medula varia de acordo com a idade do animal, pois os grumos medulares de animais muito jovens contêm pouquíssima gordura, em média 25% enquanto que 75% são células, em contrapartida os animais adultos tem uma relação de 50%-50% e animais mais velhos apresentam a relação inversa, onde 75% são gordura. Na pesquisa foram utilizados animais adultos com idades variando no intervalo de um a 12 anos, foi possível observar que os animais mais velhos apresentavam resistência periosteal maior que os animais mais novos e que o material medular dos animais mais jovens apresentava maior quantidade de grumos medulares em comparação aos animais senis.

Em todos os animais, de ambos os grupos estudados, foi possível observar no material coletado, a existência de grumos celulares e grumos de gordura. Após o esfregão e coloração da lâmina, a análise das amostras apresentaram-se normocelulares (quadros 3 e 4). A medula pode ser classificada como hipocelular, normocelular ou hipercelular. Ela é dita hipocelular quando existem condições de supressão, condições hipoplásicas, doenças infecciosas, condições tóxicas e doenças hipoplásicas idiopáticas. A medula normocelular geralmente fornece vários grumos medulares que, de acordo com a idade do animal, apresenta uma relação célula:gordura normal, podendo apresentar alterações displásicas ou discrasia. Na condição de hipercelularidade, a relação gordura:célula estará elevada, e as hiperplasias eritróide, mielóide ou granulocítica, assim como doenças mieloproliferativas (leucemias) e infiltração neoplásica são os fatores comumente responsáveis (TYLER et al, 2009).

Em relação à morfologia celular eritróide, em ambos os grupos foi possível observar poucas alterações, entre elas a vacuolização citoplasmática (Figura 8). De uma forma geral, não foi possível observar alterações dignas de nota em se tratando de displasia ou discrasia celulares. De acordo com Thrall (2007), a avaliação morfológica da série eritróide deve levar em consideração as anormalidades como alterações megaloblásticas, cariólise, picnose das células imaturas e vacuolização citoplasmática ou nuclear. Entre as alterações megaloblásticas, incluem-se padrões de cromatina nuclear excessivamente condensados, aumento do citoplasma, eritrócitos ortocromáticos macrocíticos e aumento do conteúdo de hemoglobina causando policromasia ou ortocromia nas células eritróides imaturas. Alterações como a cariólise, picnose e vacuolização do citoplasma e nuclear podem ser causadas por condições como necrose medular.

A anemia não regenerativa normalmente, é uma das indicações para a avaliação citológica da medula óssea, nestes casos frequentemente a medula se encontra hipocelular a normocelular com aumento da relação mielóide:eritróide (HARVEY,2001). Nenhum dos pacientes apresentaram anemia arregenerativa em exame hematológico como também a relação mielóide:eritróide apresentou-se dentro da faixa padronizada para a espécie por Tyler et al (2009).

Harvey (2001), Grindem (2002), Thrall (2004) e Castania (2007) citam que, para determinarmos se houve um aumento generalizado da série granulocítica, a celularidade medular e a proporção de células da medula que são granulócitos devem ser

consideradas. A presença de números excessivos de um ou mais estágios da linhagem é chamada discrasia, e assim como a presença de alterações celulares displásicas, elas podem ter como uma de suas causas as neoplasias. No presente estudo, em relação aos valores relativos da série granulocítica, pode-se observar que os animais de ambos os grupos apresentaram média dos valores relativos de granulócitos dentro do limite considerando-se o desvio padrão, não havendo sinais de displasia ou discrasia (Figuras 9 e 10).

