

TATIANA BORGES DE CARVALHO

**NEOPLASIA MAMÁRIA EM CADELAS: CARACTERIZAÇÃO
HISTOPATOLÓGICA E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS
DE ESTRESSE (HSP 72)**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2006**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C331m
2006

Carvalho, Tatiana Borges, 1977-

Neoplasia mamária em cadelas : caracterização histopatológica e expressão de proteínas de estresse (HSP 72) / Tatiana Borges Carvalho. – Viçosa : UFV, 2006.

xii, 35f. : il. ; 29cm.

Orientador: Andréa Pacheco Batista Borges.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 29-35.

1. Cão - Doenças. 2. Mamas - Tumores. 3. Tumores - Histopatologia. 4. Proteínas de choque térmico. 5. Tumores em animais. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.70896994

TATIANA BORGES DE CARVALHO

**NEOPLASIA MAMÁRIA DE CADELAS: CARACTERIZAÇÃO
HISTOPATOLÓGICA E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE
ESTRESSE (HSP 72)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de setembro de 2006.

Prof^a. Cristina Maria Ganns Chaves Dias
(Co-orientadora)

Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo
(Co-orientador)

Prof^a. Elizabeth Pacheco Batista Fontes

Prof. Antônio José Natali

Prof^a. Andréa Pacheco Batista Borges
(Orientadora)

Aos meus pais, Solange e Francisco, pois por mais incerto que seja o futuro, sempre serei quem vocês me ensinaram a ser. E isso, mãe, pai, não há nada que pague. Ofereço-lhes mais essa vitória, pois tudo o que tenho feito foi receber.

AGRADECIMENTO

A Deus, porque Fostes testemunha das dificuldades do percurso e aliado nas superações; obrigado Senhor por presentear-me com a riqueza do estudo.

A toda a minha família que ofereceu sempre o melhor que pôde dar, seja através de um olhar de apoio ou uma palavra de incentivo. Amo todos vocês!

Ao André por todo amor, carinho e companheirismo;

A tia Andréa, uma pessoa muito especial; se hoje estou aqui é porque você acreditou no meu sucesso e caminhou ao meu lado. Palavras nunca vão ser suficientes para expressar o meu mais sincero agradecimento;

A Manú, Renato e Zavan, equipe meia boca; obrigada por tornar tão agradável a minha escolha de dedicação, a presença de vocês tornou a jornada mais amena;

A minha afilhada Talita, companheira de todas as horas;

Ao Stéphanou, uma grande amizade que o mestrado me proporcionou; obrigada pela paciência, pelos ensinamentos e pelas boas risadas. Valeu cabeça!!

Aos meus grandes amigos Rose, Betânia, Evandro, Jair, Lukiya, Napoleão e Dudu, por tornar doce e fascinante todo o aprendizado;

Aos professores do DVT, em especial José Antônio, Gonzaga, Ricardo, Marlene e Patarroyo, por contribuírem para a minha formação; meu respeito e gratidão;

À professora Paula Bevilacqua e ao José do Carmo pela valiosa ajuda;

Aos funcionários do DVT, em especial à Lucinda, Maninha, Seu Nenzinho, Geraldinho e Rose, personagens imprescindíveis na minha caminhada.

Aos professores Elizabeth Fontes, Maria Cristina Baracat e Antônio José Natali por cederem às instalações e materiais do LBMP e Proteômica/ BIOAGRO/UFV;

Às professoras Cristina Maria Chaves e Elizabeth Fontes, pela disponibilidade e paciência;

Aos colegas e funcionários do LBMP e Proteômica/BIOAGRO/UFV, por toda ajuda e aprendizado;

A CAPES pelo apoio financeiro;

A UFV pela oportunidade de participar de uma grande escola.

BIOGRAFIA

Tatiana Borges de Carvalho, filha de Francisco Silvério de Carvalho e Solange de Cássia Borges de Carvalho, nasceu em Belo Horizonte – MG, no dia 15 de outubro de 1977. Gradou-se em Medicina Veterinária no ano de 2003 pela Universidade Federal de Viçosa, onde permaneceu ingressando no curso de especialização Lato Sensu em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais. Em 2004 ingressou no curso de mestrado nessa mesma instituição concluindo-o em setembro de 2006.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Neoplasia Mamária em cadelas	2
2.1.1. Anatomofisiologia da glândula mamária	2
2.1.2. Tumor mamário em cadelas	4
2.1.3. Etiologia das neoplasias mamárias	5
2.1.4. Características microscópicas e histogênese	6
2.1.5. Diagnóstico das neoplasias mamárias	8
2.1.6. Tratamento das neoplasias mamárias	9
2.1.7. Prognóstico	10
2.2. Proteínas de choque térmico	10
2.2.1. Resposta celular ao estresse	10
2.2.2. Proteínas de estresse	12
2.2.3. HSPs no câncer	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Coleta das amostras	16
3.2. Processamento e análise histopatológica	17
3.3. Identificação de HSP nos tecidos mamários	17
3.4. Análise estatística	19

