



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

MUTAÇÃO E SUPEREXPRESSION DE p53 EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CADELAS

MARIA JULIANA COELHO DIAS DA SILVA TEIXEIRA

RECIFE
2007

Maria Juliana Coelho Dias da Silva Teixeira

MUTAÇÃO E SUPEREXPRESSÃO DE p53 EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CADELAS

Tese apresentada na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Área: Reprodução Animal

Orientadora: Profa. Aurea Wischral

**Recife
2007**

Ficha catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

T266a Teixeira, Maria Juliana Coelho Dias da Silva
Mutação e superexpressão de p53 em neoplasias
mamárias de cadelas/ Maria Juliana Coelho Dias da Silva
Teixeira. --2007.
86 f. : il.

Orientadora :  urea Wischral
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universida -
de Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medi -
cina Veterinária.

Inclui anexo e bibliografia

CDD 636.708.960.75

1. Tumores mamários
 2. Cadela
 3. Imunoistoquímica
 4. Molecular
- I. Wischral,  urea
II. Título

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**MUTAÇÃO E SUPEREXPRESSION DE p53 EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE
CADELAS**

Tese Doutorado elaborada por
Maria Juliana Coelho Dias da Silva Teixeira
Aprovada pela Banca Examinadora

Prof^ª Dr^ª Aurea Wischral
Orientadora

Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho
Co-orientador

Prof^ª Dr^ª Ana Paula Veras Sobral

Prof^ª Dr^ª Márcia Bezerra da Silva

Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali

Prof. Dr. Marcelo Jorge Cavalcante Sá

Dedicatória.....

Dedico esta conquista ao meu amado Marcelo Teixeira, pelos momentos de amadurecimento que juntos compartilhamos durante este trabalho e na nossa vida.

Aos meus filhos Wilson Neto e Marcella, sempre presente em dias difíceis, mas irradiando alegria.....

Homenagem especial.....

Wilson (*in memorian*) e Terezinha.
Àqueles de quem herdei meus genes
e a vida. Na vida, me transmitiram
ensinamentos e exemplo de pessoas
aguerridas.....

AGRADECIMENTOS

À Santíssima Trindade, que ilumina meus caminhos, me faz erguer a cabeça diante de cada obstáculo.

À Profa. Aurea Wischral, por ter depositado em mim a confiança, aceitado mais um desafio, mostrando dedicação, seriedade e cautela na orientação durante a realização deste trabalho;

Ao Prof. Manoel Adrião, por ter convidado a desenvolver o experimento no laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada (FAMA), compartilhando ensinamentos e orientação na Biologia Molecular;

Cíntia Valadares, amiga de todas as horas, seu entusiasmo e carinho com os animais, dedicação à nossa clínica e pensamento positivo com nossa pesquisa foram imprescindíveis para a execução desse trabalho;

A Paola Teles pela calorosa colaboração na leitura das lâminas da imunistoquímica;

Aos queridos colegas da Clínica Veterinária Harmonia: Amaro Fábio, Elayne Cristine, Fábio Pina, Thiago Henrique, Marco, Robertinha, Pâmela e Rita por manter o ritmo do trabalho durante a minha ausência;

Aos estagiários Raquel e Magno, que tanto se dedicam na rotina do internamento e com maestria regem os demais estagiários: Débora, Andresa, Marcela, Cecília....;

Aos irmãos, cunhados e sobrinhos, que sempre acreditaram em mim, cada um de vocês tem um significado neste trabalho;

A Crisinha que na etapa final colaborou com sua habilidade na língua inglesa, elaborando a versão do abstract;

A Marluce e Silvana, que por tantas vezes conduziram nosso lar e meus filhos;

Aos funcionários da Clínica Veterinária Harmonia;

Aos colegas da pós-graduação, Glenda, Edvaldo, Arthur, Geovana, Karen e os demais que seguiram experimentos em outras áreas, com os quais compartilhei momentos inesquecíveis de alegria e descontração;

Ao colega Vandilson, sempre prestativo, pontual com o agendamento de todas as cirurgias e liderança com seus residentes e estagiários;

Aos alunos e estagiários do laboratório FAMA por tanto DNA extraído. Madriano, discípulo de Manoel Adrião, parabéns pela sua dedicação e incontestável participação;

A Ana Paula Veras Sobral, a “FADA MADRINHA”, pela grande contribuição na imunistoquímica e pelas expressivas sugestões; seu toque mágico, seguindo a terminologia, expressou uma marcação intensa (+++) no trabalho e na nossa amizade;

A Márcia e Fernando Leandro, pelas sugestões, espaço e participação no laboratório de Patologia da Rural;

A Maria do Carmo Abreu e Lima e Geovanni Cassali pelo esclarecimento na leitura das lâminas para histopatologia;

Aos colegas Fred Maia e Waldemiro Júnior, pelos conselhos, dedicação e finalização dos resultados;

A Fernanda e Conceição por tantas lâminas montadas em HE e cortes para imunoistoquímica;

A Mauro e Bia pelo espaço concedido no laboratório do projeto Recife Costeiro, em Tamandaré, onde junto ao João, Dudu e Bárbara redigimos nossos trabalhos;

Ao Sr. Natal, pela avaliação estatística da tese;

À CAPES, pela bolsa concedida durante a realização do curso;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, por receber alunos e permitir a continuidade do nosso aprendizado.

LISTA DE QUADROS

| | Pg |
|--|----|
| Quadro 1 - Estadiamento clínico e patológico de tumores de acordo com o sistema TNM..... | 18 |

LISTA DE TABELAS – Experimento 1

| | Pg |
|---|----|
| Tabela 1 - Classificação, número (N) e frequência (%) em relação ao número total de amostras das variantes histológicas dos tumores malignos e o grau de malignidade..... | 42 |
| Tabela 2 - Expressão imunohistoquímica da proteína p53 por variante histológica dos casos do grupo 2..... | 47 |
| Tabela 3 - Associação entre grau de malignidade e intensidade..... | 48 |
| Tabela 4 - Número médio, desvio padrão (sd) e mediana de células marcadas e a frequência (%) dos tipos de tumor em mamas caninas..... | 50 |
| Tabela 5 - Principais estatísticas descritivas das células marcadas, segundo o grau de malignidade e resultados do teste de Kruskal–Wallis..... | 51 |
| Tabela 6 - Expressão imunohistoquímica da proteína p53 dos casos do grupo 3 | 52 |
| Tabela 7 - Número médio, desvio padrão (sd) e mediana de células marcadas em mamas contra laterais com a frequência (%) de metástase em cadelas com tumor de mama..... | 53 |
| Tabela 8 - Expressão imunohistoquímica da proteína p53 dos casos do grupo 4..... | 54 |
| Tabela 9 - Número médio, desvio padrão (sd) e mediana de células marcadas em linfonodos com a frequência (%) de metástase em cadelas com tumor de mama..... | 55 |

LISTA DE TABELAS – Experimento 2

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Padrão de bandas de nucleotídeos em pares de bases (pb) obtidos após PCR-RFLP para cada enzima de restrição em amostras de mamas de cadelas com e sem tumor..... | 69 |
|---|----|

LISTA DE FIGURAS – Experimento 1

| | Pg |
|---|----|
| Figura 1 - Variantes histológicas dos tumores malignos – A - Carcinoma sólido (HE, 100X); B – Carcinoma <i>in situ</i> (HE, 200X); C – Carcinoma tubular (HE, 200X); D – Carcinoma papilífero (HE, 100X); E – carcinoma em tumor misto (HE, 100X); F – Carcinosarcoma (HE, 100X)..... | 43 |
| Figura 2– Metástase loco regionais referentes aos tecidos mamários contra lateral e linfinodal - A – Carcinoma em tecido glandular mamário contra lateral (HE, 100X); B –Metástase em linfonodo inguinal (HE, 40X)..... | 44 |
| Figura 3– Imunomarcção positiva para proteína p53 – A – Em células neoplásicas de tumor mamário maligno (IHQ, p53, 200X); B - Em células neoplásicas de tumor mamário benigno (IHQ, p53, 200X)..... | 46 |
| Figura 4 Imunomarcção positiva para proteína p53 em células de tecido mamário sadio contra lateral (IHQ, p53, 200X)..... | 52 |
| Figura 5– A - Imunomarcção positiva para proteína p53 em células neoplásicas no linfonodo inguinal (IHQ, p53, 200X); B - Imunomarcção positiva para proteína p53 em linfonodo inguinal sem evidências morfológicas de metástase (IHQ, p53, 200X)..... | 54 |

LISTA DE FIGURAS – Experimento 2

| | Pg |
|--|----|
| Figura 1 – Resultado de PCR-RFLP para as enzimas BSoBI e SmaI, em mamas de cadelas normais (CN), mamas normais de cadelas com tumor (MN) e mamas com tumor (TM). M- Marcador de peso molecular.... | 73 |
| Figura 2 – Resultado de PCR-RFLP para as enzimas AluI e DdeI, em mamas de cadelas normais (CN), mamas normais de cadelas com tumor (MN) e mamas com tumor (TM). M- Marcador de peso molecular..... | 74 |

MUTAÇÃO E SUPEREXPRESSION DE p53 EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CADELAS

Maria Juliana Coelho Dias da Silva Teixeira

Orientador: Áurea Wischral

RESUMO –A incidência e o nível de mortalidade associada a diversidade dos fenótipos de câncer requerem estratégias para seu diagnóstico. Neste trabalho, objetivou-se avaliar a relação das mutações no gene Tp53 com o câncer de mama em cadelas, através da expressão imunoistoquímica da proteína p53 e do polimorfismo do gene nos tecidos mamários. No Experimento 1 foi verificada a expressão imunoistoquímica da proteína p53 associando-a ao aspecto morfológico de tecido glandular mamário sadio, a classificação e gradação dos tumores mamários e ao tecido linfonodal inguinal ipsilateral, (com ou sem metástase). Para isso foram utilizadas 19 mamas normais (Grupo 1 - controle), 29 amostras de mamas com diagnóstico clínico de tumor (Grupo 2), 29 mamas contra laterais (Grupo 3) e 29 linfonodos (Grupo 4). O material foi analisado por técnicas convencionais de microscopia (coloração HE) para caracterização dos tecidos e por imunoistoquímica (método da estreptavidina-biotina peroxidase) para avaliar a expressão da proteína p53 nos compartimentos celulares. As mamas do Grupo 2, pela análise histopatológica, apresentaram 65,52% de tumores malignos e 13,79% de tumores benignos. Foram observadas metástases em 6,9% das mamas contra laterais (Grupo 3) e em 31,03% dos linfonodos (Grupo 4). A marcação imunoistoquímica, para expressão de p53, não foi observada em tecidos de animais normais, mas foi evidente tanto em células de tumores malignos quanto benignos localizando-se no núcleo, no citoplasma ou em ambos compartimentos celulares. As mamas contra laterais e os linfonodos que apresentaram metástase também foram marcados, bem como tecidos que ainda apresentavam padrão de normalidade. Não houve diferenças estatísticas entre a intensidade da marcação e do número de células marcadas com o grau de malignidade. No Experimento 2, o objetivo foi detectar mutações em seqüências do exon 8 do gene Tp53 através da técnica PCR-RFLP com enzimas específicas de restrição para associar o padrão de bandas obtidas ao tipo de tumor de mama ou tecido de glândula mamária normal de cadelas. Foram utilizadas 19 cadelas sadias (controle) e 50 cadelas submetidas à retirada de tumor das quais foram obtidas amostras dos tecidos tumorais e de glândulas mamárias sadias contra laterais. A extração de DNA foi realizada pela técnica de fenol-clorofórmio e a PCR-RFLP foi utilizada para amplificação e digestão do exon 8 do Tp53 com 6 endonucleases de restrição, SmaI, DdeI, Rsa, AvaI, BsoBI e AluI. O DNA amplificado apresentou uma única banda de 200 pb no gel de agarose 0,8%. O produto de PCR apresentou em média 94% de homologia com a seqüência conhecida do gene (GeneBank –AAB42022.1). Das 6 enzimas selecionadas, apenas 4 apresentaram polimorfismo (AluI, BsoBI, DdeI e SmaI) na seqüência do exón 8 do tumor quanto ao número dos pares de base nucleotídeos (pb) ou quantidade de clivagens. O padrão das bandas de cada enzima apresentou polimorfismo entre os grupos diferentes, mas não dentro do seu grupo (cadelas normais, glândulas mamárias com tumor e mama contra lateral ao tumor). Não houve diferença entre os tecidos de mamas com tumor e as contra laterais do mesmo animal, para as enzimas AluI, BsoBI e SmaI, reforçando a idéia de que os tecidos que ainda não apresentam alteração visível, já se encontram alterados no nível molecular e portanto são potencialmente capazes de desenvolver tumores ao longo do tempo. Conclui-se que o gene Tp53 está fortemente envolvido na etiologia das neoplasias de mamas em cadelas, podendo ser utilizado como parâmetro para analisar o comportamento destes tumores. A análise da expressão da proteína p53 associada a

marcadores genéticos que identificam mutações na seqüência do gene, pode propiciar o diagnóstico precoce da patologia, permitindo o tratamento em tempo de evitar metástases.

Palavras-chave: neoplasia, glândula mamária, p53, cadela, PCR-RFLP.

Mutation and over expression of p53 in mammary neoplasia in canine females
Maria Juliana Coelho Dias da Silva Teixeira

ABSTRACT: The major incidence and the high level of mortality associated to the huge diversity of the cancer phenotypic require numerous strategies for its diagnosis. In this research, the aim was to evaluate the mutation relation in the gene Tp53 with the breast cancer in female dogs, through the immunohistochemistry expression of the protein p53 and of the gene polymorphism in the breast tissues. In the Experiment 1, was studied the immunohistochemistry expression of the protein p53 in relationship to the morphologic aspects of healthy mammary tissues, to classification and grade of tumors and to the ipsilateral inguinal lymph-nodes tissue, metastatic or not. For this purpose 19 breasts from healthy female dogs were used (Group 1- control), 29 samples of breasts with clinical diagnosis of tumor (Group 2), 29 contralateral breasts (Group 3) and 29 lymph-nodes (Group 4). The material was analyzed by conventional techniques of microscopy (staining HE) for tissue's characterization and by immunohistochemistry (estreptavidina-biotina peroxidase method) to evaluate the expression of the protein p53 in the cellular compartment. The contralateral breasts and the lymph-nodes that showed metastasis were also marked, as well as the tissues that still showed normality. There weren't statistical differences between the staining intensity and the number of cells stained with malignity grade. In the Experiment 2 the aim was to detect mutations in sequences of the exon 8 of the gene Tp53 through the PCR-RFLP technique with specific restriction enzymes to associate with band patterns obtained to the breast tumor type or normal tissues in female dogs. Were used 19 healthy female dogs (control) and 50 female dogs submitted to the tumor exeresis from wich samples of tumor tissue and of healthy contralateral mammary glands were obtained. The DNA extraction was done through the fenol-cloroformic method and the PCR-RFLP technique was used for amplification and digestion of the exon 8 of the Tp53 with 6 restriction endonucleases, SmaI, DdeI, Rsa, AvaI, BsoBI e AluI. The amplified DNA showed only one side of 200 pb in the agarose gel (0,8%). The PCR product showed on average 94% of homology with the known sequence of the gene (GeneBank –AAB42022.1). Among the 6 chosen enzymes, only 4 showed polymorphism (AluI, BsoBI, DdeI e SmaI) in the tumor sequence of the exon 8 as to the numbers of pairs of the base (pb) or the quantity of cleavages. The band patterns of each enzyme showed polymorphism among the different groups, but not inside each group (normal female dogs, tumor mammary glands and contralateral breasts). There was'nt any difference among the breast tissues with tumor and the opposite laterals of the same animal, for the enzymes AluI, BsoBI e SmaI, reinforcing the idea that the tissues that didn't showed visible alterations were already changed at the molecular level and therefore were potentially capable of developing tumors over the time. It is concluded that the gene Tp53 is strongly involved in the breast cancer etiology, and it could be used as a parameter to analyse these tumors' behavior. The analysis of the protein p53 expression associated to the genetic markers that identify the mutations in the gene sequence could propitiate the early diagnosis of this pathology, allowing the treatment in time of avoiding metastasis and risks of the animal's survival.

Key Words: mammary cancer, canine, metastasis, p53, PCR-RFLP

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| | LISTA DE QUADROS..... | Vi |
| | LISTA DE TABELAS..... | vi |
| | LISTA DE FIGURAS..... | vii |
| | RESUMO..... | viii |
| | ABSTRACT..... | ix |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 11 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 12 |
| | 2.1 Glândula mamária..... | 12 |
| | 2.2 Tumores mamários..... | 15 |
| | 2.3 Gene p53 (Tp53)..... | 21 |
| | 2.4 Referências bibliográficas..... | 26 |
| 3 | EXPERIMENTO 1..... | 34 |
| | EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA p53 EM TECIDO GLANDULAR MAMÁRIO SADIO, TUMORAL E METASTÁTICO DE CADELAS | |
| 4 | EXPERIMENTO 2..... | 60 |
| | APLICAÇÃO DA TÉCNICA DA PCR-RFLP NO POLIMORFISMO DO GENE p53 PARA DIAGNÓSTICO PRECOCE DE TUMORES MAMÁRIOS EM CADELAS | |
| 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 79 |
| 6 | ANEXOS..... | 81 |

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias, particularmente na espécie canina, são especialmente úteis para fundamentos de pesquisas científicas. O conhecimento adquirido do carcinoma mamário canino pode fornecer um melhor modelo comparativo para estudos do câncer de mama humano, já que a prevalência de tumores das glândulas mamárias em cães supera em até 3 vezes a das mulheres, além da similaridade histológica entre o carcinoma ductal invasivo da mulher e adenocarcinoma mamário da cadela. Ocorre, ainda, similaridade das características epidemiológicas, como faixa etária de aparecimento, clínica, comportamento biológico, identificadas através do efeito protetor após a ovariectomia, a presença de receptores de estrógeno e progesterona, os órgãos alvo de metástase, além da influência genética (STRANDBERG e GOODMAN, 1974; CAVALCANTE, 1977; NETO, 1992; YORIKO et al., 2000).