A relação mielóide:eritróide encontrada, demonstrou supremacia das células nucleadas de origem mielóide em ambos os grupos estudados, onde a média se estabeleceu entre o intervalo máximo e mínimo de 2,22 – 1,69 células mielóides para cada uma eritróide, estando dentro do valor de referência consultado (Quadros 3 e 4). Segundo Tyler et al., (2009) a relação mielóide:eritróide quantitativa requer a classificação de todas as células das duas linhagens encontradas nos campos observados e que pelo fato de existir dificuldade na classificação das células medulares e pela alta margem de valor padrão determinado para a espécie, a relação mielóide:eritróide quantitativa não deve receber respaldo diagnóstico significativo, devendo ser apenas utilizada como mecanismo de identificação celular em pesquisas envolvendo a medula óssea.

| | | <i>VG</i> | <i>PPT</i> | <i>Mieb</i> | <i>Miel : Eri</i> | <i>Pro</i> | <i>Mie</i> | <i>Met</i> | <i>Bast</i> | <i>Segm</i> | <i>B. eos</i> | <i>C. agran</i> | |
|----|----|-----------|------------|-------------|-------------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|---------------|-----------------|-----|
| GC | M | 36,7 | 6,7 | 0 | 1,69 | 1 | 1 | 13,65 | 14,35 | 17,5 | 47,4 | 1,2 | 4,6 |
| | DP | 7,24 | 1,29 | 0 | 0,23 | --- | 0,34 | 1,97 | 5,78 | 7,94 | 12,9 | 1,03 | 4,6 |
| GE | M | 34,1 | 6,7 | 0 | 2,04 | 1 | 0 | 14,6 | 16,3 | 15,4 | 47,1 | 1,6 | 4,0 |
| | DP | 8,99 | 1,28 | 0 | 0,24 | --- | 0 | 2,45 | 8,16 | 8,84 | 13,8 | 1,87 | 5,1 |
| VR | | --- | --- | 1 | 0,75/2 | 1 | 3 | 12 | 20 | 26 | 38 | --- | --- |

Quadro 3. Resultados (M e DP) dos valores do mielograma do grupo controle (GC) e grupo estudo (GE). Valores de referência (VR) segundo Tyler et al (2009).

| | | <i>VG</i> | <i>PPT</i> | <i>Mieb</i> | <i>Miel : Eri</i> | <i>Pro</i> | <i>Mie</i> | <i>Met</i> | <i>Bast</i> | <i>Segm</i> | <i>B. eos</i> | <i>C. agran</i> | |
|-----|----|-----------|------------|-------------|-------------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|---------------|-----------------|------|
| GEB | M | 34,5 | 7,42 | 0 | 2,22 | 1 | 0 | 12,1 | 13,4 | 17,6 | 50,5 | 2 | 4,4 |
| | DP | 7,73 | 1,07 | 0 | 0,42 | --- | 0 | 1,44 | 6,35 | 8,44 | 16,63 | 2,2 | 6,38 |
| GEM | M | 33,8 | 6,0 | 0 | 1,96 | 1 | 0 | 13,1 | 15,3 | 17,0 | 51,7 | 1,2 | 1,7 |
| | DP | 10,5 | 1,13 | 0 | 0,51 | --- | 0 | 4,72 | 7,95 | 9,49 | 10,13 | 1,39 | 1,88 |
| VR | | --- | --- | 1 | 0,75/2 | 1 | 3 | 12 | 20 | 26 | 38 | --- | --- |

Quadro 4. Resultados (M e DP) dos valores do mielograma do grupo estudo, onde o grupo de cadelas portadoras de neoplasias mamárias malignas é representado por (GEM) enquanto que o grupo de cadelas portadoras de neoplasias mamárias benignas é representado por (GEB). Valores de referência (VR) segundo Tyler et al (2009).

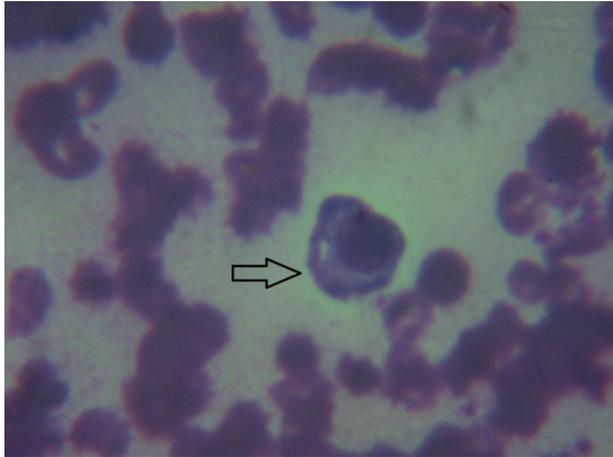


Figura 8: Esfregaço medular visualizado em objetiva de imersão, demonstrando pró-eritroblasto apresentando vacuolização citoplasmática (amostra do grupo estudo).