A grande incidência e o elevado nível de mortalidade, associados à enorme diversidade dos fenótipos de câncer, requerem numerosas estratégias para seu diagnóstico. A biologia molecular tem contribuído significativamente para o entendimento da etiologia das doenças. As técnicas de recombinação dos ácidos nucléicos têm permitido aos pesquisadores identificar vários genes responsáveis por doenças hereditárias, detectar agentes infecciosos em materiais biológicos, conhecer os processos que regulam a diferenciação e proliferação celular (principalmente nas neoplasias), entre outros (OLIVEIRA, 2005).

Estudos prévios demonstraram a alta incidência de mutações nos exons 4 a 8 do gene p53 (Tp53), visualizadas através da análise das seqüências de nucleotídeos obtidas pela amplificação com oligonucleotídeos específicos (SOUZA, 2006). Isto encaminha para estudos mais avançados, buscando metodologias que sejam mais aplicadas a um

diagnóstico precoce e confiável da patologia. O polimorfismo do gene mutado, que poderá ser visualizado pela técnica PCR-RFLP, será um avanço neste sentido.

Técnicas de imunistoquímica para estudo de receptores de estrógeno, progesterona, fator de crescimento epidérmico, oncogenes, entre outros, são de grande valor para adquirir um prognóstico mais preciso em neoplasia mamária (CASSALI, 2000).

Na espécie canina, são necessários mais estudos, em nível molecular, que determinem métodos diagnósticos mais precoces e eficazes, que possam contribuir com a análise clínica dos animais doentes, e com isto aumentar as informações prognósticas, tratamento e sobrevida dos pacientes.

Neste trabalho, objetivou-se avaliar mutações no gene Tp53 nas neoplasias de mama em cadelas, através do polimorfismo do gene e a expressão da proteína p53 utilizando a técnica de imunistoquímica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Glândula Mamária

As glândulas mamárias estão presentes, sob a forma de linhas mamárias sub-epidermais, já nas fases mais precoces do embrião e, em animais do sexo feminino, crescem durante o desenvolvimento fetal, formando um sistema de ductos rodeados pelo tecido conjuntivo e adiposo. Após o nascimento, a massa glandular mamária aumenta em decorrência das mudanças hormonais que ocorrem durante a puberdade, consecutivos ciclos estrais e gestação (ZUCCARI et al., 2001a).

As glândulas mamárias são 5 pares de glândulas sudoríparas modificadas, consideradas órgãos especializados da pele (CASSALI, 2003). O mesênquima dérmico, que envolve os condutos, se diferencia em tecido conjuntivo frouxo, que circunda os

condutos e suas ramificações, e em tecido conjuntivo denso, que forma os tabiques entre os primórdios de conduto e divide a glândula em lobos (KOLB, 1984; HENSON, 2003).

O desenvolvimento da glândula mamária na vida pós-fetal sofre modificações aparentes a partir do primeiro ciclo estral pela influência do estrógeno que promove o desenvolvimento do sistema ductal e discreto aumento das células adiposas, observando-se um aumento discreto no volume da glândula, o que acontece, sobretudo, nas mamas abdominais caudais e inguinais. O desenvolvimento de alvéolos a partir das extremidades terminais dos ductos requer o aumento de progesterona e prolactina na metade da gestação ou pseudogestação, quando atingem sua maturação morfológica e atividade funcional completa (ZUCCARI et al., 2001b; CASSALI, 2003; OLIVEIRA et al., 2003).

As mamas apresentam dois tipos celulares em sua estrutura: as células epiteliais luminais, que sintetizam e excretam proteínas lácteas e lipídios durante a lactação, e as células epiteliais basais ou mioepiteliais, que se contraem, sob a influência de ocitocina, expelindo o leite dos ductos. Ambos os tipos celulares são derivados de uma única população celular ou células tronco. Além do tecido epitelial, ainda há a presença de fibroblastos e células adiposas que compõem e fazem à sustentação do tecido mamário. O tecido subcutâneo da parede ventral do abdome contém as mamas torácicas, abdominais e inguinais e os vasos e nervos que as suprem (HOWARD e DELAHUNTA, 2001).

Na fêmea canina, os vasos epigástricos craniais superficiais são vistos subcutaneamente, junto à papila mamária abdominal cranial. A artéria epigástrica superficial caudal segue cranialmente a superfície profunda da mama inguinal e fornece os ramos mamários. A artéria prossegue para suprir a mama abdominal caudal e fazer anastomose com ramos da artéria epigástrica superficial cranial. Os linfonodos inguinais

superficiais ficam adjacentes aos vasos epigástricos superficiais caudais e craniais, drenando as mamas e a parede ventral do abdome, cranialmente até o umbigo (HOWARD e DELAHUNTA, 2001).

A linfa das glândulas mamárias torácicas (cranial e caudal) usualmente é drenada para o linfonodo axilar ipsilateral e raramente para os linfonodos axilares e esternal simultaneamente. O terceiro par de glândulas neoplásicas é drenado para linfonodos axilares e inguinais superficiais simultaneamente, mas algumas vezes migram apenas para os linfonodos axilares. O quarto par abdominal caudal, em geral, é drenado apenas para o linfonodo inguinal ipsilateral e raramente para os linfonodos axilares simultaneamente. O quinto par, glândulas inguinais, também é drenado para os linfonodos inguinais, e raramente drenam para o linfonodo poplíteo ipsilateral e plexo linfático. Conexões linfáticas entre a glândula neoplásica e glândula adjacente sem alterações foram demonstradas em apenas um caso (PATSIKAS et al., 2006).

A ocorrência das neoplasias das glândulas mamárias como nódulos de formas múltiplas do mesmo ou de diferentes tipos, em uma ou mais glândulas, pode ser devida à existência de conexões linfáticas variáveis entre as glândulas adjacentes lateral, cranial ou caudal (MORRISON, 1998).

A formação vascular da região mamária é de extrema importância no estudo dos tumores mamários, pela relação direta entre seus componentes e o prognóstico da lesão (BANKS, 1992; ZUCCARI et al., 2001b). No entanto, os tumores mamários malignos apresentam maior vascularização em relação aos tumores benignos, apresentando uma proliferação vascular maior em animais com média de 9 anos, em relação aos animais mais jovens (CASSALI, 2000).

2.2 Tumores Mamários

As neoplasias de mama dos canídeos apresentam várias características epidemiológicas, clínicas e biológicas semelhantes às da espécie humana, e por isso vêm sendo utilizadas como modelo experimental para o conhecimento dos vários aspectos da carcinogênese mamária no homem (NERUKAR et al., 1989; CASSALI, 2000; O'BRIEN, 2000), com maior vantagem quando comparado com experimentos realizados com animais de laboratório, em virtude da elevada consangüinidade e da diferença anátomo-patológica com os tumores humanos (NERUKAR et al., 1989; ZUCCARI et al., 2001b).

As neoplasias da mama canina se originam de células de revestimento epitelial, ductal ou alveolar, de células mioepiteliais periféricas e do tecido conectivo intersticial (CARRUIDO et al., 2003). As que se originam de células epiteliais são denominadas de carcinomas e aquelas com origem no tecido conjuntivo ou muscular são denominadas sarcomas (ALBERTS et al., 1997).

Estudos realizados para caracterizar os tipos e freqüência dos tumores de mama em cadelas têm demonstrado que há alta incidência de tumores malignos (cerca de 50%) e, destes, a maioria são de tumores mistos (36,25%), seguidos por carcinomas (25%) (CASSALI, 2000).

As neoplasias mamárias são afecções quase exclusivas das fêmeas, acometendo raramente os machos. Na cadela, as neoplasias de mama representam as lesões mais freqüentes praticamente em todas as partes do mundo (MOULTON, 1990). Uma em cada quatro cadelas com neoplasia mamária está sujeita a desenvolver novos nódulos em outras mamas, já que os fatores predisponentes ao câncer de mama estão presentes (INCA, 1998; STONE, 1998).

O fator de risco mais freqüente, que está associado com o desenvolvimento dos tumores de glândula mamária em cadelas, é a influência hormonal. A idade da ovariectomia tem influência no desenvolvimento da neoplasia, estando aquelas cadelas castradas mais jovens com o risco menor, visto que as cadelas submetidas à castração antes do primeiro cio apresentam 0,05% de probabilidade em desenvolver neoplasias mamárias. Este risco aumenta para 8% nas cadelas castradas após o primeiro cio. Outros fatores de risco ligados ao desenvolvimento de tumores mamários em cães incluem obesidade e o consumo de carne vermelha (SCHINAIDER et al., 1969; PEREZ ALENZA et al., 1998).

As sucessivas divisões celulares podem desencadear mutações genéticas que são debeladas através de artifícios utilizados pelas células. O controle dessas mutações se dá por meio de sistemas de reparo do DNA, através de genes que se tornam ativos no momento da falha, regulando a proliferação celular. Em algumas situações, estes genes passam a não desempenhar o papel de controle do crescimento celular, ocasionando o desenvolvimento desordenado de células cancerígenas, sobrevivendo um tumor maligno (KRAEGEL et al., 1995; VAN LEEUWEN et al., 1996; FARAH, 2000; YORIKO et al., 2000; LERA et al., 1997).

O reconhecimento de que os cânceres representam uma forma de doença genética, a investigação dos mecanismos da iniciação e desenvolvimento tumoral e a utilização de técnicas de biologia molecular, possibilitaram a identificação de marcadores tumorais novos. Isto aumenta a capacidade de se detectar células cancerosas em uma etapa mais precoce da doença e conduz ao sucesso final de terapias do câncer, muitas das quais se tornarão efetivas se instituídas na etapa correta do desenvolvimento tumoral, como antes da formação de metástase (WALKER e RAPLEY, 1999; DOBSON, 2001).

Os principais alvos da alteração genética são os proto-oncogenes, os genes supressores tumorais e os genes que controlam a morte celular programada ou apoptose (DELFINO et al., 1997). Acredita-se que os genes reparadores do DNA também possuam papel de destaque na carcinogênese, pois qualquer anormalidade nesses genes predisporia a mutação no genoma com subsequente transformação neoplásica (LOURO, 2000; COTRAN et al., 2000).

Desta forma, a importância do estudo do gene p53 faz alusão à sua função de supressor de tumores, conduzindo ao diagnóstico precoce e identificação de terapias adequadas, favorecendo a um bom prognóstico nos casos das neoplasias mamárias.

O diagnóstico da neoplasia mamária compreende: a avaliação clínica, para o entendimento do comportamento biológico do câncer, oferecendo informações de diagnóstico, prognóstico e terapêutica; o estadiamento clínico, que classifica o grau de aparente extensão da doença; os exames complementares, como hemograma, bioquímica sérica, radiografia torácica e ultra-sonografia e, por fim, a avaliação citológica/histológica da glândula mamária acometida (NOVASAD, 2003; CAVALCANTI e CASSALI, 2006).

Todo aumento isolado da glândula mamária deve ser avaliado e considerado como possível presença de neoplasia. Os casos onde houver aumento de volume generalizado e que não tenham históricos relacionados à pseudociese, lactação ou mastite devem receber atenção redobrada (ZUCCARI et al., 2001b).

A análise histopatológica de um tumor é essencial para obter informação consistente sobre o prognóstico do câncer mamário, e deveria ser considerado como um passo básico para a orientação terapêutica destas lesões (SCHMITT, 2000). Com o resultado da análise histológica dos tumores obtém-se a seguinte classificação, segundo Cavalcanti e Cassali (2006): 1) Tumores Benignos: adenoma, fibroadenoma, tumor

misto benigno, papiloma ductal, tumores não classificáveis, hiperplasia e displasias mamárias. 2) Tumores Malignos: carcinoma não infiltrativo (in situ), tipos especiais de carcinomas, sarcomas e carcinossarcomas.

As classificações utilizadas para o estadiamento clínico e patológico do câncer são as: TNM clínica (TNMc) e a TNM histopatológica (TNMp) (INCA, 1998; EISENBERG e KOIFMAN, 2000). O sistema TNM (Quadro 1) refere-se à dimensão do tumor (T), a avaliação da extensão aos linfonodos (N) e por fim a presença ou não de metástase à distância (M) (OWEN, 1980; INCA, 1998). Para o sistema TNMp é utilizada a classificação preconizada por Elston e Ellis (1991).

Quadro 1- Estadiamento clínico e patológico de tumores de acordo com o sistema TNM

| TAMANHO DO TUMOR PRIMÁRIO (T) | LINFONODOS REGIONAIS (N) |
|--|---|
| T0 - Tumor não detectável | N0 - Sem evidência de linf. regional – axilares/inguinais. |
| T1 - Tumor < 3cm – a: não fixo, b: fixo a pele, fixo ao músculo | N1 - Linfonodo ipsilateral envolvido - a: não fixo, b: fixo |
| T2 - Tumor de 3 a 5cm - a: não fixo, b: fixo a pele, fixo ao músculo | N2 - linfonodos bilaterais envolvidos - a: não fixo, b: fixo |
| T3 - Tumor > 5cm - a: não fixo, b: fixo a pele, fixo ao músculo | METÁSTASE À DISTÂNCIA (M) |
| T4 - Tumor de qualquer tamanho (carcinoma inflamatório) | M0 - Sem evidência de metástase distante M1 - Metástase distante incluindo linf. não regionais |

Fonte: CAVALCANTI e CASSALI, 2006.

O sistema TNM classifica as neoplasias mamárias em 4 estágios: Estágio I: Tumores pequenos e localizados; Estágio II: Tumores maiores, embora discretos, com metástase regional limitada ou ausente; Estágio III: Invasão do tumor nas estruturas adjacentes ou metástase regional extensa; Estágio IV: Indica metástases distantes (INCA, 1998).

O grau de malignidade é uma abordagem essencial, sendo recomendado o uso do grau histológico combinado ou final de Nottingham (modificado do sistema de graduação de Scarff-Bloom-Richardson), que leva em conta a formação tubular, o pleomorfismo nuclear e o índice mitótico (ELSTON e ELLIS, 1991; ABREU-E-LIMA, 2005).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem usado estas características para desenvolver um sistema de representação clínica para as neoplasias, que permite estabelecer um prognóstico e planejar um tratamento; dar indicações precisas aos técnicos em anatomia patológica sobre o material enviado, assim como comparar as observações vindas de diferentes fontes. A graduação de um câncer baseia-se no grau de diferenciação das células tumorais e no número de mitoses presentes dentro do tumor como características da agressividade da neoplasia (CASSALI, 2003).

Assim como nas neoplasias mamárias da espécie humana, o diagnóstico precoce e a rápida eleição terapêutica são necessários para prevenir que haja metástase local ou à distância em cadelas. As opções de tratamento dependem do estágio do tumor e podem incluir cirurgia, terapia por radiação, quimioterapia ou a combinação de um ou mais tratamentos. Com as melhorias nos exames clínicos e complementares refletindo no diagnóstico precoce e o maior conhecimento de terapias agressivas, tem se obtido cada vez mais sucesso no tratamento dos tumores mamários (NOVOSAD, 2003).

A remoção cirúrgica é a opção de tratamento largamente indicada para tumores da glândula mamária. Os procedimentos cirúrgicos variam desde a excisão local até a

excisão radical de toda a cadeia afetada. Um estudo amplo comparando mastectomia simples com radical tem mostrado que não há diferença para a ocorrência de recidivas ou o tempo de sobrevivência, uma vez que seja removido todo tecido afetado com margens cirúrgicas livres de neoplasia (MACEWAN et al., 1985).

O benefício da quimioterapia no tratamento dos tumores da glândula mamária em cadelas e gatas não está bem documentado. O uso da doxirrubicina em pacientes humanos com resposta negativa ao tratamento hormonal e que apresentam sintomas avançados da doença, tais como invasão linfática ou vascular e metástase em linfonodos, apresentou resultados favoráveis. Esta droga tem sido empregada em modelos *in vitro* e tem-se mostrado eficaz contra células de linhagem tumoral de glândula mamária canina (SARTIN et al., 1993).

Por outro lado, o emprego da radioterapia não tem apresentado aplicabilidade satisfatória. Sabe-se, no entanto, que em humanos a terapia por radiação é usada para ajudar no controle local da afecção, nos casos onde não houve completa remoção do tumor, em que a remoção não é possível ou nos carcinomas mamários inflamatórios (NOVOSAD, 2003).

O uso de anti-estrógenos, como o Tamoxifeno, tem sido documentado em um pequeno número de casos clínicos, com alguns resultados conflitantes. O uso do Tamoxifen em doses que variaram de 2,5 a 10mg (via oral, duas vezes por dia) deu resposta positiva em 5 de 7 cães, contudo, em outro estudo com tratamento em dose similar, nenhuma resposta foi notada (MORRIS et al., 1993).

Vários fatores que afetam o prognóstico têm sido descritos para tumores de glândula mamária em cadelas, dentre eles o tamanho do tumor, envolvimento do linfonodo, grau histológico e a presença de receptores de estrógeno e progesterona, que mostram ser os mais significativos, dentre outros (KURZMAN e GILBERTSON,

1986). Conforme a União Internacional contra o Câncer (INCA, 1998) a taxa de sobrevivência de mulheres acometidas é maior nos casos em que a doença encontra-se localizada, quando comparada aquelas em que a doença se estendeu além do órgão de origem.

Queiroga e Lopes (2002) relataram que grandes massas tumorais determinam menor tempo de vida global dos animais. Esses resultados foram similares aos descritos por Fossum (1997) que afirmou que cadelas com tumor maior ou igual a 3cm (T₂ e T₃) têm um prognóstico pior quando comparada s àquelas com tumores menores que 3cm (T₁), chegando a 80% de recorrência em 2 anos após a extirpação cirúrgica.

2.3 Gene p53 (Tp53)

Atualmente, na espécie humana e em animais domésticos, principalmente nos caninos, tem-se estudado o gene p53 (Tp53), considerado como o gene guardião do ciclo celular (VAN LEEUWEN et al. 1996; SETOGUCHI et al., 2001). Localizado no braço curto do cromossomo 17, é um gene supressor de tumor, devido à sua função reguladora da proliferação celular. Presente nas células normais na forma “wild” ou não mutante, tem função de bloquear a divisão celular, através de uma proteína por ele produzida, atuando como mediador da apoptose, quando da ocorrência de alterações no genoma (KRAEGEL, et al. 1995; SETOGUCHI et al., 2001).