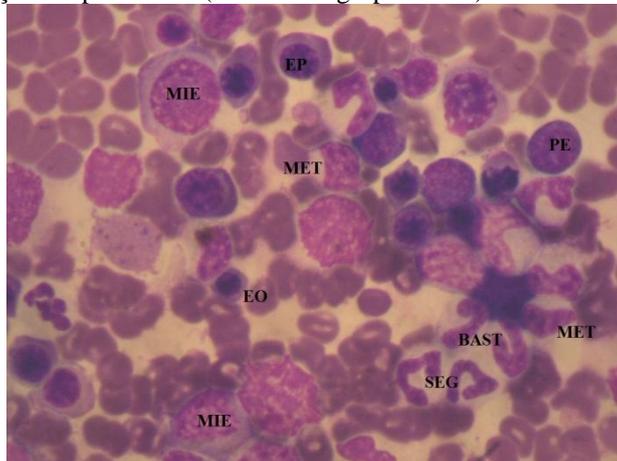


Figura 9: Esfregaço medular visualizado em objetiva de imersão demonstrando celularidade medular padrão (amostra do grupo estudo). Série mielóide granulocítica - MIE: Mielócito, MET: Metamielócito, BAST: Bastonete, SEG: Segmentado. Série eritróide-PE: Pró-eritroblasto, EP: Eritroblasto policromático, EO: Eritroblasto ortocromático.

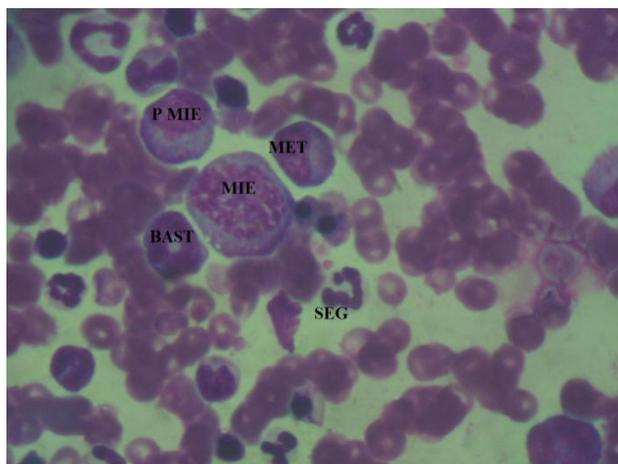


Figura 10: Esfregaço medular visualizado em objetiva de imersão demonstrando componentes celulares de linhagem granulocítica mielóide (amostra do grupo estudo). P MIE: Pró-Mielócito, MIE: Mielócito, MET: Metamielócito, BAST: Bastonete e SEG: Segmentado.

ELETROFORESE

Entre as HSP, as de peso molecular 90 kDa e 99 kDa foram as únicas que se expressaram. A HSP 90 apresentou-se em quatro das 20 amostras (20%) do grupo estudo a nível periférico e em duas das 20 amostras (10%) do grupo controle também a nível periférico, já a HSP 99 expressou-se em dez das 20 amostras (50%) do mesmo grupo a nível medular, não havendo expressão das mesmas no grupo controle (Quadro 5). Não foram encontrados na literatura qualquer estudo sobre a expressão das HSP a níveis sorológicos em animais, e ainda são poucos os estudos em pacientes humanos, entre eles, Milani et al (2005) demonstraram em seu trabalho com pacientes portadores de melanoma, que a HSP livre no meio extracelular adquire propriedades imunoestimulatórias e *in vitro* é capaz de carrear o antígeno tumoral às células dendríticas para posterior apresentação às células T, seguindo o mecanismo de “cross-presentation”. Segundo o mesmo autor, o surgimento das HSP a nível extracelular ainda é uma icógnita.

Uma outra proteína, de peso molecular 150kDa (Oxygen regulated protein-ORP) considerada como proteína ligada ao estresse celular (MATSUMOTO et al., 1996), teve sua expressão evidenciada em alguns pacientes do grupo estudo, não aparecendo nas amostras do grupo controle. Segundo os resultados dos estudos experimentais realizados, a proteína 150 kDa foi detectada em extratos de cultura de astrócitos de ratos expostos à hipóxia por 24 h, aumentando sua expressão ainda mais no período de reoxigenação e caindo ao nível basal após 24 h de normóxia, sugerindo que tal proteína contribui na resposta celular adaptativa ao estresse isquêmico. Em nosso estudo, nenhum paciente apresentou sinais clínicos de hipóxia, seja a nível ambulatorial (mucosas normocoradas, FC e FR padrões) ou mesmo no período operatório (onde foram monitorados todo o tempo quanto à saturação de oxigênio), entretanto em cinco das 20 (25%) amostras do grupo estudo a nível medular foi possível observar a expressão desta proteína (Quadro 5).

| <i>Proteínas</i> | <i>90 kDa</i> | | <i>99 kDa</i> | | <i>150 kDa</i> | |
|-----------------------|---------------|---------|---------------|---------|----------------|---------|
| <i>Nível</i> | Periférico | Medular | Periférico | Medular | Periférico | Medular |
| <i>Grupo Estudo</i> | 4 | - | - | 10 | - | 4 |
| <i>Grupo Controle</i> | 2 | - | - | - | - | - |

Quadro 5. Número de amostras que demonstraram expressões eletroforética das proteínas de choque térmico e da proteína 150 kDa ligada ao estresse celular e seus respectivos sítios de expressão.

HISTOPATOLOGIA

Os laudos dos exames histopatológicos demonstraram que 50% das amostras (dez animais) apresentaram neoplasia de caráter maligno, enquanto que os outros 50% apresentaram benignidade. Entre os pacientes que obtiveram resultado de malignidade, 30% (três animais) eram portadores de adenocarcinoma infiltrativo, outros 40% (quatro animais) apresentaram carcinoma ductal infiltrativo (havendo metástase para linfonodo regional em uma das amostras) e outros 30% (três animais) apresentaram tumor misto maligno. Entre as amostras histopatológicas benignas, 20% (dois animais) apresentaram adenoma simples, 10% (um animal) apresentou adenoma complexo multifocal enquanto que 70% (sete animais) apresentaram tumor misto benigno. De acordo com Gorman e Dobson (1995) e Withrow e Macewen (1996), os tumores de mama representaram aproximadamente 52% de todas as neoplasias na fêmea canina, sendo que 50% destas são malignas, e que os tumores mamários acometem com maior frequência fêmeas entre dez e onze anos de idade, sendo mais raras em animais com menos de cinco anos de idade. Dos 20 pacientes portadores de neoplasias mamárias que compuseram os grupos estudados, 35% (sete animais) tinham mais de dez anos e 60% (12 animais) tinha a faixa etária entre cinco a nove anos e apenas 5% (um animal) tinha menos que dois anos de idade.

Autores citam que, para as neoplasias mamárias em fêmeas da espécie canina, a mastectomia constitui a terapia de escolha, com exceção dos carcinomas inflamatórios e as metástases à distância (GORMAN e DOBSON, 1995; WITHROW e MACEWEN, 1996). Neste estudo, todos os pacientes portadores de neoplasias mamárias foram submetidos a cirurgia de mastectomia unilateral ou bilateral, segundo técnica descrita por Fossum (2002) e de acordo com localização do tumor. Pela possibilidade de acompanhamento de 10% dos animais, foi possível observar que eles apresentaram metástase local e pulmonar antes dos seis primeiros meses do pós-operatório, e ambos eram portadores de carcinoma ductal infiltrativo como diagnóstico histopatológico pré-operatório.