Nas pesquisas com cânceres na espécie humana, observou-se que mutações do Tp53 estão presentes em mais formas diferentes de câncer que qualquer outra alteração genética, aproximadamente 50% de todos os cânceres (YORIKO et al., 2000; KREUZER e MASSEY, 2002).

A maioria das mutações no Tp53 tem sido detectada nos exóns 5-8, fazendo com que as pesquisas enfoquem os experimentos nestas regiões (VAN LEEUWEN et al.,

1996; MAYR et al., 2000). Estudos prévios demonstraram a alta incidência de mutações nos exóns 4 a 8 do Tp53, visualizadas através da análise das seqüências de nucleotídeos obtidas pela amplificação com oligonucleotídeos específicos (SOUZA, 2006).

Mayr et al. (2000) investigaram a região do exón 1 do Tp53 em diferentes espécies, dentre eles caninos, felinos, eqüinos e bovinos, que demonstraram alta similaridade em comparação com a seqüência do DNA de humanos e roedores. Porém, nenhum dos tumores analisados demonstrou mutação nesta região nas espécies investigadas.

Um grande aumento da quantidade da proteína p53 foi observado em muitas células transformadas ou em linhagens derivadas de tumores. As mutações em Tp53 acumulam-se em muitos tipos de cânceres, provavelmente porque a perda da atividade de p53 confere uma vantagem multiplicativa às células (MUTO et al., 2000; LEWIN, 2001). A diversidade dos cânceres sugere que a p53 não está envolvida em um evento tecido-específico, mas sim em algum controle geral e bastante comum da proliferação celular; e a perda deste controle pode ser um evento secundário que ocorre para contribuir com a multiplicação celular em muitos tumores. As células com p53 mutante também possuem uma maior propensão a amplificar DNA, o que provavelmente reflete a função da p53 na instabilidade característica do genoma que é encontrada em células cancerosas (LEWIN, 2001).

A proteína p53 também tem sido estudada por técnicas imunoistoquímicas em diferentes tipos de tumores.

A relação entre o grau de malignidade histológica e a marcação da proteína p53 foi avaliada em 40 amostras de carcinoma de células escamosas orais e foi observado, na avaliação imunoistoquímica, que a marcação da p53 apareceu em 62,5% dos carcinomas estudados. A positividade do padrão de p53 mostrou, ainda, uma correlação

do grau de malignidade histológica com o grau de queratinização, polimorfismo nuclear e número de mitoses, sendo encontrada apenas em células epiteliais. Em geral, nos carcinomas bem diferenciados com formação de pérolas de queratina, p53 foi encontrada apenas nas células periféricas de massas neoplásica. Porém, o mesmo padrão de marcação foi constantemente observado nos casos pouco diferenciados (ARAÚJO et al., 1997).

Schafer et al. (1998) realizaram a avaliação da imunistoquímica de tumores mamários em cadelas Beagle e revelaram não haver diferença na marcação de p185^{erbB-2} ou p53, sendo que expressão nuclear de p53 ocorreu apenas em carcinomas sólidos.

Cianga et al. (2005) buscaram identificar a expressão da proteína bcl-2 em 55 carcinomas primários de mama e em 30 metástases de linfonodo axilar correspondentes, usando como fatores prognósticos: receptores de estrógeno (ER) e progesterona (PR) e a proteína p53. Foi demonstrada a correlação ($p < 0.05$) entre bcl-2 e a expressão de receptores hormonais em tumores, mas não em metástase axilar ($p < 0.1$). Houve uma correlação inversa ($p < 0.02$) entre bcl-2 e p53 em tumores primários, mas uma correlação direta em metástases axilares. O fenótipo bcl-2 / p53, associado com epitélio de mama normal, esteve presente em 79,17% dos tumores primários, mas apenas em 15,38% dos linfonodos axilares com metástase. Um grande número de linfonodos com metástase expressou a bcl-2 e p53 de forma mais expressiva comparada com tumores primários (58,82% e 48,39% respectivamente); isto mostra que mudanças na expressão de bcl-2, p53, ER e PR podem refletir a uma agressividade celular aumentada e um comportamento invasivo e, por conseguinte, maior potencial para metástase.

Um estudo foi realizado em mulheres e cadelas com tumores de glândula mamária objetivando avaliar, através da imunistoquímica, a expressão da proliferação nuclear com antígenos PCNA, Bcl-2, p53, citoqueratina e ER em tumores primários e

nos tecidos adjacentes. Tanto em mulheres quanto em cadelas, foi observada maior expressão de PCNA, Bcl-2, p53 e ER do que de citoqueratina, demonstrando a similaridade no comportamento destes marcadores, e validando o uso de cadelas como modelo para compreensão do mecanismo molecular da carcinogênese mamária humana (KUMARAGURUPARAN et al., 2006).

Likaki-Karatza et al. (2006) correlacionaram as imagens de mamografia de mulheres com os achados da imunohistoquímica, usando anticorpos para receptores de estrógeno (ER), receptores de progesterona (PR), HER-2/neu, p53 e catepsina D. Observaram, no carcinoma de alto grau, assimetria na densidade da mama com pobre definição das margens e sem microcalcificações, sendo estes os achados mais encontrados na mamografia (aproximadamente em 82% dos casos). Foi encontrada marcação imunohistoquímica positiva para os anticorpos HER-2 e p53 em 68,7% e 48,2% respectivamente, havendo correlação com os achados da mamografia em carcinomas mamários de alto grau.

Balogh et al. (2006) analisaram as alterações genéticas na expressão ontogênica de p53 em 55 pacientes com câncer de mama em diferentes estágios e 8 mulheres normais. O exame sorológico para o anticorpo de p53 normal e mutada só resultou positivo nas mulheres com carcinoma mamário (16,30% normal e 52,72% mutada), tendo sido negativo em mulheres normais ou com doenças benignas. A avaliação imunohistoquímica de p53 foi positiva em 52,73% no carcinoma mamário e 0% na doença benigna da mama, mostrando haver boa correlação entre a proteína p53 mutada, detectada no soro e marcada pela imunohistoquímica.

Com o objetivo de determinar a mutação de p53, foi induzido quimicamente, em ratos albinos, papiloma de pele e adenoma tubular mamário. Através da imunohistoquímica, todos os papilomas mostraram fraca reatividade para

imunomarcção de p53, enquanto que o adenoma tubular não apresentou reatividade. Os estudos concluíram que p53 pode ser um marcador para lesões pré-malignas e ajuda na seleção de pacientes constantemente monitorados (BUKHARI et al., 2006).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU-e-LIMA, M.C.C. et al. Lesões benignas não neoplásicas e neoplasias da mama.

BACCHI, C.E. et al. (eds) **Manual de padronização de laudos histopatológicos.**

Sociedade Brasileira de Patologia. 3 ed., São Paulo: Reichmann & Autores Editores, 2005. p. 245-281

ALBERTS, B. et al. A mecânica da divisão celular. In: **Biologia molecular da célula.**

São Paulo: Artes Médicas Sul, 1997. cap. 18, p. 911 – 946.

ARAÚJO, V. C. et al. p53 in Biopsies of Oral Squamous Cell Carcinoma. A

Comparative Study with a Malignancy Grading System. **Oral Oncology**, New York, v.

33, n.1, p 5-9, 1997.

BALOGH, G. A. et al. Mutant p53 protein in serum could be used as a molecular

marker in human breast cancer. **International Journal of Oncology**, Athens, v.28, n. 4, p. 995-1002, 2006.

BANKS, W. J. Sistema tegumentar. In: **BANKS Histologia veterinária aplicada.** São

Paulo: Manole, 1992, cap. 20, p. 391-424.

BUKHARI, M. H. et al. Mutation of p53 in Skin Papilloma and Tubular Breast

Adenoma of Albino Mice. **Journal of the College of Physicians and Surgeons**,

Pakistan, v. 16, n. 4, p. 280-3, 2006.

CARRUIDO, A. C. C. et al. Incidencia de las neoplasias de glándula mamaria en

caninos diagnosticadas por histopatología en el hospital veterinario "Dr. Humberto Ramírez Daza" desde 1983 hasta 2003. **Disponível em**

<http://www.monografias.com/trabajos15/tumores-caninos/tumores-caninos.shtml>,

2003. Acesso em: 12/01/2006.

CASSALI, G. D. Estudos morfológicos, imuno-histoquímico e citométrico de tumores da cadela – Aspectos comparativos com neoplasias da mama humana. Belo Horizonte, 2000. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Minas Gerais.

CASSALI, G. D. Patologia da glândula mamária. In: NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap. 12, p. 119-133.

CAVALCANTE, M.I. **Oncologia comparativa entre caninos e humanos, na cidade do Recife, Brasil**. Recife, 1977. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco.

CAVALCANTI, M. F., CASSALI, G. D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas-revisão. **Clínica veterinária**, São Paulo, n.61, p. 56-64, 2006.

CIANGA, C. et al. Different phenotypes generated by changes in bcl-2 and p53 expression in breast cancer. **Revista de Medici si Naturalisti din Iasi**, Iasi, v.109, n. 4, p. 831-5, 2005.

COTRAN, R.S. et al. **Patologia estrutural e funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1400p.

DELFINO, A.B. et al. O envolvimento de genes e proteínas na regulação da apoptose – carcinogênese. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v.43, n.3, p.173-186, 1997.

DOBSON, J. M. Princípios da terapia do câncer. In: DUNN, J. K. **Tratado de Medicina de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 2001. cap. 50, p. 979-1022.

EISENBERG, A.L.A., KOIFMAN, S. Aspectos gerais dos adenocarcinomas de mama, estadiamento e classificação histopatológica com descrição dos principais tipos, **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 1, 2000.

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

FARAH, S. B., In: **DNA segredos e mistérios**. São Paulo: Savier, 2000. p 276.

FOSSUM, T. W. **Small animal Surgery**. St Louis: Mosby-Year Book, 1997. p. 539-544

HENSON, K. L. Sistema Reprodutor. In: **Atlas de Citologia de cães e gatos**. São Paulo: Editora Roca, 2003. cap. 11, p.233-251

HOWARD, E. E.; DELAHUNTA. Abdome, pelve e membro pélvico. In: **Guia para a dissecação do cão**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2001. p. 117-119

INCA - Instituto Nacional de Câncer. BRASIL - Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência a Saúde. Instituto Nacional de Câncer. União Internacional contra o Câncer. **TNM classificação dos tumores malignos**. 5ed., 1998, p. 128-36.

KOLB, E. Fisiologia da glândula mamária. In: **Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1980. p. 413-430

KRAEGEL, S. A. et al. Sequence analysis of canine p53 in the region of exons 3 – 8. **Cancer Letter**, Oxford, v. 92, p. 181-186, 1995.

KREUZER, H.; MASSEY, A. A genética molecular do câncer. In: **Engenharia genética e biotecnologia**. 2ª ed. São Paulo: Artmédica, 2002. p.272-276

KUMARAGURUPARAN, R. et al. Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and mammary tumours. **Research in Veterinary Science**. Oxford, v. 81, p. 218-224, 2006.

KURZMAN, I. D.; GILBERTSON, S. R. Prognostic factors in canine mammary tumors. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, 1, 25-32, 1986.

LERA, J.M. et al. **Detección de mutaciones en el gen p53 en el cáncer de mama familiar y esporádico en la población Navarra**. Anales del Sistema Sanitário de Navarra, v.20, n.3, suplemento 3, 1997. Disponível em http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/index20_3.html. Acesso em: 12/02/2006.

LEWIN, B. Ciclo celular e regulação do crescimento. In: **Genes VII**. Porto Alegre: Artmed, 2001. cap. 27, p.799 – 829

LIKAKI-KARATZA, E. et al. Correlation of mammographic appearance and molecular prognostic factors in high-grade breast carcinomas. **European Journal of Gynaecological Oncology**, Pádua, v. 27, n. 1, p. 39-41, 2006.

LOURO I.D. Oncogenética. **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**, São Paulo, n.11, p. 36-42, 2000.

MACEWAN, E.G., et al. Evaluation of effects of levamisole and surgery on canine mammary cancer. **Journal of Biological Response Modifiers**, New York, v. 4, p. 418-426, 1985.

MAYR, B. et al. Comparative studies in the promoter and exon 1 regions of tumor suppressor p53 in several mammalian species: Absence of in a panel of spontaneous

domestic animal tumours. **Journal Veterinary Medicine**, Vienna, v. 47, p. 593-597, 2000.

MORRIS, J.C. et al. Use of Tamoxifen in the control of mammary neoplasia. **Veterinary Record**, Oxford, v.133, p. 539-42, 1993.

MORRISON, W.B. **Cancers in dogs and cats. Medical and surgical management.** Philadelphia: Willians & Wilkins, 1998. 785p.

MOULTON, J. Tumors of the Mammary Gland In: MOULTON, J. **Tumors in Domestic Animals.** 3^o ed. Los Angeles: University of California Press, 1990, p. 518-552

MUTO, T. et al. P53 gene mutations occurring in spontaneuos benign and malignant mammary tumor of the dog. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 37, p. 248-243, 2000.

NERUKAR, D. R., et al., Comparative pathology of canine mammary tumors. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 10, p. 389-397, 1989.

NETO, L. Z. Neoplasias malignas em cães. Sua analogia com alguns processos idênticos na espécie humana. **UNIMAR CIÊNCIAS**, Marília, v. 1, p. 4-9, 1992.

NOVOSAD, C. A. Principles of Treatment for Mammary Glands Tumors. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 18, n. 2, p. 107-109, 2003.

O'BRIEN, D. J. Spatial and temporal comparison of select cancers in dogs and humans, Michigan, USA. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdan, v.47, p. 187-204, 2000.

OLIVEIRA, C. J. Aplicações teóricas da biologia molecular/engenharia genética em análises clínicas, **Apostila, Disciplina Engenharia Genética**, Curso Biomedicina, Universidade Metodista, São Paulo, p.74, 2005.

OLIVEIRA, E.C.S. et al. Endocrinologia reprodutiva e controle da fertilidade da cadela – revisão. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2003.

OWEN, L. N. The TNM Classification of tumors in domestic animals, 1st Edit., World Health Organization, Geneva, 1980. pp. 20-80

PATSIKAS, M. N. et al. The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, Berlin, v. 35, n. 4, p. 228-34, 2006.

PEREZ ALENZA D. et al. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 12, n. 3, p. 132-9, 1998.

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

SARTIN, E. et al. Heterogenic properties of clonal cell lines derived from canine mammary carcinomas and sensitivity to Tamoxifen and doxorubicin. **Anticancer Research**, Athens, v. 13, p. 229-236, 1993.

SCHAFER, K.A. et al. Natural diseases: A canine model of familial mammary gland neoplasia. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 35, p. 168-177, 1998.

SCHINAIDER, R. et al. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 43, p. 1249-1261, 1969.

SETOGUCHI, A. et al. Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in various tumors in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 62, n.3, p. 433-439, 2001.

SOUZA, D. M. B. **Caracterização patológica e gênica (gene P53) dos tumores mamários em cadelas**. 2006. 78f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

STONE, E. A. Neoplasias da glândula mamária. In: BIRCHARD, S. J., SCHERDING, R. G., **Manual Saunders de clínica de pequenos animais**: São Paulo: Roca, p.234-7, 1998

STRANDBERG, J. D., GOODMAN, D. G. Animal model of human disease: Canine mammary neoplásica. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v.75, p. 225-8, 1974.

VAN LEEUWEN, I. S.; HELLMEN, E., CORNELISSE, C. J. & VAN DEN BURGH, B.; RUTTERMAN, G. R., p53 mutations in mammary tumor cell lines and corresponding tumors tissues in the dog. **Anticancer Research**, Athens, v. 16, p. 3737-3744, 1996.

WALKER, M.R.; RAPLEY, R. **Guia de rotas na tecnologia do gene**. São Paulo: Atheneu, 1999. 334p.

YORIKO, J. et al. Correlação entre a expressão da proteína p53 e a resposta a quimioterapia primária no carcinoma mamário. **Acta Oncológica Brasileira**, São Paulo, v.20, n.1, p. , 2000.

ZUCCARI, A. P. C. et al. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 38, n.1, p. 38-41, 2001a.

ZUCCARI, D. A. P. C. et al. Fisiologia da neoplasia mamária em cadelas – Revisão. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n.32, p.52-54, 2001b.

EXPERIMENTO 1

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA p53 EM NEOPLASIAS
PRIMÁRIAS E METASTÁTICAS DA GLÂNDULA MAMÁRIA DA CADELA**

EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA p53 EM NEOPLASIAS PRIMÁRIAS E METASTÁTICA DA GLÂNDULA MAMÁRIA DA CADELA

RESUMO

O objetivo no presente trabalho foi verificar a expressão imunoistoquímica da proteína p53 na glândula mamária normal, neoplásica e nos linfonodos inguinal ipsilateral com ou sem metástase, oriundos da espécie canina. Dezenove mamas normais, provenientes do Centro de Vigilância Ambiental (CVA) - Recife, serviram como grupo controle (Grupo-1). Vinte e nove amostras de mamas com diagnóstico clínico de tumor (Grupo-2), 29 mamas contra laterais (Grupo-3) e 29 linfonodos (Grupo-4) foram coletados no Hospital Veterinário da UFRPE. O material foi fixado em formol, emblocado em parafina, cortado em 5µm e corado em HE, para identificação ou classificação histopatológica. Para a realização da técnica de imunoistoquímica foi utilizado o método da estreptavidina-biotina peroxidase, otimizado com o sistema de amplificação LSAB-DAKO, e revelado pelo DAB. A expressão imunoistoquímica da proteína p53 foi avaliada quanto à localização no compartimento celular e intensidade da marcação. Todos os espécimes do Grupo 1 apresentaram padrão de normalidade do tecido mamário. A avaliação microscópica do Grupo 2 revelou: 19 tumores malignos, quatro tumores benignos, dois processos inflamatórios, duas glândulas mamárias sem alteração, uma hiperplasia glandular e um não diagnosticado por material insuficiente. No Grupo 3, foram observadas 26 mamas contra laterais sem alteração, duas com presença de metástase e uma com material insuficiente para diagnóstico. Enquanto que, no Grupo 4 foram verificados: seis linfonodos sem alteração, nove com presença de metástase e 13 com material insuficiente. Não foi observada expressão para a proteína estudada nos espécimes pertencentes ao Grupo 1. No Grupo 2, ocorreu marcação positiva em células tanto de tumores benignos (n=3 - 13,6%), como de malignos (n=19 - 86,4%), tal marcação foi localizada no núcleo e no citoplasma, ora isoladamente ora associados. No Grupo 3, a marcação ocorreu nos casos de presença de metástase (n=2 - 7,1%) e em mamas consideradas normais (n=4 - 14,3%). No grupo 4, todos os linfonodos com metástase exibiram marcação, bem como um caso considerado sem alterações morfológicas do tecido linfonodal. Não houve diferenças estatísticas entre a intensidade da marcação e do número de células marcadas com o grau de malignidade. Estes achados permitem concluir que a imunoexpressão não tem correlação com o subtipo histológico nem com o grau de malignidade, mas sim com o processo de metástase dos tumores mamários em cadelas, sugerindo a utilização destes parâmetros para nortear o comportamento destes tumores, associados a diferentes marcadores prognósticos.

Palavras chave: Tumores mamários caninos, proteína p53, metástase, linfonodos.

Immunohistochemical expression of p53 protein in healthy, tumoral and metastatic mammary glandular tissue

ABSTRACT: The objective of the present experiment was to study the p53 expression associating it with the morphologic aspect and histological degree in 29 tumors of mammary gland, contralateral gland and ipsilateral inguinal lymph nodes of canine females. The 19 healthy glands were used as a control group (Group 1). The samples of 29 mammary glands diagnosed with clinic tumor (Group 2), the 29 contralateral mammary glands (Group 3) and the 29 lymph nodes (Group 4) were collected in the routine of the Veterinary Hospital (UFRPE). All the samples were fixed in formol, embedded with paraffin, cut in 5µm and stained in HE. The types of histological tumors, as well as its grading was identified. For the achievement of the immunohistochemical technique, was employed the estreptavidin-biotin peroxidase method using LSAB-DAKO and diaminobenzidine (DAB). The immunohistochemical expression of p53 was evaluated by the location and intensity of the staining demarcation. The morphologic evaluation of group 2 revealed 19 cases of malign tumors, 4 of benign tumors, 2 inflammatory process, 2 healthy mammary gland, 1 glandular hyperplasia e 1 insufficient material. In the Group 3, were observed 26 contralateral mammas without alteration, 2 with metastasis and 1 insufficient material. In the Group 4 were verified 6 lymph nodes without alteration, 9 with metastasis and 14 insufficient materials. Was not observed p53 expression in the samples of Group 1. In the Group 2, were positive demarcations in maligns (19) and benigns (3) tumors, that was localized in the nucleus and cytoplasm, alone or associated. In the Group 3 the demarcation was in the metastasis (2) and in normal mammary tissue (5). In the group 4 the metastic lymph nodes showed staining of moderate to strong intensity. These findings allow to conclude that the immunoexpression hasn't correlation with the histological subtype and maligness grade but may be related to the process of metastasis of the mammary tumors in female dogs. According to the displayed we suggest the application of these parameters to detect these tumors behavior, associated to other prognosis markers in humans.

Key words: Mammary glands, cancer, p53 expression, metastasis, lymph nodes.

INTRODUÇÃO

Em Medicina Veterinária, verifica-se um esforço crescente na tentativa de acrescentar aos fatores prognósticos clássicos, como: tamanho do tumor, presença de ulceração cutânea, e invasão ganglionar linfática, novos parâmetros que auxiliem a decisão clínica, à semelhança do que ocorre em Medicina Humana (QUEIROGA e LOPES, 2002). Segundo Cassali (2003) os critérios de graduação dos tumores mamários são pouco utilizados em Medicina Veterinária, no entanto, resultados similares quanto ao comportamento biológico foram encontrados em experimentos com

cadelas após utilizar os mesmos critérios para os tumores em mulheres (LAGADIC et al., 1990).

A frequência de tumores mamários benignos e malignos em cães varia consideravelmente devido à existência de diferentes métodos de classificação dos tumores e ausência de critérios uniformes para diferenciar os tipos tumorais. Tumores classificados histologicamente como benignos podem eventualmente dar origem a metástases (CASSALI, 2003). Karayannopoulou et al. (2005) após usar o método de graduação proposto por Elston e Ellis, em 1991, verificaram a seguinte frequência para os carcinomas mamários em cadelas: 31,8% (grau I), 32,9% (grau II) e 35,3% (grau III); e observou que não houve relação entre o grau histológico e o tamanho do tumor, idade da cadela durante a mastectomia e metástase de linfonodo.

Quando se trata de saúde, em especial de cancerologia, a brevidade diagnóstica é imprescindível e é oportuno ir além do diagnóstico clínico e histológico rotineiros, buscando informações sobre todos os aspectos envolvidos através de técnicas e/ou exames mais específicos. O uso da técnica imunistoquímica em Patologia Veterinária tem sido limitado devido à falta de anticorpos para os tecidos animais, no entanto podem ser utilizados os anticorpos que apresentam reatividade cruzada entre antígenos humanos e animais (RUIZ et al., 2005), e juntamente com outros exames (citologia e histologia) contribuem para o diagnóstico definitivo e preciso desses tumores (CASSALI et al., 2002). Análises imunistoquímicas para descoberta de receptores de estrógeno, progesterona, fator de crescimento epidermal, oncogenes, supressores de tumor como o gene p53 (Tp53) entre outros, são de grande valor para predizer um prognóstico mais preciso em neoplasia mamária (CASSALI, 2000).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a expressão da p53 através da técnica de imunistoquímica em neoplasias benignas e malignas primárias de mamas e metastáticas em linfonodos de cadelas, segundo o estudo histopatológico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 48 cadelas de várias raças, com idade entre 4 e 13 anos e peso variando de 1,8Kg a 15Kg, das quais foram coletados: glândulas mamárias sem alterações morfológica, glândulas neoplásicas, glândulas contra laterais à tumoração, assim como linfonodo inguinal ipsilateral ao tumor, todos através do diagnóstico clínico.

Para o grupo 1 (controle) foram utilizadas 19 cadelas sem presença de tumor, submetidas à eutanásia no Centro de Vigilância Ambiental (CVA) – Recife, das quais foram retiradas amostras de tecido mamário normal. Os 29 animais restantes foram provenientes da rotina da Clínica Cirúrgica do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), dos quais foram retiradas as amostras referentes aos tecidos glandulares tumorais (grupo 2), as glândulas contra laterais (grupo 3) e os linfonodos inguinais ipsilaterais (grupo 4). A coleta da amostra deu-se no período entre os meses de março a agosto de 2006. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFRPE, sob o protocolo de nº: 06513/2006 (Anexo 1).

Os animais foram identificados em fichas individuais (Anexo 2), onde constavam informações do paciente, estágio reprodutivo, alimentação e uso de contraceptivo. Na avaliação clínica, cada animal foi examinado quanto ao aspecto e localização do tumor, tamanho, tempo de evolução e exames complementares. Nos

casos onde foram visualizados vários nódulos tumorais, optou-se pelo tumor de maior diâmetro.

Para o estadiamento clínico e histopatológico do tumor de mama foram utilizadas as classificações TNM clínica (TNMc) (EISENBERG e KOIFMAN, 2000) e a TNM histopatológica (TNMp) (ELSTON e ELLIS, 1991). Os casos foram classificados em estágios que variam de I a III, em ordem crescente conforme o grau de malignidade (INCA, 1998).

Para a cirurgia, os animais foram submetidos à pré-anestesia com sulfato de atropina (0,044 mg/ Kg) e acepromazina (0,2 mg/Kg), indução com tiopental sódico 2,5% (12,5 mg/kg) e manutenção anestésica com halotano vaporizado em oxigênio. Os fragmentos das mamas coletados foram fixados em solução de formalina neutra e tamponada a 10%, incluídos em parafina e cortados em micrótomo a 5µm. As lâminas foram coradas pelo método da Hematoxilina e Eosina (HE) (PROPHET et al., 1992).

A análise histopatológica foi realizada por três patologistas (2 veterinários e 1 humano), sem conhecimento prévio, que identificaram os tumores com base nas características celulares, utilizando a classificação histológica preconizada pela Organização Mundial de Saúde (OWEN, 1980).

No grupo 1 foi apenas avaliada a integridade e normalidade do tecido mamário.

Após a identificação da natureza do tumor (benigno ou maligno) e das variantes histológicas encontradas nos casos do grupo 2, os tumores malignos foram classificados de acordo com o grau de malignidade, tendo sido atribuído a cada espécime desse grupo (2) os escores de 1 a 3 para cada um dos parâmetros avaliados (formação tubular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico). Os escores de cada parâmetro foram somados e o grau histológico de malignidade foi expresso como: baixo grau ou I (3 a 5 pontos),

grau intermediário ou II (6 a 7 pontos), e alto grau ou III (8 a 9 pontos) (ABREU-E-LIMA et al., 2005).

Os espécimes dos grupos 3 e 4 foram avaliados quanto à presença ou não de metástase.

Para a realização da técnica imunoistoquímica (IHQ), foram obtidos cortes de 3µm, que foram estendidos sobre lâminas de vidro previamente preparadas com organossilano (3-aminopropyltriethoxy-silano, Sigma Chemical CO, USA). Foi utilizado o método da estreptavidina-biotina peroxidase, otimizado com o sistema de amplificação LSAB (Labeled StreptAvidin Biotin for mouse primary antibodies /DAKO). Inicialmente, os cortes foram desparafinados e reidratados; posteriormente, o pigmento formólico foi retirado em solução de hidróxido de amônio a 10%, em etanol a 95%. As secções teciduais foram submetidas ao tratamento para recuperação antigênica (citrato/pH 6.0/steamer/30'). Na seqüência, procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena. Foi utilizado como anticorpo primário o anticorpo anti-p53 (clone 1A4/1:50/60'/DAKO – KUMARAGURUPARAN et al., 2006). O anticorpo secundário, biotinizado polivalente anti-cabra/coelho/camundongo, foi incubado à temperatura ambiente por 30'. A incubação do complexo streptoavidina-biotina-peroxidase ocorreu durante 30' também na temperatura ambiente. A reação foi revelada pela utilização do cromógeno diaminobenzidina (diaminobenzidina, Sigma Chemical CO, USA), e em seguida contra-corados com Hematoxilina de Mayer.

O controle negativo da reação supracitada foi realizado através da incubação, de 1 espécime de cada grupo do estudo, com imunoglobulina especificada pelo fabricante em substituição ao anticorpo primário. O controle positivo foi feito através da incubação de 1 espécime de carcinoma epidermóide de boca, tecido reconhecidamente positivo para o anticorpo primário utilizado.

A leitura da lâmina foi realizada à microscopia de luz; foram estabelecidos os padrões de marcação para o antígeno pesquisado, índice de marcação e intensidade, que variou entre fraca (+), moderada (++) e intensa (+++), bem como sua localização específica (nuclear, citoplasmática ou nuclear/citoplasmática). Posteriormente, as lâminas foram reavaliadas em um aumento de 40x e cada amostra contada por 3 vezes em campo aleatório. Os achados foram anotados individualmente e foi realizada a média dos valores encontrados por grupo.

Na análise estatística dos dados, foi empregado o teste de Kruskal–Wallis para testar a hipótese de homogeneidade das distribuições da contagem das células marcadas, segundo o grau de malignidade. O teste exato de Fisher foi utilizado para testar a hipótese de não–associação entre o grau de malignidade e a intensidade da marcação. Em todos os testes foi adotado o nível de significância de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise Histológica

Grupo 1 - Os 19 casos exibiram aspecto de normalidade do tecido glandular compatível com a idade adulta dos caninos. Foi observado arranjo lobular dos ácinos, bem como arborificação ductal.

Grupo 2 – Dos 29 casos referentes a este grupo, 19 (65,52%) foram classificados como malignos. As variantes histológicas com os referidos graus de malignidade estão demonstradas na Tabela 1. Os tumores benignos representaram 13,79% (4 casos: 2 tumor misto, 1 papiloma, 1 adenoma). Dois (6,9%) casos foram diagnosticados como mastite, 1 (3,45%) como hiperplasia glandular, 2 (6,9%)

espécimes sem alteração morfológicas, e 1 amostra (3,45%) foi perdida durante o processamento.

Tabela 1 – Classificação, número (N) e frequência (%) em relação ao número total de amostras das variantes histológicas dos tumores de mama malignos em cadelas e o grau de malignidade

| Variante histológica | MALIGNOS | | |
|--------------------------------------|-----------|--------------|---------------------|
| | N | % | Grau de malignidade |
| Carcinoma sólido (Figura 1A) | 4 | 13,79 | II |
| Carcinoma <i>in situ</i> (Figura 1B) | 4 | 13,79 | I |
| Carcinoma tubular (Figura 1C) | 4 | 13,79 | 2/III; 2/II |
| Carcinoma papilífero (Figura 1D) | 2 | 6,90 | II |
| Carcinoma sem outras especificações | 1 | 3,45 | II |
| Carcinoma em tumor misto (Figura 1E) | 1 | 3,45 | II |
| Carcinosarcoma (Figura 1F) | 1 | 3,45 | III |
| Tumor misto maligno | 1 | 3,45 | III |
| Fibrosarcoma | 1 | 3,45 | - |
| Total | 19 | 65,52 | - |

Grupo 3 - No exame histopatológico dos 29 espécimes de mamas contra laterais, 26 (89,65%) não exibiram alterações do padrão arquitetural do tecido glandular mamário, em duas (6,90%) amostras foi observada metástase caracterizada pela presença de células neoplásicas caracterizando o carcinoma (Figura 2A). Um caso não pode ser avaliado, pois o material foi insuficiente para diagnóstico ou se perdeu durante o processamento.

Diante destes resultados, a evidência de tumores nas mamas contra laterais é um fator determinante para a retirada das mamas adjacentes, bem como para a ampliação das margens cirúrgicas do tumor primário (MACEWAN et al., 1985).

Hellmén (2005) afirma que cerca de 50% dos tumores de mama em cadelas são considerados malignos, diminuindo a qualidade e tempo de vida. Neste trabalho

também foi observada maior frequência para as variantes histológicas malignas (65,52%). Entretanto, pode-se sugerir que os casos onde não foram diagnosticadas alterações celulares indicativas de processo neoplásico se devam à falhas na etapa de coleta das amostras dos tumores.

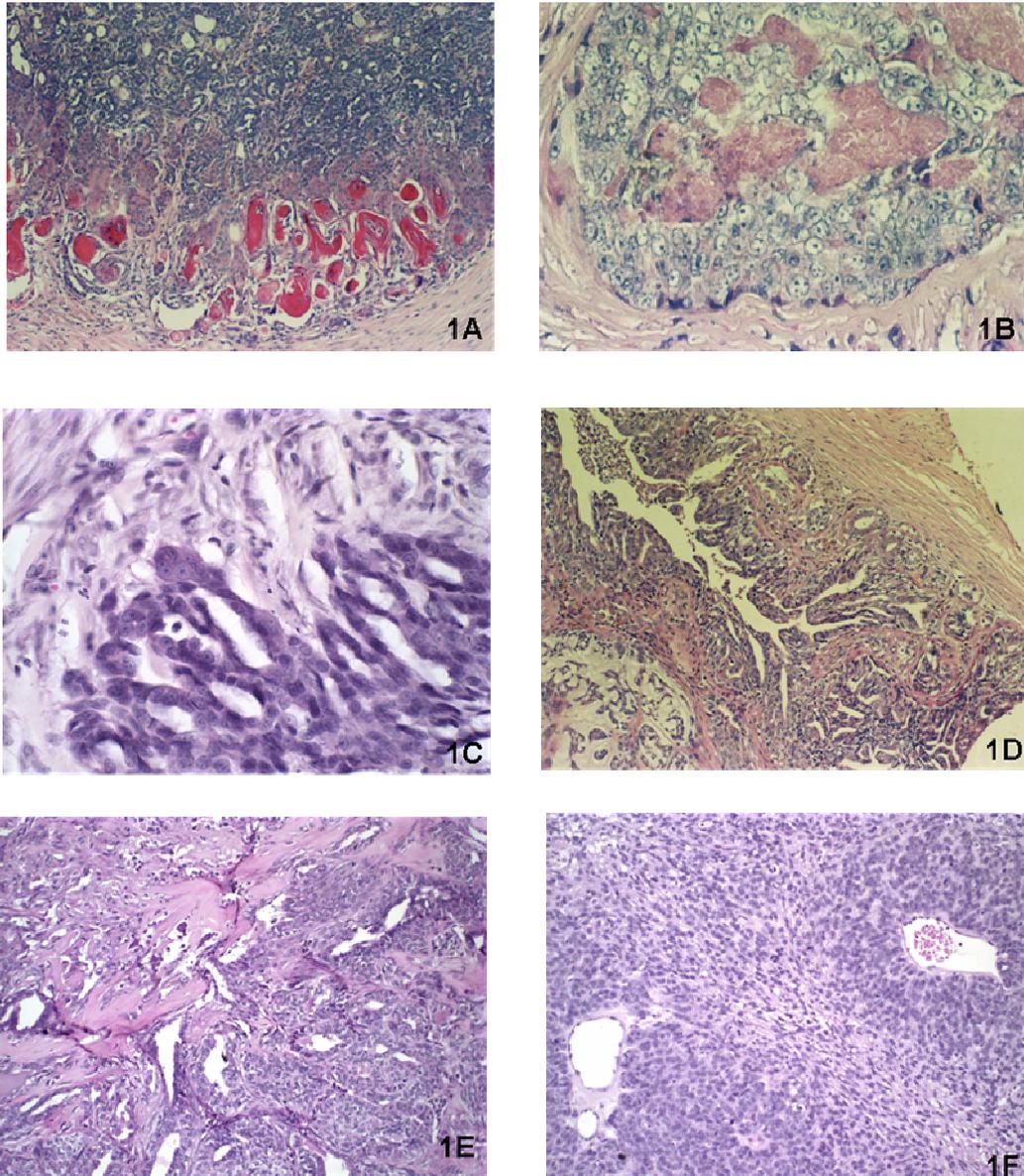


Figura 1 - Variantes histológicas dos tumores de mama malignos em cadelas – **A** - Carcinoma sólido (HE, 100X); **B** - Carcinoma *in situ* (HE, 200X); **C** - Carcinoma tubular (HE, 200X); **D** - Carcinoma papilífero (HE, 100X); **E** - carcinoma em tumor misto (HE, 100X); **F** - Carcinosarcoma (HE, 100X).