Oliveira Filho et al (2010), encontraram em seus estudos realizados em 1.647 cadelas portadoras de neoplasias mamárias, que os carcinomas são as neoplasias mamárias malignas mais prevalentes em cadelas (29,1% dos casos), seguido dos tumores mistos malignos (21,9%) e em relação as neoplasias benignas, 55,9% foram classificados como adenomas, enquanto que 40,2% eram tumores mistos benignos. Nesta pesquisa, 40% dos pacientes com neoplasias mamarias malignas eram portadores de carcinoma, enquanto que 70% dos pacientes portadores de neoplasias benignas apresentaram tumores mistos benignos.

| Histopatológico | 90 kDa | 99 kDa | 150 kDa |
|----------------------------|---------------|---------------|----------------|
| <i>Adenocarcinoma</i> | 1 (P) | 2 (M) | 2 (M) |
| <i>Carcinoma</i> | - | 3 (M) | 2 (M) |
| <i>Tumor misto maligno</i> | - | 1 (M) | 1 (M) |
| <i>Tumor misto benigno</i> | 2 (P) | 3 (M) | - |
| <i>Adenoma simples</i> | 1 (P) | 1 (M) | - |

Quadro 6. Correlação entre as expressões eletroforéticas, nível de expressão (M= medular /P = periférico) e os resultados dos exames histopatológicos.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram haver expressão sorológica das proteínas ligadas ao estresse celular tanto a nível medular quanto a nível periférico em cadelas portadoras de neoplasias mamárias, porém não se pode afirmar que as suas expressões extracelulares estejam ligadas unicamente à presença da neoplasia.

De acordo com a correlação entre as expressões eletroforéticas e os resultados histopatológicos, podemos concluir que a HSP tem sua expressão mais evidente frente a neoplasias mamárias malignas.

REFERÊNCIAS

- ADLER, A.J.; MARSH, G.S.; GUZZO, J.L. CD4+T cell tolerance to parenchymal self-antigens requires presentation by bone marrow-derived antigen-presenting cells. *Journal of Experimental Medicine*, v.187, n.10, pag.1555-1564, 1998.
- AKIRA, S.K.; KAISHO, T. The role of Toll-like receptors in innate immune responses. *Journal of endotoxin response*, v.6, n.5, pag. 383-387, 2000.
- AKIRA, S.K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *American Journal of Immunology*, v.2, n.8, pag. 675-680, 2001.
- BANCHEREAU, J. and STEINMAN, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, v.392, pag. 245-252, 1998.
- BASU S.; BINDER, R. J.; RAMALINGAM, T.et al. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity*, v.14, n.3, pag. 303-313, 2001.
- BECKER, T.; HARTL, F. U. and WIELAND, F. CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *Journal of Cellular Biology*, v.158, n.7, pag. 1277-1285, 2002.
- BUSH, B.M. *Interpretação de Resultados Laboratoriais para Clínicos de Pequenos Animais*. 1. ed. São Paulo: Roca, p. 100-148, 2004.
- CASTANIA, V.A. *Enxerto corticoesponjoso homogêneo processado quimicamente, esterelizado em óxido de etileno e embebido em medula óssea autógena*. 2007. 67f. Tese (doutorado em ortopedia, traumatologia e reabilitação) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
- CIOCCA, D.R.; CLARCK, GM. Heat shock protein HSP70 in patients with axillary lymph node negative breast cancer: prognostic implications. *Journal of the national cancer institute*. v. 85, p. 570-574, 1993.