Grupo 4 – Nove linfonodos apresentaram metástase. Tais células exibiam morfologia epitelial, sugerindo metástase carcinomatosa (Figura 2B). Das vinte amostras restantes, 7 não apresentaram alterações e 13 não apresentaram tecido suficiente para o diagnóstico.

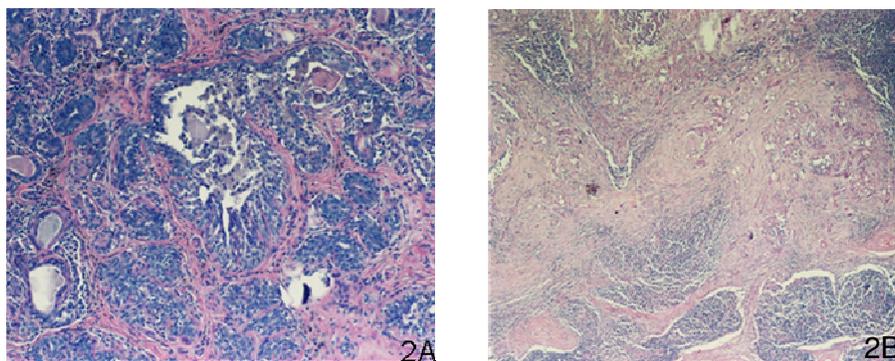


Figura 2 –Metástases loco regionais referentes aos tecidos mamários contra lateral e linfoidal de cadelas com tumor de mama - **A** – Carcinoma em tecido glandular mamário contra lateral (HE, 100X); **B** –Metástase em linfonodo inguinal (HE, 40X)

As glândulas mamárias torácicas (cranial e caudal) usualmente drenam para o linfonodo axilar ipsilateral e raramente para os linfonodos axilares e esternal simultaneamente (PATSIKAS et al., 2006). Como foi coletado apenas o linfonodo inguinal ipsilateral, alguns dos 7 animais da amostra podem representar falsos negativos. Acredita-se que, durante a avaliação clínica de tumores localizados nos primeiros pares das glândulas mamárias, é de extrema importância a avaliação e possível retirada do linfonodo axilar. Nos casos de ausência de alteração volumétrica clínica, sugere-se um exame complementar para exclusão de possíveis metástases ocultas nestes tecidos, tais como ultra-sonografia acompanhado de exame citológico conforme sugerido por Cavalcanti e Cassali (2006). A presença de metástases nos linfonodos inguiniais determina sua retirada, para proporcionar uma melhor qualidade de

vida e maior tempo de sobrevivência ao animal, diminuindo o risco de metástase à distância, tais como as metástases pulmonares.

Das cadelas com diagnóstico histopatológico de carcinoma, duas apresentaram estágio II (Anexo 3) segundo os critérios TNMc, pois em decorrência dos tumores estes foram classificados como: $T_2N_0M_0$ e $T_2N_{1a}M_0$. Fossum (1997) afirmou que cadelas com tumor maior ou igual a 3cm (T_2 e T_3) têm um prognóstico pior quando comparadas àquelas com tumores menores que 3cm (T_1), chegando a 80% de recorrência em 2 anos após o tratamento cirúrgico. No caso dessas cadelas com diâmetros tumorais classificados como T_2 , o tumor já estava visível clinicamente, sendo que em uma delas o linfonodo inguinal já apresentava aumento de volume sugestivo de metástase, ressaltando a necessidade de alertar os proprietários para procurar o diagnóstico o mais precocemente possível, conforme relatado por Zuccari et al. (2001).

As afirmações de Zuccari et al. (2001) podem ser reforçadas pela avaliação de outro animal classificado como $T_2N_{2b}M_0$, neste caso o estágio tem de ser III, pois, independente do tamanho tumoral, o comprometimento do linfonodo é característico de lesão neoplásica maligna. Estes achados demonstram que cadelas com tumores de tamanho de aproximadamente 3cm, podem ser considerados ainda pequenos e não predizem a sua condição de benignidade. Resultados semelhantes foram descritos por outros autores (CASALLI, 2000; QUEIROGA e LOPES, 2002; HELLMÉN, 2005).

A interação entre o clínico e o patologista é de suma importância para elucidar diagnóstico, prognóstico e tratamento específico, assim como o estadiamento clínico é uma ferramenta elementar para uniformizar os dados aparentes do tumor e condição clínica do paciente. Entretanto, o aspecto clínico de um tumor mamário é extremamente diverso, não podendo assim ser considerado como única ferramenta para a elaboração de um prognóstico. A retirada de toda a cadeia mamária é uma condição extrema, mas

está ligada à avaliação TNM_c e, em segunda escala, aos exames complementares, sendo necessária mais de uma amostra do tecido tumoral, para evitar perda ou amostra tecidual inadequada.

Avaliação imunoistoquímica

Grupo 1 – Não observamos marcação positiva para a proteína estudada em nenhum espécime deste grupo.

A ausência de marcação nas 19 amostras do grupo controle mostra que onde há proteína p53 não mutante, a marcação imunoistoquímica não é expressa, refletindo a atividade do TP53 nas suas condições de normalidade.

Grupo 2 – Foi observada marcação positiva em células, tanto de tumores malignos (19) (Figura 3A), como de benignos (3) (Figura 3B). Tal marcação foi localizada no núcleo e no citoplasma, ora isoladamente ora associados. A intensidade de marcação variou de leve a moderada, independente da natureza dos tumores, bem como das variantes histológicas. A tabela 2 demonstra a marcação para a proteína p53 de acordo com a localização da marcação, bem como sua intensidade.

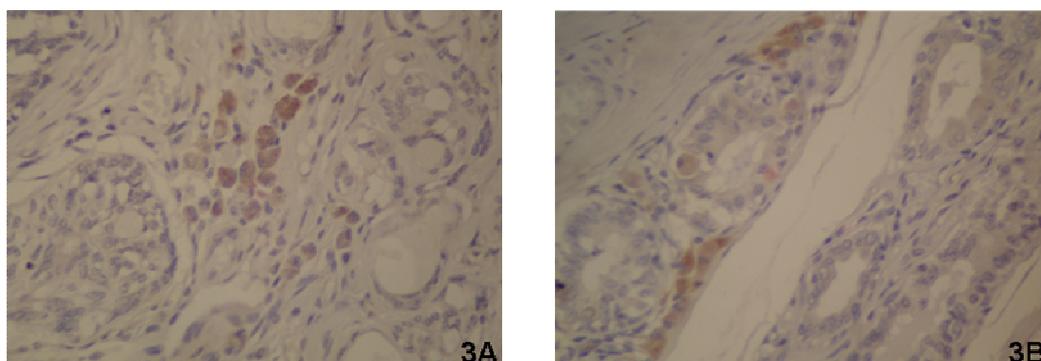


Figura 3 - Imunomarcção positiva para proteína p53 em neoplasia mamária de cadelas- **A** – Em células neoplásicas de tumor mamário maligno (IHQ, p53, 200X); **B** - Em células neoplásicas de tumor mamário benigno (IHQ, p53, 200X).

Tabela 2 – Expressão imunistoquímica da proteína p53 por variante histológica das amostras de tumores da glândula mamária de cadelas (Grupo 2)

| Caso | Subtipo histológico | MN | MC | MNC | TCM | Intensidade |
|-------------|----------------------------|-----------|-----------|------------|------------|--------------------|
| 1 | carcinoma | 2 | 3 | - | 5 | + |
| 2 | carcinoma in situ | - | - | 5 | 5 | ++ |
| 3 | carcinoma in situ | 2 | 5 | - | 7 | ++ |
| 4 | carcinoma in situ | 6 | 2 | - | 8 | ++ |
| 5 | carcinoma in situ | 2 | 4 | - | 6 | ++ |
| 6 | carcinoma papilar | 10 | - | - | 10 | + |
| 7 | carcinoma papilar | - | - | 6 | 6 | ++ |
| 8 | carcinoma sólido | 3 | - | - | 3 | + |
| 9 | carcinoma sólido | 3 | - | - | 3 | ++ |
| 10 | carcinoma sólido | 1 | 4 | - | 5 | + |
| 11 | carcinoma sólido | 2 | 2 | - | 4 | ++ |
| 12 | carcinoma tubular | - | 2 | - | 2 | + |
| 13 | carcinoma tubular | 5 | 1 | - | 6 | ++ |
| 14 | carcinoma tubular | 5 | 4 | - | 9 | + |
| 15 | carcinoma tubular | 3 | - | - | 3 | + |
| 16 | carcinoma tumor misto | 5 | 4 | - | 9 | ++ |
| 17 | carcinosarcoma | 2 | - | - | 2 | ++ |
| 18 | fibrosarcoma | - | - | 6 | 6 | ++ |
| 19 | tumor misto maligno | 8 | 5 | - | 13 | ++ |
| 20 | papiloma | - | 2 | - | 2 | + |
| 21 | adenoma | 1 | 5 | 2 | 8 | + |
| 22 | tumor misto benigno | 3 | 5 | - | 8 | ++ |
| 23 | tumor misto benigno | - | - | - | - | - |
| 24 | hiperplasia | 11 | 7 | - | 18 | ++ |
| 25 | mastite | 1 | 4 | - | 5 | ++ |
| 26 | mastite | 7 | 4 | - | 11 | ++ |
| 27 | Mama sadia | - | - | - | - | - |
| 28 | Mama sadia | - | - | - | - | - |
| 29 | Sem tecido mamário | - | - | - | - | - |

TCM= total de célula marcada; MN= marcação nuclear; MC= Marcação citoplasmática; MNC= marcação citoplasmática e nuclear, + marcação leve, ++ marcação moderada, +++ marcação intensa, - ausência de marcação.

Os resultados deste trabalho revelaram expressão para p53 independente do caráter benigno ou maligno dos tumores, com variação da intensidade da marcação, independente de seus subtipos histológicos. Segundo Bukhari et al. (2006) tumores mamários benignos de ratos albinos também apresentaram expressão para esta proteína. Estes autores afirmam que a expressão de p53 em lesões de caráter benigno reflete uma condição pré-maligna, sendo necessário um melhor monitoramento clínico destes

animais, pois o risco de desenvolver um tumor maligno é maior do que nos animais onde não se verifica tal expressão.

A Tabela 3 mostra a classificação dos tumores segundo o grau de malignidade e intensidade. Além dos 18 tumores malignos, também se observou alterações características de malignidade (Grau I) em 2 tumores benignos (tumor misto benigno). O resultado do teste exato de Fisher indica que o grau de malignidade e intensidade não apresentaram uma associação estatisticamente significativa ($p = 0,079$).

Tabela 3 - Associação entre grau de malignidade e intensidade da imunoposição de p53 em tumores mamários de cadelas

| Malignidade | Intensidade | | Total |
|--------------|------------------|-------------------|--------------------|
| | "+" | "++" | |
| G I | 2 (28,6%) | 5 (71,4%) | 7 (100,0%) |
| G II | 7 (63,6%) | 4 (36,4%) | 11 (100,0%) |
| G III | 0 (-) | 4 (100,0%) | 4 (100,0%) |
| Total | 9 (40,9%) | 13 (59,1%) | 22 (100,0%) |

Souza et al. (2005) não observaram diferenças estatisticamente significativas na marcação imunohistoquímica de p53 em relação aos diferentes subtipos histológicos das lesões malignas. Schafer et al. (1998) revelaram não haver diferença na marcação de p53, sendo que a expressão nuclear desta proteína ocorreu apenas em carcinomas sólidos. Todos os casos (4) de carcinoma sólido revelaram marcação nuclear, entretanto dois casos revelaram marcação citoplasmática, e um dos casos com o número de células marcadas maior no citoplasma que no núcleo. Para Lilling et al. (2002) a expressão citoplasmática da proteína p53 revela o seqüestro da p53 não mutante neste compartimento celular com conseqüências fisiológicas relacionadas ao processo neoplásico independente do estrógeno e a resistência ao tratamento com tamoxifeno em linhagens celulares de câncer de mama.

Behrens et al. (2001) também verificaram marcação no citoplasma de tumores mamários; os tumores benignos revelaram marcação, predominantemente,

citoplasmática, assim como os casos de carcinoma ductal (tubular), lobular e *in situ*. Concluíram que esse tipo de expressão da proteína p53 pode estar relacionado a diferenças da regulação do ciclo celular, indicando um potencial de invasão tumoral aumentado. Neste trabalho também foi verificada marcação citoplasmática em casos de tumores benignos e acredita-se que esse tipo de marcação parece ser mais freqüente do que a literatura relata, refletindo uma outra e/ou nova via de sinalização do p53 nestes tipos de tumores, podendo ser indicativo ou não de transformação como uma característica de comportamento mais agressivo, necessitando de outros estudos para elucidar tal achado.

Quanto aos casos de processos inflamatórios e hiperplasia pode-se sugerir que os primeiros não sejam uma amostra representativa da lesão tumoral, enquanto que o segundo represente, de fato, alteração molecular da proteína estudada, refletindo uma condição de pré-malignidade.

Reforçando tais informações, na Tabela 4 pode-se verificar o índice médio das células marcadas neste grupo (2).

Tabela 4 – Expressão imunohistoquímica da p53 (média, desvio padrão (sd) e mediana de células marcadas) em lesões tumorais (%) de glândulas mamárias caninas

| Grupo 2/ tumores malignos | TCM | | | MN | | | MC | | | MNC | | | % |
|----------------------------------|-------|-----|---------|-------|-----|---------|-------|-----|---------|-------|-----|---------|-------|
| | média | sd | mediana | |
| Carcinoma in situ | 5,5 | 1,2 | 5,1 | 2,5 | 2,5 | 2,0 | 2,8 | 2,2 | 3,0 | 1,3 | 2,5 | 0,0 | 13,79 |
| Carcinoma papilífero | 8,3 | 3,3 | 8,3 | 5,0 | 7,1 | 5,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 3,0 | 4,2 | 3,0 | 6,90 |
| Carcinoma sólido | 3,0 | 0,4 | 3,1 | 2,0 | 0,8 | 2,0 | 1,5 | 1,9 | 1,0 | 1,3 | 2,5 | 0,0 | 13,79 |
| Carcinoma tumor misto | 7,4 | 2,5 | 10,0 | 5,0 | 0,0 | 5,0 | 4,0 | 1,7 | 5,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 3,45 |
| Carcinoma tubular | 4,5 | 2,5 | 4,3 | 3,4 | 2,1 | 4,0 | 1,6 | 1,7 | 1,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 13,79 |
| Carcinoma | 3,6 | 2,4 | 5,0 | 2,0 | 1,0 | 2,0 | 3,7 | 1,5 | 4,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 3,45 |
| Carcinosarcoma | 2,0 | 0,0 | 2,0 | 2,0 | 0,0 | 2,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 3,45 |
| Fibrosarcoma | 6,0 | 2,6 | 5,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 6,0 | 2,6 | 5,0 | 3,45 |
| Tumor misto maligno | 11,0 | 2,7 | 13,0 | 8,0 | 0,0 | 8,0 | 5,0 | 0,0 | 5,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 3,45 |
| Grupo 2/ tumores benignos | | | | | | | | | | | | | |
| Adenoma | 6,5 | 3,4 | 8,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 5,0 | 0,0 | 5,0 | 2,0 | 1,7 | 3,0 | 3,45 |
| Hiperplasia | 15,0 | 2,6 | 14,0 | 10,0 | 3,0 | 10,0 | 5,0 | 2,0 | 5,0 | 1,3 | 1,2 | 2,0 | 3,45 |
| Mastite | 6,5 | 4,4 | 6,5 | 4,0 | 4,2 | 4,0 | 4,0 | 0,0 | 4,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 6,90 |
| Papiloma | 1,5 | 1,0 | 2,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,0 | 0,0 | 2,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 3,45 |
| Tumor misto benigno | 3,0 | 4,2 | 3,0 | 1,5 | 2,1 | 1,5 | 2,5 | 3,5 | 2,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 6,90 |

TCM= total de célula marcada; MN= marcação nuclear; MC= Marcação citoplasmática; MNC= marcação citoplasmática e nuclear

A Tabela 5 apresenta as principais estatísticas descritivas das células marcadas, segundo o grau de malignidade. Os resultados do teste de Kruskal–Wallis indicam inexistência de heterogeneidade entre as distribuições das contagens das células marcadas segundo o grau de malignidade.

Tabela 5. Estatística descritiva da expressão imunoistoquímica da proteína p53 em células tumorais de glândulas mamárias de cadelas, segundo gradação histológica (ELSTON e ELLIS, 1991)

| Variável | Malignidade | N | Média | DP | Mínimo | Mediana | Máximo | Valor p* |
|------------|-------------|----|-------|-----|--------|---------|--------|----------|
| TCM | | | | | | | | 0,825 |
| | I | 8 | 5.5 | 3.0 | 0 | 6.5 | 8 | |
| | II | 11 | 5.1 | 3.2 | 0 | 5.0 | 10 | |
| | III | 4 | 6.8 | 4.6 | 2 | 6.0 | 13 | |
| MN | | | | | | | | 0,509 |
| | I | 5 | 2.8 | 1.9 | 1 | 2 | 6 | |
| | II | 9 | 3.8 | 2.7 | 1 | 3 | 10 | |
| | III | 3 | 5.0 | 3.0 | 2 | 5 | 8 | |
| MC | | | | | | | | 0,562 |
| | I | 6 | 3.8 | 1.5 | 2 | 4.5 | 5 | |
| | II | 6 | 3.2 | 1.0 | 2 | 3.5 | 4 | |
| | III | 2 | 3.0 | 2.8 | 1 | 3.0 | 5 | |
| MNC | | | | | | | | ** |
| | I | 2 | 3.5 | 2.1 | 2 | 3.5 | 5 | |
| | II | 1 | 6.0 | * | 6 | 6.0 | 6 | |
| | III | 1 | 6.0 | * | 6 | 6.0 | 6 | |

* Teste de Kruskal–Wallis; ** Não foi realizado teste de Kruskal–Wallis devido ao pequeno tamanho das amostras. N= nº de amostras, DP= desvio padrão da média, TCM= total de células marcadas; MN= marcação nuclear; MC= Marcação citoplasmática; MNC= marcação citoplasmática e nuclear,

Grupo 3 – Foi observada marcação nos casos onde foi visualizada a presença de metástase nas mamas contra laterais ao tumor (2) e em mamas consideradas normais (4)

(Figura 4). A intensidade de marcação variou de leve a intensa, como pode ser verificado na Tabela 6. Na Tabela 7 esta demonstrada a média de células marcadas pertencentes a este grupo.

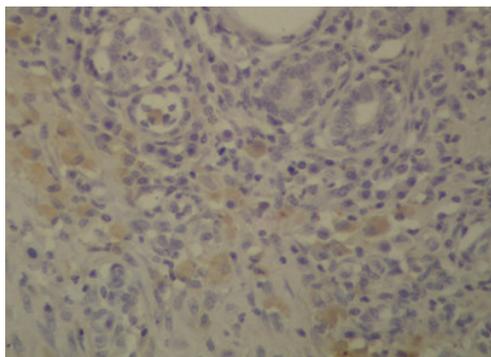


Figura 4 - Imunomarcção positiva para proteína p53 em células da glândula mamária normal contra lateral à com tumor (IHQ, p53, 200X).

Tabela 6 - Expressão imunoistoquímica da proteína p53 na glândula mamária contra-lateral à mama com presença de tumor.

| MAMA CONTRA LATERAL | Nº DE CASOS | MN | MC | MNC | TCM | INTENSIDADE |
|---------------------|-------------|----|----|-----|-----|-------------|
| Com metástase | 1 | - | - | 10 | 10 | +++ |
| Com metástase | 1 | - | 1 | - | 1 | ++ |
| Normal | 1 | 4 | 2 | - | 6 | ++ |
| Normal | 1 | - | 1 | - | 1 | + |
| Normal | 1 | 3 | 5 | 1 | 9 | ++ |
| Normal | 1 | 1 | - | - | 1 | + |
| Normal | 22 | - | - | - | - | - |
| Sem amostra | 1 | - | - | - | - | - |

TCM= total de célula marcada; MN= marcação nuclear; MC= Marcação citoplasmática; MNC= marcação citoplasmática e nuclear, + marcação leve, ++ marcação moderada, +++ marcação intensa, - ausência de marcação.

Tabela 7 – Expressão imunistoquímica da p53 (média, desvio padrão (sd) e mediana de células marcadas) em mamas contra laterais com a frequência (%) de metástase, em cadelas com tumor de mama

| Grupo 3 | TCM | | | MN | | | MC | | | MNC | | | % |
|------------------------|-------|-----|---------|-------|-----|---------|-------|-----|---------|-------|-----|---------|-------|
| | média | sd | mediana | |
| Metástase | 3,5 | 3,5 | 3,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,5 | 0,7 | 0,5 | 5,0 | 7,1 | 5,0 | 6,90 |
| Mama sadia marcada | 3,5 | 2,9 | 3,1 | 2,0 | 1,8 | 2,0 | 2,0 | 2,2 | 1,5 | 0,3 | 0,5 | 0,0 | 20,69 |
| Mama sadia não marcada | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 68,97 |
| Sem amostra | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 3,45 |

TCM= total de célula marcada; MN= marcação nuclear; MC= Marcação citoplasmática; MNC= marcação citoplasmática e nuclear

Grupo 4 - Todos os linfonodos metastáticos exibiram marcação (Figura 5A), bem como um caso considerado sem alterações morfológicas do tecido linfonodal (Figura 5B). A intensidade de marcação variou de leve a intensa, como pode ser verificado na tabela 8. Na tabela 9 esta demonstrada a média de células marcadas pertencentes a este grupo.

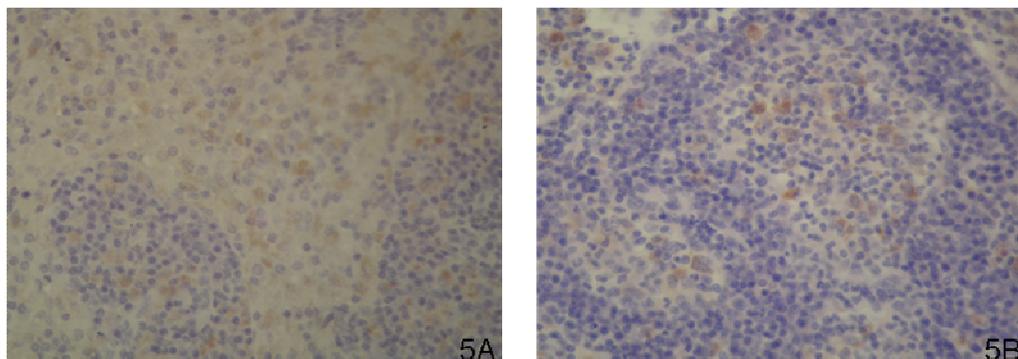


Figura 5 - A - Imunomarcção positiva para proteína p53 em células neoplásicas no linfonodo inguinal de cadelas com tumor de mama (IHQ, p53, 200X); **B** - Imunomarcção positiva para proteína p53 em linfonodo inguinal sem evidências morfológicas de metástase (IHQ, p53, 200X).

Tabela 8 - Expressão imunohistoquímica da proteína p53 nos linfonodos com e sem metástase em cadelas com tumor de mama (Grupo 4)

| LINFONODOS | Nº DE | | | | | INTENSIDADE |
|---------------|-------|----|----|-----|-----|-------------|
| | CASOS | MN | MC | MNC | TCM | |
| Sadio | 5 | - | - | - | - | - |
| Sadio | 1 | - | - | 10 | 10 | ++ |
| com metástase | 1 | - | - | 7 | 7 | +++ |
| com metástase | 1 | - | 3 | 10 | 13 | +++ |
| com metástase | 1 | - | - | 3 | 3 | ++ |
| com metástase | 1 | 3 | 10 | - | 13 | +++ |
| com metástase | 1 | 4 | - | - | 4 | + |
| com metástase | 1 | - | - | 6 | 6 | +++ |
| com metástase | 1 | - | - | 9 | 9 | +++ |
| com metástase | 1 | - | - | 12 | 12 | +++ |
| com metástase | 1 | - | - | 12 | 12 | +++ |
| sem amostra | 14 | - | - | - | - | - |

TCM= total de célula marcada; MN= marcação nuclear; MC= Marcação citoplasmática; MNC= marcação citoplasmática e nuclear, + marcação leve, ++ marcação moderada, +++ marcação intensa, - ausência de marcação.

Tabela 9 - Expressão imunoistoquímica da p53 (média, desvio padrão (sd) e mediana de células marcadas) em linfonodos de cadelas com tumor de mama, e a frequência (%) de metástase

| Grupo 4 | TCM | | | MN | | | MC | | | MNC | | | % |
|----------------|------------|-----|---------|-----------|-----|---------|-----------|-----|---------|------------|-----|---------|----------|
| | média | sd | mediana | média | sd | mediana | média | sd | mediana | média | sd | mediana | |
| Metástase | 6,8 | 3,3 | 7,2 | 0,9 | 1,8 | 0,0 | 1,4 | 3,4 | 0,0 | 5,9 | 5,2 | 7,0 | 31,03 |
| Normal | 1,7 | 4,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,7 | 4,1 | 0,0 | 20,69 |
| Sem amostra | | | | | | | | | | | | - | 48,28 |

TCM= total de célula marcada; MN= marcação nuclear; MC= Marcação citoplasmática; MNC= marcação citoplasmática e nuclear

Os linfonodos com metástase apresentaram uma expressão mais forte de p53 quando comparada aos tumores primários, sugerindo que mudanças na expressão de p53 podem conduzir a uma agressividade celular aumentada e à capacidade invasiva do tumor, por conseguinte, maior potencial para desenvolver metástase à distância (CIANGA et al., 2005).

CONCLUSÃO

A imunexpressão da proteína p53 em lesões benignas pode ter relação com a condição de pré-malignidade, devendo esses casos serem melhor observados. Nas amostras estudadas, a imunexpressão da proteína p53 em tumores malignos não tem correlação com o subtipo histológico e o grau de malignidade e sim com o processo de metástase dos tumores mamários em cadelas. A intensidade e o número de células marcadas foi maior nas metástases, sugerindo a utilização destes parâmetros para nortear o comportamento destes tumores, associados a outros marcadores prognósticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU-e-LIMA, M.C.C. et al. Lesões benignas não neoplásicas e neoplasias da mama.
- BACCHI, C.E. et al. (eds) **Manual de padronização de laudos histopatológicos**. Sociedade Brasileira de Patologia. 3 ed., São Paulo: Reichmann & Autores Editores, 2005. p. 245-281
- BEHRENS, P. et al. Implication of the proliferation and apoptosis associated CSE1L/CAS gene for breast cancer development. **Anticancer research**, Kapandriti, v. 21, n. 4A, p. 2413-7, 2001.
- BUKHARI, M. H. et al. Mutation of p53 in Skin Papilloma and Tubular Breast Adenoma of Albino Mice. **Journal of the College of Physicians and Surgeons**, Pakistan, v. 16, n. 4, p. 280-3, 2006.

CASSALI, G. D. Estudos morfológicos, imuno-histoquímico e citométrico de tumores da cadela – Aspectos comparativos com neoplasias da mama humana. Belo Horizonte, 2000. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Minas Gerais.

CASSALI, G. D. Patologia da glândula mamária. In: NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap. 12, p. 119-133.

CASSALI, G.D. et al. Carcinoma lobular pleomórfico na glândula mamária da cadela: achados histopatológicos e imunoistoquímicos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n.6, p. , 2002.

CAVALCANTI, M. F., CASSALI, G. D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas-revisão. **Clínica veterinária**, São Paulo, n.61, p. 56-64, 2006.

CIANGA, C. et al. Different phenotypes generated by changes in bcl-2 and p53 expression in breast cancer. **Revista de Medici si Naturalisti din Iasi**, Iasi, v.109, n. 4, p. 831-5, 2005.

EISENBERG, A.L.A., KOIFMAN, S. Aspectos gerais dos adenocarcinomas de mama, estadiamento e classificação histopatológica com descrição dos principais tipos, **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 1, 2000

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

FOSSUM, T. W. **Small animal Surgery**. St Louis: Mosby-Year Book, 1997. p. 539-544

HELLMÉN, E. Complex mammary tumour in the female dog: a review. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.72, p. 90-97, 2005.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência a Saúde. Instituto Nacional de Câncer. União Internacional contra o Câncer. **TNM classificação dos tumores malignos**. 5ed., 1998, p. 128-36.

KARAYANNOPOULOU, M. et al. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 133, p. 246-252, 2005.

LAGADIC, M. et al. Tumeurs mammaires de la chienne: critères du pronostic histologique et intérêt d'un grading. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, Paris, v. 166, n.11, 1035-1042, 1990.

LILLING, G. et al. Altered subcellular localization of p53 in estrogen-dependent and estrogen-independent breast cancer cells. **Cancer investigation**, New York, v. 20, n. 4, p. 509-17, 2002.

MACEWAN, E.G., et al. Evaluation of effects of levamisole and surgery on canine mammary cancer. **Journal of Biological Response Modifiers**, New York, v. 4, p. 418-426, 1985.

OWEN, L. N. **The TNM Classification of tumors in domestic animals**, 1st Edit., World Health Organization, Geneva, pp. 20-80, 1980.

PATSIKAS, M. N. et al. The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, Berlin, v. 35, n. 4, p. 228-34, 2006.

PROPHET, E.B. et al. **Laboratory methods in histotechnology**. Washington: Armed Force Institute of Pathology American Registry of Pathology, 1992, 279p.

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

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

RUIZ, F.S. et al. Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.41, n.4, p.263-70, 2005.

SCHAFER, K.A. et al. Natural diseases: A canine model of familial mammary gland neoplasia. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 35, p. 168-177, 1998.

SOUZA, K.C.N. et al. Expressão imunohistoquímica de p53 na discriminação do comportamento biológico dos tumores de glândulas salivares. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.41, n.3, p. 189-95, junho, 2005.

ZUCCARI, D. A. P. C. et al. Fisiologia da neoplasia mamária em cadelas – Revisão. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n.32, p.52-54, 2001.

EXPERIMENTO 2

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DA PCR-RFLP NO POLIMORFISMO DO GENE
p53 NOS TUMORES DA GLÂNDULA MAMÁRIA DE CADELAS**

APLICAÇÃO DA TÉCNICA DA PCR-RFLP NO POLIMORFISMO DO GENE p53 NOS TUMORES DA GLÂNDULA MAMÁRIA DE CADELAS

RESUMO: A técnica PCR-RFLP foi utilizada com o objetivo de identificar mutações em seqüências do exon 8 do gene Tp53 e associar o padrão de fragmentos obtidos ao tipo de tumor de mama ou tecido normal de cadelas. Os DNAs foram extraídos dos tecidos tumorais e de glândulas mamárias macroscopicamente sadias de 50 cadelas submetidas a exérese de tumor. Foram utilizadas para controle 19 cadelas normais. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi usada para amplificar o exon 8 e para o PCR-RFLP foram utilizadas 6 enzimas de restrição, SmaI, DdeI, Rsa, AvaI, BsoBI e AluI. O produto da amplificação apresentou uma única banda de 200 pb no gel de agarose 0,8%. O seqüenciamento do produto de PCR apresentou, em média, 94% de homologia com a sequência conhecida (GeneBank –AAB42022.1). Das 6 enzimas selecionadas, apenas 4 apresentaram polimorfismo (AluI, BsoBI, DdeI e SmaI) na seqüência do exon 8 quanto ao número dos pares de base (pb) ou quantidades de clivagens. O padrão das bandas de cada enzima apresentou polimorfismo entre os grupos diferentes, mas não dentro do seu grupo (cadelas normais, glândulas mamárias com tumor e mama contra lateral ao tumor). Conclui-se que a técnica PCR-RFLP pode ser útil para estabelecer diagnóstico de tumor de mama precocemente, mesmo quando os sinais histopatológicos ainda não estiverem presentes.

Palavras-chave: endonuclease de restrição, genética, câncer, p53, cadela, glândula mamária

Application of PCR-RFLP approach on the Tp53 gene polymorphic study in the canine mammary cancer

ABSTRACT: The PCR-RFLP technique was used with the aim of detecting mutations in sequences of the exon 8 of the gene Tp53 and to associate the pattern of fragments obtained to the type of mammary gland tumor or normal tissue of female dogs. Samples of DNA were extracted of the tumor tissue and of the healthy macroscopically mammary gland of 50 female dogs submitted to exeresis of tumor. Healthy female dogs (n=19) were used for control purposes. The polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify exon 8 and PCR-RFLP was accomplished with 6 restriction enzymes, SmaI, DdeI, Rsa, AvaI, BsoBI and AluI. The DNA amplification presented a single band of 200 bp that was visualized in the 0.8% agarose gel. The sequence of the product of PCR presented 94% of homology on average. Of the 6 selected enzymes, only 4 presented polymorphism (AluI, BsoBI, DdeI and SmaI) among normal mammas and with tumor, about base pairs (bp) or cuts number. The pattern of the bands of each enzyme presented polymorphism among the different groups, but not inside of each group of normal animals or with tumor. In the present study, it was concluded that PCR-RFLP could be used to make an early diagnostic of mammary cancer in tissues with the absence of histopathologic alterations.

Key-words: restriction endonuclease, genetic, cancer, p53, mammary gland, canine.

INTRODUÇÃO

Não obstante as mais variadas origens das neoplasias, elas estão cada vez mais presentes, não apenas nas pessoas, mas também nos animais domésticos. Embora as neoplasias nas glândulas mamárias em cadelas tenham etiologia ainda desconhecida, há indícios de que múltiplos fatores influenciam o micro ambiente das células susceptíveis do tecido mamário, causando o câncer (MORRISON, 1998). Um dos aspectos preconizados na espécie humana está relacionado com a mudança no estilo de vida da sociedade que, atrelada a alguns fatores, desencadeia a formação de neoplasias, tais como: fatores ambientais, nutricionais, químicos e hormonais potencialmente carcinogênicos. Torna-se evidente que a interferência do homem nos hábitos alimentares dos cães e gatos, assim como no seu ambiente, também o coloca sob o mesmo risco. Acredita-se que essa seja uma das explicações que justificam um aumento na frequência de algumas neoplasias no homem e nos seus animais domésticos (MOULTON, 1990).

O ciclo celular é precisamente controlado por várias proteínas, algumas nomeadas de ciclinas, cdk, assim como por produtos dos oncogenes e genes supressores de tumores, como o p53 que, diante da desordem nas etapas que compõe o ciclo celular, podem explicar a origem do câncer. Este conjunto de eventos assegura que o crescimento, duplicação de DNA e divisão nuclear são perfeitamente controlados e sincronizados (LUNDBERG e WEINBERG, 1999).

A cascata de eventos para formação tumoral parece envolver a ativação de vários oncogenes assim como a inativação de genes supressores de tumor, onde cada etapa representa um passo adicional em direção à malignidade completa (DOBSON, 2001; LEE e KWEON, 2002; LERA et al., 1997).

Um gene pode ser alvo das mutações e qualquer alteração em algum segmento dele pode inibir a sua função, no entanto, alguns sítios sofrem um número de mutações bem maior que o esperado pela distribuição aleatória, tais posições são chamadas de “sítios quentes”, importantes para o estudo da biologia molecular (LEWIN, 2001).