- DELNESTE, Y.; MAGISTRELLI, J.; GAUCHAT, J.; HAEUW, J.; AUBRY, K. et al. Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity*, v.17 (3), pag. 353-362, 2002.
- FOSSUM, T.W. Cirurgia dos sistemas reprodutivo e genital In: Cirurgia de pequenos animais. 1.ed. São Paulo: Roca, p.596-601, 2002.
- GOORMAN, N.T.; DOBSON, J.M. The skin and associated tissues. In: WHITE, R.A. **S. Manual of small Animal Oncology**. Shurdington : British Small Animal, p. 187-200, 1995.
- GRINDEM C.B. Cytology of Bone Marrow. *Veterinary Clinic of Small Animals*, v.32, p. 1313-1374, 2002.
- HARVEY, J.W. Canine bone marrow: Normal hematopoiesis, biopsy techniques and cells identification and evaluation. *Comp. Ed. Pract. Vet.*, v.6, pag. 909, 2001.
- HEATH, W. R.; CARBONE, F. R. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nature Review of Immunology*, v.1, n.2, pag. 126-134, 2001.
- HIGHTOWER, L.E.; GUIDON, P.T. Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins. *Journal Cell. Physiol.* Vol. 138, pag. 257-266, 1989.
- JAIN, N.C. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: LEA & Febiger, 1993. p. 349-380.
- KELLER, R. Dendritic cells: their significance in health and disease. ***Immunol. Let.***, v.78, p.113-122, 2001.
- KERR, M.G. *Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária*. 2. ed. São Paulo: Roca, p. 61-80, 2003.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, Aug 15; 227(5259) : 680-5, 1970.
- LATIMER, K.S.; MEYER, D.J. Os leucócitos na Saúde e na Moléstia. In: ETTINGER, S.J. *Tratado de medicina Interna Veterinária*. 3. ed. São Paulo: Manole, v. 4, p. 2616-2664, 1992.
- LEE, G.R. et al. (Ed): *Wintrobe's clinical hematology*. 9 th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.
- LIU, F.F.; MILLER, N. The potential role of HSP 70 as an indicator of response to radiation and hyperthermia treatments for recurrent breast cancer. *International Journal of Hyperthermia*. v. 12, p. 197-208, 1996.
- MASSONE, F. *Anestesiologia Veterinária: Farmacologia e Técnicas*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 3ª ed. 225p. 1999.
- MATSUMOTO, M.; IKEDA, J.; HORI, O.; KUWABARA, K.; MAEDA, Y.; KITAGAWA, K.; YANAGI, H. and KAMADA, T. Purification and Characterization of a Novel Stress Protein, the 150-kDa Oxygen-regulated Protein (ORP150), from Cultured Rat Astrocytes and Its Expression in Ischemic Mouse Brain. *The Journal of Biological Chemistry*, v.271, pag. 5025-5032, 1996.
- MATZINGER, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annual Review of Immunology*, v.12, pag. 991-1045, 1994.

- MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P. and JANEWAY, C. A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, v.388, pag. 394-397, 1997.
- MILANI, V.; NOESSNER, E.; GHOSE, S.; KUPPNER, M.; AHRENS, B.; SCHARNER, A.; GASTPAR, R. and ISSELS, R. D. Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation. *International Journal of Hyperthermia*, v.18, n.6, pag. 563-575, 2002.
- NEFTI, O.; DAVID, J.C. Overexpression of alpha B crystallin in the gastrointestinal tract of the newborn piglet after hypoxia. *Lab. Press.*, v. 24, pag. 455-461, 2005.
- NYLANDSTED, J.; DANIELEWICS, A. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 200, n. 4, pag. 425-435, 2004.
- OLIVEIRA FILHO, J.C.; MAZUDA, E.K. e BARROS, C.S.L. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Rio de Janeiro, vol.30, n. 2. 2010.
- PALADINI, L.; CLARCK, O. et al. Agentes estimuladores de eritropoiese para anemia relacionada ao câncer. *Revista Prática Hospitalar*, São Paulo, v. 63, pag. 47-51, 2009.
- SOTI, C.; NAGY, E.; FERDINANDY, P. Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. *British Journal of Pharmacology*. v. 146, pag. 769-780, 2005.
- SOUZA, C.R.; SHER, A.; KAYE, P. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. ***Curr. Opin. Immunol.***, v.11, p.392-399, 1999.
- THRALL, M.A. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 1ª ed., Ed. Roca, p. 141-169, 2007.
- TYLER, R.D.; COWELL, R.L.; DENICOLA, D.B. *Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos*. Ed. Medvet, 3ed. pag. 423-451, 2009.
- TYTELL, M. Heat shock-like protein is transferred from glia to axon. *Brain Res*. v. 363, pag. 161-164, 1986.
- VARGAS, L.M.R.; TELLO, O.; et al. Heat shock protein expressions and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *International Journal of Cancer*, v. 79, pag. 468-475, 1998.
- WEI, Y.Q.; ZHAO, X.; KARIYA, Y. et al. Inhibitors of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat shock protein (HSP 70) expression in tumor cells. *Cancer Immunology and Immunotherapy*, v. 40, p. 73-78, 1995.
- WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. ***Small Animal Clinical Oncology***. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 4-16, 1996.