Dessa maneira, estudos das alterações gênicas e sua associação com vários fatores levarão à compreensão dos mecanismos envolvidos na etiologia do câncer, e também auxiliarão no diagnóstico e tratamento desta afecção. Mutações no gene p53 do cromossomo 17 estão presentes no DNA de células cancerígenas de humanos e caninos. Outro fato relevante é a homologia do gene p53 entre os vertebrados. Entre as espécies canina e humana, esta homologia é cerca de 81% e, entre humanos e murinos, de 72% (CHU et al., 1998; VELDHOEN e MILNER, 1998).

O Tp53 é o gene mais mutado nas etapas do desenvolvimento do câncer de mama, quando comparado a outros genes também envolvidos em neoplasias mamárias (LERA et al., 1997; MOURA-GALLO et al., 2004). Foi detectado no gene Tp53 maior número de mutações, principalmente nos exons 3 a 8 (KRAEGEL et al., 1995; CHU et al., 1998 e HAGA et al., 2001), resultando na perda de controle do ciclo celular e, como consequência, a sobrevivência das células que apresentam alto grau de mutações (YORIKO et al., 2000).

Porém, as mutações em Tp53, encontradas nas variedades de tumores malignos analisados, são ditas pontuais e estão, em sua maioria, localizadas na região da molécula altamente conservada que corresponde ao domínio de ligação da proteína p53 com o DNA (HAINAUT e HOLLSTEIN, 2000). Tem-se demonstrado que a maioria das mutações missenses no Tp53 causa alterações na conformação da sua proteína, prolongando a sua meia-vida e podendo acumular-se no núcleo das células neoplásicas (BEGNAMI et al., 2005).

Estudos epidemiológicos, na área de biologia molecular do câncer, têm ressaltado a importância da análise de mutações encontradas no Tp53 (PERERA e WEINSTEIN, 2000). Hill e Sommer (2002) consideraram a análise de mutações como um possível teste mutagênico para o câncer de mama. Mutações no gene Tp53 têm sido também associadas com outros tipos de tumores em outros tecidos, como, por exemplo: de baço (KRAEGEL et al., 1995) e tumores ósseos (LOUKOPOULOS et al., 2003). Ambos considerados tumores agressivos, com taxas de sobrevivência muito baixas. Desta forma a utilização da análise de mutações no Tp53 pode auxiliar no prognóstico dos diversos tumores em fases iniciais e, com isso, promover uma maior possibilidade de diagnósticos precoce e sucesso nas terapias (MOURA-GALLO et al., 2004).

Embora a avaliação fenotípica de mutantes venha sendo utilizada para detectar mutações, a identificação da maioria das formas de mutações, particularmente as mutações silenciosas, necessitam de métodos alternativos mais seguros. As técnicas mais sensíveis e sofisticadas são introduzidas para a detecção das formas mais comuns de mutações em pequena escala, incluindo a reação em cadeia de polimerase (PCR) e o sequenciamento de nucleotídeos (WALKER e RAPLEY, 1999). Outros estudos abrangem a técnica PCR-RFLP com o intuito de comparar moléculas de DNA (QIAN et al, 2002).

A enzima de restrição *Bst*U1 foi utilizada para estudar o polimorfismo do códon 72 do gene Tp53 de mulheres com câncer de mama. Este códon codifica arginina (Arg) ou prolina (Pro). O fenótipo Pro/Pro apresentou uma única banda (279 bp), o fenótipo Arg/Arg apresentou duas bandas (160 bp e 119 bp), e o heterozigoto Pro/Arg mostrou 3 bandas (279, 160, e 119 bp). Estes achados foram correlacionados com a sensibilidade do paciente ao tratamento quimioterápico e demonstraram que pacientes com fenótipo

Pro/Pro são menos sensíveis ao tratamento com antraciclina que aqueles com Pro/Arg e Arg/Arg (XU et. al., 2005).

A utilização de técnicas moleculares direcionadas possibilitarão a identificação de marcadores tumorais, aumentando a probabilidade de detecção de células neoplásicas em uma fase mais precoce e antes da formação de metástase, levando a um tratamento antecipado que poderá promover sucesso na terapia do câncer (DOBSON, 2001).

Sendo assim, o objetivo neste trabalho foi detectar mutações em seqüências do exon 8 do gene Tp53 através da técnica PCR-RFLP, com enzimas específicas de restrição, em glândula mamária normal e tumoral de cadelas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 50 cadelas que foram submetidas à exereses cirúrgicas da mama, no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), das quais foram retiradas amostras dos tumores das mamas (TM) e de tecidos das mamas contra laterais ao tumor, aparentemente normais (MN). Também foram retiradas amostras das mamas de 19 cadelas normais (CN) sacrificadas no serviço do Centro de Vigilância Ambiental (CVA) da Prefeitura da Cidade do Recife, que serviram como controle. Parte das amostras foram acondicionadas em formalina tamponada a 10% para exame histopatológico de rotina para caracterizar o tipo de alteração tumoral ou sua ausência. Outra parte das amostras foi armazenada em tubos de criopreservação, em nitrogênio líquido, para a posterior extração de DNA.

Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído no laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada – FAMA, da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE. De cada amostra, utilizou-se aproximadamente 0,5g de tecido mamário, e cada amostra foi macerada em nitrogênio líquido. Para cada amostra foram adicionados: 100µl de TE (Tris, 10mM - Invitrogen Life Technologies e EDTA, 1mM pH 8,0 - Sigma Chemical Co) e 100µl de fenol (Merck) equilibrado pH 8,0. A amostra foi homogeneizada por 1 min e centrifugada (Sigma) a 17.968g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado de 100 µl de fenol-clorofórmio (1:1), homogeneizado por 1 min e centrifugado a 17.968g por 5 min. Ao sobrenadante recuperado foram adicionados 100 µl de clorofórmio (Merck), misturado por 1 min e centrifugado a 17.968g por 5 min. Em outro tubo foram adicionados: 10 µl de acetato de amônio 3M (Cromato Produtos Químico LTDA), 100 µl do sobrenadante do tubo anterior e 100 µl de isopropanol (Merck). A mistura foi homogeneizada por 1 min e incubada por 30 minutos a –20°C, em seguida, centrifugada a 17.968g por 15 min, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado com 500 µl de etanol 70% (Merck) por centrifugação a 17.968g durante 5 min a 4°C. O etanol foi retirado e o sedimento deixado em temperatura ambiente e ressuspenso em água ultra-pura (modificado de MANIATIS et al., 1998).

O DNA extraído foi analisado em gel de agarose 0,8% (Invitrogen Life Technologies) corado com brometo de etídeo, e quantificado com marcador de peso molecular fago-lambda, para análise em luz ultravioleta e fotografado (Olympus – Digital Câmara – C-7070 Wide) para verificação de sua qualidade.

PCR (Reação de Polimerização em Cadeia)

As reações de amplificação foram realizadas para um volume final de 20 µl contendo: 50 ng de DNA genômico, 20 mM Tris-HCl (marca), pH 8.4; 50 mM KCl (marca); 2 mM MgCl₂ (marca), 0,2 mM dNTP (Invitrogen Life Technologies), 10 pmoles de cada oligonucleotídeo (Invitrogen Life Technologies) e 2,5 U *Taq*-polimerase (Invitrogen Life Technologies). Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho identificam o exon 8 - 5': GCTTCTCTCTTCTCACCTG - 3': CTCCTTCACCTCCTCTTGT do gene *Tp53* (CHU et al., 1998). As amplificações foram feitas em termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal) e as etapas consistiram de: desnaturação inicial do DNA a 94°C (2 min); 35 ciclos de: 94°C (1 min), 58°C (1 min), 72°C (1 min) finalizando a reação com a fase de extensão final por um período de 3 min à 72°C (CHU et al., 1998). Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforeses em gel de agarose a 2%, corado com Brometo de Etídio, visualizados em transluminador de ultravioleta e comparados com o marcador de peso molecular 50bp (DNA Ladder, Invitrogen Life Technologies) e fotodocumentados.

Sequenciamento do Exon 8

Foram selecionadas seis amostras de glândula mamária de cadelas normais para análise de sequenciamento de DNA. Os produtos obtidos pela PCR foram purificados, usando protocolo comercial (PureLink PCR Purification Kit, Invitrogen, USA) para remoção de sais e resíduos de oligonucleotídeos e dNTPs.

O sequenciamento dos produtos de PCR foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, setor de sequenciamento de DNA, onde foram processados em sequenciador automático (MegaBACE 1000) utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase). As seqüências foram analisadas pelo software

Sequence Analyser utilizando Base Caller Cimarron 3.12. Cada sequenciamento foi realizado com oligonucleotídeos sense e antisense.

As enzimas de restrição AluI, AvaI, BsoBI, DdeI, RsaI e SmaI, e foram selecionadas a partir da análise das seqüências do exon 8, no programa Neb Cut 2.0 (New England – Biolabs Inc) disponível em <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>.

PCR-RFLP (Reação de Polimerização em Cadeia – Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição)

A reação de corte do DNA com as enzimas de restrição foi realizada para um volume final de 15 μ L. Para cada reação foi preparada uma mistura contendo 8,5 μ L de água milliQ, 1,5 μ L de tampão da enzima, 1,0 U da enzima de restrição. Após homogeneização, foram adicionados 10 μ L da mistura em um microtubo (200 μ l) contendo 5 μ l do produto de PCR, que foi mantido por 4 horas a 37°C em condições de tamponamento; após este tempo, a enzima foi inativada em 65°C por 20 minutos. Após a digestão enzimática, o DNA digerido foi submetido a um gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo, com marcador de peso molecular DNA-Ladder (50bp), sobre luz e fotografado, para verificação das bandas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos 50 animais, o resultado histopatológico das amostras de mama com tumor (TM) apresentou maior freqüência de tumores malignos (96%) e nestes observou-se a presença de carcinomas e tumor misto maligno. Os tumores restantes foram benignos (4%). As mamas da cadeia contra lateral apresentaram resultado compatível com mama normal, bem como as das cadelas controle.

A alta frequência de carcinomas observada nestes animais reforça a necessidade de estudos para diagnóstico precoce, pois, são lesões de alta gravidade e de prognóstico reservado (CASSALI, 2003).

O DNA genômico extraído apresentou uma única banda de aproximadamente 200pb no gel de agarose. Os produtos de PCR analisados neste experimento foram submetidos a comparação com a sequência depositada no GeneBank (AAB42022.1), e apresentaram em média 94% de homologia.

Das 6 enzimas selecionadas apenas 4 (AluI, BsoBI, DdeI e SmaI) apresentaram polimorfismo de número de pares de base ou número de clivagens, diferenciando as glândulas mamárias normais das que possuíam tumor (Tab. 1). O padrão das bandas de cada enzima apresentou polimorfismo entre os grupos, mas não dentro de cada grupo de animais normais ou com tumor, não havendo possibilidade de relacionar a resposta do polimorfismo com a malignidade da lesão.

Tabela 1 - Padrão de bandas de nucleotídeos em pares de bases (pb) obtidos após PCR-RFLP para cada enzima de restrição em amostras de mamas de cadelas com e sem tumor

| Enzimas de restrição | Amostras | | |
|----------------------|-----------------------|-----------------|---------------------------|
| | Mama de cadela normal | Mama com Tumor | Mama contralateral normal |
| AluI | 200pb | 50, 150 e 200pb | 50, 150 e 200pb |
| BsoBI | 25, 50 e 75pb | 50 e 75pb | 50 e 75pb |
| DdeI. | 50, 75, 100pb | 25, 75 e 100pb | 50, 75 e 100pb |
| SmaI | 80 e 120 pb | 50 e 75pb | 50 e 75pb |

A utilização de PCR-RFLP em estudos de mutação do gene Tp53 em humanos tem-se limitado, ao códon 72 (OSBORNE et al., 1991; XU et al., 2005) com o objetivo de associá-lo ao câncer ou detectar pacientes com maior sensibilidade a quimioterapia. Em cães, o estudo deste códon não é possível, considerando que esta região do Tp53,

rica em prolina, foi perdida devido a deleções que ocorreram durante a evolução (KRAEGEL et al., 1995; VELDHOEN e MILNER, 1998).

A utilização do exon 8, neste trabalho, foi motivada pela alta frequência de mutações observadas por outros autores que consideram este exon como um dos pontos quentes de mutações do gene Tp53 e correspondente à parte do domínio central da proteína p53 que se liga ao DNA para exercer sua função reguladora onde se encontram os códons 273 e 282, correspondentes ao aminoácido arginina (LEVINE, 1997; CHU et al., 1998; MUTO et al., 2000; LEE e KWEON 2002; SOUZA, 2006).

Em outras patologias a utilização de enzimas de restrição em estudos de PCR-RFLP tem sido útil para diferenciar a etiologia de doenças similares. Sakamoto et al. (2000) estudaram o polimorfismo do códon 201 do gene Gs α em diferentes tipos de displasias ósseas. Em carcinoma hepatocelular foi possível encontrar mutações no códon 249 do gene Tp53 através da digestão com a enzima HaeIII, resultando num método de diagnóstico precoce para esta patologia (QIAN et al, 2002).

A técnica de PCR-RFLP, embora fácil de ser executada, depende da existência de sítios para endonuclease de restrição surgidos ou destruídos por mutações de interesse (QIAN et al., 2002).

A SmaI apresentou alteração na localização do sítio de restrição e no número de bandas, resultando em fragmentos de tamanhos diferentes quando se compararam mamas de animais sadios com as de animais portadores de tumor (Fig. 1).

Pela análise dos fragmentos, pode-se observar que a enzima BsoBI revela dois tipos de alelos no exon 8 do Tp53 das cadelas normais, com 2 (75, 75 e 50pb) ou 3 (75, 75, 25 e 25pb) clivagens, porém as mamas com tumor e as contra laterais normais, apresentaram apenas o alelo que gera 2 clivagens (Fig. 1). A perda da heterozigose, neste caso, deve estar relacionada com a função da p53.

Ao contrário, a AluI não cortou as seqüências de cadelas normais, o que foi observado pela existência de apenas uma banda de 200pb, porém as mamas de cadelas com tumor, sadias ou não, apresentaram heterozigose caracterizada pelas bandas de 200, 150 e 50pb (Fig. 2).

A DdeI para cadelas normais e para mamas contra laterais, apresentou heterozigose com padrão de 1 corte (100 e 100bp) e 2 cortes (75, 75 e 50bp) (Fig. 2). A heterozigose se manteve nas mamas com tumor, no entanto a mutação alterou o número de cortes em um dos alelos (75,75, 25 e 25bp).

A observação de padrões diferentes representando o polimorfismo gerado pelas enzimas utilizadas, reflete a existência das mutações nos códons relativos aos sítios de restrição das enzimas, ou ainda em outros códons, quando geram novos pontos de restrição.

Os códons 278 e 301 (SmaI e BsoBI) e 297 (DdeI) codificam o aminoácido prolina (Pro), um importante indicador de atividade na proteína p53. Estudos sobre o códon 72 de humano demonstraram que a homozigose Pro/Pro torna a proteína menos eficiente do que a homozigose para o aminoácido arginina (Arg/Arg) (XU et al., 2005; YI e LEE, 2006).

As alterações na heterozigose embora não tenham sido estudadas em caninos como em tumores humanos, pelo resultado das análises das enzimas utilizadas neste trabalho (AluI, BsoBI e DdeI) comprovam que, em cadelas, também é possível relacionar esta característica com mutações no exon 8 do gene Tp53. Estudos posteriores poderão determinar um códon e uma endonuclease de restrição que possam ser utilizados no diagnóstico precoce da doença, a exemplo do códon 72 em humanos.

O códons citados se encontram próximos aos códons de importância para a função da proteína (HAINAUT e HOLLSTEIN, 2000) e podem sofrer as conseqüências

de inserções ou deleções de nucleotídeos que alteram a seqüência das bases e se encontram em quantidades significativas em tecidos alterados, conforme já observado por Souza (2006) em seqüências do gene p53 em cadelas com tumor de mama.

As mutações observadas no exon 8 foram as mais freqüentes e estiveram relacionadas com diferentes tipos de tumores, inclusive nas mamas que ainda não apresentavam alterações histopatológicas (SOUZA, 2006).

O fato de não ter havido diferença entre os tecidos de mamas com tumor e as normais do mesmo animal, com as enzimas BsoBI e SmaI, reforça a idéia de que os tecidos que ainda não apresentam alteração visível, já se encontram alterados no nível molecular e portanto são potencialmente capazes de desenvolver tumores ao longo do tempo, uma vez que as alterações nos genes supressores de tumor podem ocorrer anos antes de se iniciar a transformação neoplásica (DOBSON, 2001; LEE e KWEON, 2002; LERA et al.,1997).

Souza (2006) demonstrou que mamas adjacentes ao tumor e histologicamente normais apresentaram alterações moleculares do gene Tp53. Portanto, o reconhecimento precoce da alteração genética permitirá a intervenção/tratamento em tempo de evitar o progresso tumoral e o aparecimento de metástases que comprometem significativamente a sobrevivência do paciente (INCA, 2004).

Conclui-se que embora o estudo por PCR-RFLP apresente resultados dependentes de mutações em locais específicos que geralmente ocorrem de forma aleatória, esta técnica pode vir a ser uma importante ferramenta para o estudo da carcinogênese mamária na cadela, possibilitando gerar diagnósticos precoces através do polimorfismo obtido com endonucleases de restrição pré-selecionadas.

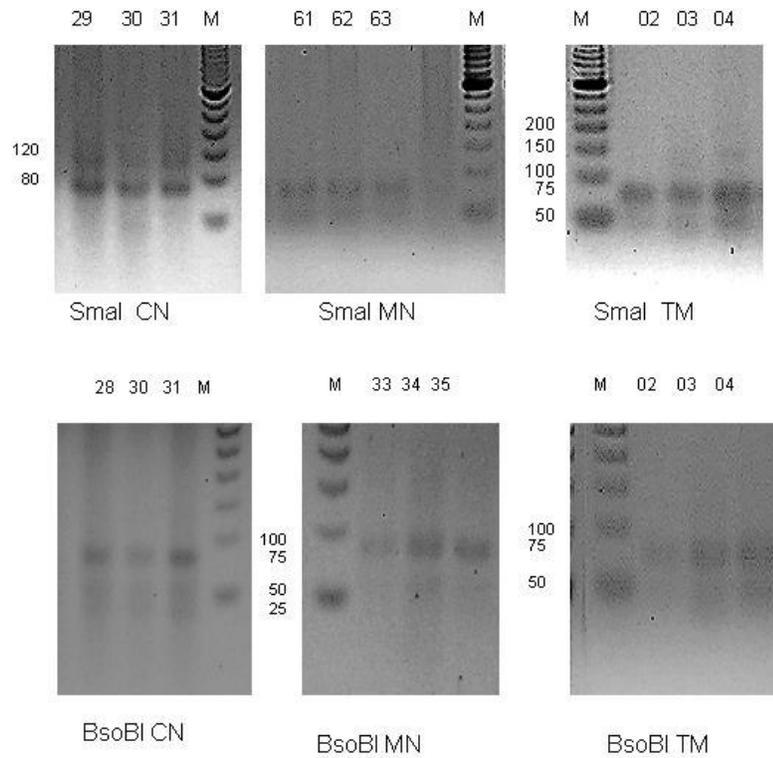


Figura 1 – Resultado de PCR-RFLP para as enzimas BSoBI e SmaI, em mamas de cadelas normais (CN), mamas normais de cadelas com tumor (MN) e mamas com tumor (TM). M- Marcador de peso molecular.

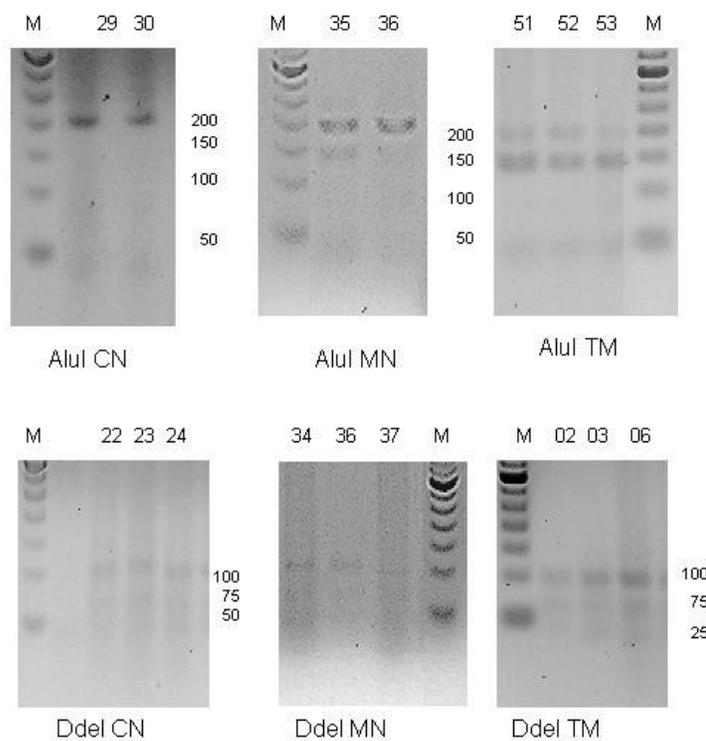


Figura 2 – Resultado de PCR-RFLP para as enzimas AluI e DdeI, em mamas de cadelas normais (CN), mamas normais de cadelas com tumor (MN) e mamas com tumor (TM). M- Marcador de peso molecular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEGNAMI, M. D. et al. Expressão imunohistoquímica de c-erb-B₂ e p53 em carcinomas gástricos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 4, p. 279-286, 2005.

INCA. Instituto Nacional de Câncer – Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde.. **TNM: classificação de tumores malignos**. traduzido por EISENBERG, A. L. A. 6. ed. - Rio de Janeiro: INCA, 2004. 254p.

CASSALI, G. D. Patologia da glândula mamária. In: NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Patologia **da reprodução dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap. 12, p. 119-133.

CHU, L.L. et al. Genomic organization of the canine p53 gene and its mutation status in canine mammary neoplasia. **Breast Cancer Research Treatment**, Haque, v. 50, p. 11-25, 1998.

DOBSON, J. M. Princípios da terapia do câncer. In: DUNN, J. K. **Tratado de Medicina de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 2001. cap. 50, p. 979-1022.

HAGA, S. et al. Overexpression of the p53 gene product canine mammary tumors. **Oncology Reports**, Athens, v. 8, p. 1215-1219, 2001.

HAINAUT, P.; HOLLSTEIN, M. p53 and human cancer: the first thousand mutations. **Advances in Cancer Research**, New York, v. 77, p. 81-137, 2000.

HILL, K.A.; SOMMER, S. p53 as mutagen test in breast cancer. **Environment Molecular Mutagenesis**, New York, v. 39, p.216-217, 2002

INCA. Instituto Nacional de Câncer – Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde.. **TNM: classificação de tumores malignos.** traduzido por EISENBERG, A. L. A. 6. ed. - Rio de Janeiro: INCA, 2004. 254p.

KRAEGEL, S. A. et al. Sequence analysis of canine p53 in the region of exons 3 – 8. **Cancer Letter**, Oxford, v. 92, p. 181-186, 1995.

LEE, C.; KWEON, O. K. Mutation of canine tumor supresor gene p53 in a mammary gland adenocarcinoma and a malignant mast cell tumor. **Journal Veterinary Clinical**, n. 19, v.2, p. 195-198, 2002.

LERA, J.M. et al. **Detección de mutaciones en el gen p53 en el cáncer de mama familiar y esporádico en la población Navarra.** Anales del Sistema Sanitário de Navarra, v.20, n.3, suplemento 3, 1997. Disponível em http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/index20_3.html. Acesso em: 12/02/2006.

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

LEWIN, B. Ciclo celular e regulação do crescimento. In: **Genes VII.** Porto Alegre: Artmed, 2001. cap. 27, p.799 – 829

LOUKOPOULOS, P. et al. Clinical and pathologic relevance of p53 index in canine osseous tumors. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 40 p. 237-248, 2003.

LUNDBERG, A. S., WEINBERG, R. A. Control of the cell cycle and apoptosis. **European Journal Cancer**, New York, v. 35, p. 531-9, 1999.

MANIATIS, T. et al. (Eds.) **Molecular Cloning: a laboratory manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.1-3, 1998.

MORRISON, W.B. **Cancers in dogs and cats. Medical and surgical management.**

Philadelphia: Willians & Wilkins, 1998. 785p.

MOULTON, J.E. (Ed.) **Tumours in domestic animals.** 3 ed. Berkeley: University of

California, 1990. 672p.

MOURA-GALLO, C. V. et al. Mutações no gene TP53 em tumores malignos de mama: associação com fatores de risco e características clínico-patológicas, inclusive risco de óbito, em pacientes residentes no Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, Rio de Janeiro, v.7, n.2, p.167-175, 2004.

MUTO, T. et al. *p53* Gene Mutations Occurring in Spontaneous Benign and Malignant Mammary Tumors of the Dog. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 37, p. 248–253, 2000.

OSBORNE, R.J. et al. Mutations in the *p53* gene in primary human breast cancers. **Cancer Research**, Baltimore, v. 51, p. 6194-98, 1991.

PERERA, F. P.; WEINSTEIN, I.B. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 21, p. 517-24, 2000.

QIAN, G.-S. et al. Sensitivity of electrospray ionization mass spectrometry detection of codon 249 mutations in the *p53* gene compared with RFLP. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v. 11, p. 1126–1129, 2002.

SAKAMOTO, A. et al. A comparative study of fibrous dysplasia and osteofibrous dysplasia with regard to $G_s\alpha$ mutation at the Arg²⁰¹ codon. **Journal of Molecular Diagnostics**, Bethesda, v. 2, n. 2, p. 67-72, 2000.

SOUZA, D. M. B. **Caracterização patológica e gênica (gene P53) dos tumores mamários em cadelas.** 2006. 78f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

VELDHOEN, N.; MILNER, J. Isolation of canine p53 cDNA and detailed characterization of full length canine p53 protein. **Oncogene**, Basingstoke, v. 16, p. 1077-1084, 1998.

WALKER, M.R.; RAPLEY, R. **Guia de rotas na tecnologia do gene**. São Paulo: Atheneu, 1999. 334p.

XU, Y. et al. p53 Codon 72 Polymorphism Predicts the Pathologic Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 11, n. 20, p. 7328-7333, 2005.

YI, S.Y.; LEE, W.J. A p53 genetic polymorphism of gastric cancer: Difference between early gastric cancer and advanced gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 12, n.40, p. 6536-6539, 2006.

YORIKO, J. et al. Correlação entre a expressão da proteína p53 e a resposta a quimioterapia primária no carcinoma mamário. **Acta Oncológica Brasileira**, São Paulo, v.20, n.1, p. , 2000.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise do envolvimento do Tp53 em neoplasias mamárias de cadelas revelou a importância deste gene na etiologia dos tumores malignos que afetam esta espécie.

A proteína p53 mutante, revelada pela imunohistoquímica nos tecidos mamários neoplásicos, possui ação supressora de tumor alterada e, portanto, permite o desenvolvimento dos tumores, já identificada inclusive nos tecidos que ainda não evidenciaram alterações histológicas.

O mesmo foi possível observar no nível molecular, pelo polimorfismo gerado pela ação de endonucleases específicas, que diferenciou animais normais de animais portadores de tumor, seja no tecido neoplásico ou não.

Estas duas abordagens, embora utilizem técnicas diferentes, podem servir para identificar alterações mamárias precocemente.

A utilização das técnicas de diagnóstico precoce deve ser cada vez mais incentivada, bem como o conhecimento de que tecidos aparentemente saudáveis podem desenvolver neoplasias e metástases. Pois, mesmo que ainda não tenham desenvolvido a alteração histológica, estão molecularmente alterados e são potencialmente capazes de desenvolver tumor ao longo do tempo.

Estas informações devem ser repassadas para os médicos veterinários que atuam na clínica cirúrgica de caninos, bem como para os proprietários destes animais, esclarecendo a importância do diagnóstico precoce. Em casos mais adiantados, deve ser considerada uma abordagem terapêutica mais radical, como por exemplo, a extirpação de toda a cadeia mamária e linfática.

Outro aspecto a ser considerado é que existe similaridade na morfologia e comportamento biológico entre tumores malignos de mama em cadelas e mulheres, portanto é possível utilizar a espécie canina como modelo experimental para estudos de

carcinogênese mamária humana. Isto poderá trazer benefícios relativos à identificação de marcadores moleculares em cadelas que possam ser utilizados para o prognóstico precoce ou até mesmo para a identificação da melhor terapia a ser utilizada em cada caso de neoplasia.

Se os estudos futuros não chegarem à erradicação do câncer, uma das doenças que mais matam no mundo, a esperança é que se possa diagnosticá-la e tratá-la tão precocemente que os sintomas nem cheguem a ser sentidos pelo paciente, reduzindo a mortalidade e melhorando a qualidade de vida.

6 ANEXOS

1 Parecer do Comitê de Ética

2 Ficha de identificação e avaliação de tumor de mama em cadelas

3 Quadro de resultados para estadiamento clínico (TNM), diagnóstico histopatológico e avaliação imunoistoquímica em cadelas com tumor de mama.

Anexo 1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISILOGIA ANIMAL
COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



Recife, 31 de maio 2006

PARECER Nº 08/2006 CEEA/DMFA

TÍTULO DO PROJETO: "ESTUDO DO POLIMORFISMO DO GENE P53 EM TUMORES MAMÁRIOS DE CADELA ATRAVÉS DA TÉCNICA PCR-RFLP."

AUTOR: MANOEL ADRIÃO GOMES FILHO

Proc. Nº 06513 /2006

Após análise do projeto em tela, esta Comissão acatou o parecer favorável do relator Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior, quanto ao mérito do projeto acima, de acordo com os princípios básicos para pesquisa envolvendo animais pré-estabelecidos por esta Comissão, em consonância com as recomendações do COBEA e legislações pertinentes.

Presicente:

Valdemiro Amaro da Silva Júnior

Anexo 2

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE TUMORES DE MAMA EM CADELAS

Data: ___ / ___ / _____

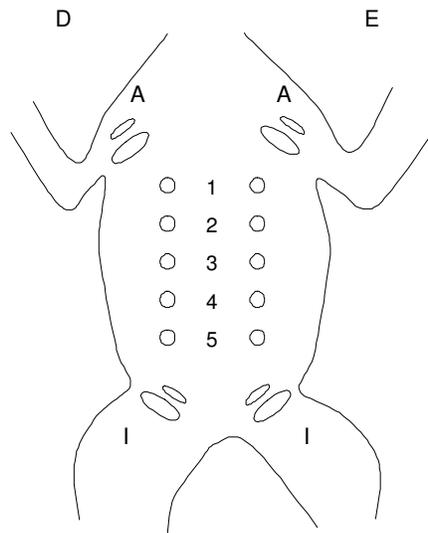
Nº da ficha:

| | |
|-------------------|----------|
| Nº do Prontuário: | |
| Nome do animal: | Idade: |
| Raça: | Pelagem: |
| Proprietário: | |
| Endereço: | |
| CEP: | Fone: |
| E-mail: | |

Anamnese

| | |
|--|--|
| Sinais: | |
| Sintomas: | |
| Início: | |
| Alimentação: () Ração - Marca comercial: () Caseira - Qual? | |
| Perda de peso: () Sim () Não | Intolerância ao exercício: () Sim () Não |
| OSH anterior: () Sim () Não | |
| Início da puberdade: | |
| Nº deaios: | Intervalo entre ciclos: |
| Nº de gestações: | Intervalo entre gestações: |
| Período de desmame: | Abortos: |
| Dificuldade reprodutiva: | |
| Tempo de ciclo reprodutivo: | |
| Apresentou pseudogestação: | |
| Aplicação de anticoncepcional: () SIM () NÃO Qual: | |
| Quantas vezes: | |
| Histórico familiar de tumor mamário: | |
| Histórico de mastite: | |
| Fez exames radiográficos: | |
| Já fez mastectomia: | |
| Há quanto tempo apareceu a nodulação: | |

Massa tumoral



Características do tumor

| | | |
|-----------------------------------|---|---|
| Mobilidade | s | n |
| Ulceração | s | n |
| Eritema | s | n |
| Aderência da pele | s | n |
| Infecção | s | n |
| Envolvimento de fascia ou músculo | s | n |
| Dor local | s | n |

Classificação TNM

| Tamanho (T) | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 |
|---------------|----------|------------------|----------------------|--------------------|------------------------|
| | < 0,5 cm | 0,5 – 1 cm | 1 – 3 cm | 3 – 5 cm | > 5 cm |
| Linfonodo (N) | N0 | N1A | N1B | N2A | N2B |
| | Não | ipsilateral fixo | ipsilateral não fixo | Contralateral fixo | Contralateral não fixo |
| Metástase | M0 | M1 | | | |
| | ausente | presente | | | |
| TNM | | | | | |

| | | | | | | | | | |
|---------|----|---|----|---|---|----|-----|-----|---------------------|
| | | 3 | | | | | ++ | | s/ amostra |
| T3N0M0 | 17 | 1 | 5 | 2 | 3 | | + | II | Carcinoma |
| | | 2 | 0 | | | | | | Normal |
| | | 3 | | | | | | | s/ amostra |
| T4N0M0 | 18 | 1 | 0 | | | | | | s/ alt. |
| | | 2 | 0 | | | | | | Normal |
| | | 3 | | | | | | | s/ amostra |
| T3N0M0 | 19 | 1 | 8 | 3 | 5 | | ++ | I | Tumor misto benigno |
| | | 2 | 0 | | | | | | Normal |
| | | 3 | 0 | | | | | | Normal |
| T5N1AM0 | 20 | 1 | 4 | 2 | 2 | | ++ | II | Carcinoma sólido |
| | | 2 | 0 | | | | | | Normal |
| | | 3 | 6 | | | 6 | +++ | | Metástase |
| T2N1BM0 | 21 | 1 | 6 | | | 6 | ++ | | Fibrosarcoma |
| | | 2 | 0 | | | | | | Normal |
| | | 3 | | | | | | | s/ amostra |
| T3N1AM0 | 22 | 1 | 8 | 6 | 2 | | ++ | I | Carcinoma in situ |
| | | 2 | 0 | | | | | | Normal |
| | | 3 | 0 | | | | | | Normal |
| T2N0M0 | 23 | 1 | 9 | 5 | 4 | | + | II | Carcinoma tubular |
| | | 2 | 0 | | | | | | Normal |
| | | 3 | 0 | | | | | | Normal |
| T3N1AM0 | 24 | 1 | 6 | | | 6 | ++ | II | Carcinoma papilar |
| | | 2 | 0 | | | | | | Normal |
| | | 3 | 9 | | | 9 | +++ | | Metástase |
| TN1AM0 | 25 | 1 | 0 | | | | | I | Tumor misto benigno |
| | | 2 | 0 | | | | | | Normal |
| | | 3 | | | | | | | s/ amostra |
| T2N0M0 | 26 | 1 | 3 | 3 | | | + | II | Carcinoma tubular |
| | | 2 | 0 | | | | | | Normal |
| | | 3 | 12 | | | 12 | +++ | | Metástase |
| T3N1BM0 | 27 | 1 | 6 | 2 | 4 | | ++ | I | Carcinoma in situ |
| | | 2 | 0 | | | | | | Normal |
| | | 3 | 12 | | | 12 | +++ | | Metástase |
| T3N1AM0 | 28 | 1 | 21 | | | 21 | +++ | | s/ amostra |
| | | 2 | 0 | | | | | | Normal |
| | | 3 | 10 | | | 10 | ++ | | Normal |
| T4N0M0 | 29 | 1 | 13 | 8 | 5 | | ++ | III | Tumor misto maligno |
| | | 2 | 0 | | | | | | Normal |
| | | 3 | | | | | | | s/ amostra |

TNM= Estadiamento Clínico – T= Tumor, N= Linfonodo, M= Metástase

Sítio: 1= fragmento de tumor, 2= Mama Contra-lateral, 3= Linfonodo ipsolateral

TCM= Total de Células Marcadas, MN= Marcação Nuclear, MC= Marcação Citoplasmática;

GM=Grau de Malignidade, I= fraca, II= Moderada, III= Intensa

Sobrevida= situação do animal após 8 meses da cirurgia