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1. Avaliação histopatológica	20
4.2. Expressão de HSP 72	24
5. CONCLUSÕES	28
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Distribuição dos animais pesquisados em relação ao tumor de mama, segundo a raça, Hospital Veterinário, DVT/UFV, março a agosto de 2005.	20
Tabela 2. Distribuição dos animais pesquisados em relação ao tumor de mama, segundo a idade ao diagnóstico, Hospital Veterinário, DVT/UFV, março a agosto de 2005.	21
Tabela 3. Distribuição dos resultados em relação ao tumor de mama, segundo a glândula mamária acometida, Hospital Veterinário, DVT/UFV, março a agosto de 2005.	22
Tabela 4. Distribuição dos resultados em relação ao tumor de mama, segundo a glândula mamária acometida, Hospital Veterinário, DVT/UFV, março a agosto de 2005.	22
Tabela 5. Distribuição dos resultados em relação ao tumor de mama, segundo classificação histopatológica, Hospital Veterinário, DVT/UFV, março a agosto de 2005.	23
Tabela 6. Distribuição dos resultados em relação ao tumor de mama, segundo classificação histopatológica, Hospital Veterinário, DVT/UFV, março a agosto de 2005.	24

Tabela 7. Expressão de HSP 72 em tecido mamário neoplásico e normal. 26

Tabela 8. Expressão de HSP 72 em tecido mamário neoplásico 26

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Expressão de HSP 72 e 73 em tecido mamário de cadelas. Quantidades similares de proteínas totais extraídas de tumor mamário maligno (1), tumor mamário benigno (2) e tecido mamário normal (3) foram separadas por SDS-PAGE e visualizadas por Coomassie (A) ou transferidas para membrana de nitrocelulose e sondadas com o anticorpo anti-HSP 70 (B).	25

RESUMO

CARVALHO, Tatiana Borges, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Setembro de 2006. **Neoplasia mamária em cadelas: caracterização histopatológica e expressão de proteínas de estresse (HSP 72)**. Orientadora: Andréa Pacheco Batista Borges. Co-Orientadores: Cristina Maria Ganns Chaves Dias, Ricardo Junqueira Del Carlo, Cláudio César Fonseca e Luiz Gonzaga Pompermayer.

Tumor de mama é a neoplasia mais freqüente em cadelas e a semelhança com os tumores da mama na mulher determina um interesse crescente no estudo da patologia comparada. A expressão de proteínas de choque térmico (HSP) tem sido observada em muitas neoplasias, incluindo o câncer de mama. O objetivo desse trabalho foi classificar histopatologicamente e investigar a expressão de HSP 72 em glândula mamária normal e neoplásica de cadelas atendidas no serviço ambulatorial do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizadas 34 amostras de tecido mamário, sendo 23 neoplásicas e 11 normais, submetidas à análise histopatológica e pesquisa de HSP 72 através de Western blotting. Além disso, foram investigadas as variáveis: idade ao diagnóstico, raça, glândulas mamárias acometidas e classificação histopatológica da amostra. Os dados foram analisados por meio de tabelas de freqüência e a comparação entre as proporções das variáveis pelo teste de Qui-quadrado (χ^2), utilizando nível de significância de 5%. Observou-se maior freqüência de diagnóstico da neoplasia mamária em cadelas entre 8 e 13 anos de idade, nas glândulas mamárias abdominais caudais e inguinais, sem diferença estatística entre malignas e benignas e classificação histopatológica. Os tecidos neoplásicos apresentaram uma maior proporção de expressão da proteína HSP 72 quando comparados ao tecido normal, sendo observado equivalência entre tumores benignos e malignos quanto à expressão dessa proteína.

ABSTRACT

CARVALHO, Tatiana Borges, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September of 2006. **Mammary neoplasms of female dogs: Characterization histopatological and expression of stress proteins (HSP 72)**. Adviser: Andréa Pacheco Batista Borges. Co-Advisers: Cristina Maria Ganns Chaves Dias, Ricardo Junqueira Del Carlo, Cláudio César Fonseca e Luiz Gonzaga Pompermayer.

Mammary tumor is the most frequent neoplasms in female dogs and the similarity of those tumors with the mammary tumors in the woman determines an interest in the study of the compared pathology. The expression of Heat Shock Proteins (HSP) have been observed in many neoplasms, including breast cancer. The aim of this work was to classify histopatologically and to investigate the expression of HSP 72 in normal and neoplastic canine mammary glands of female dogs assisted in the service of the Veterinary Hospital of the Federal University of Viçosa. 34 samples of mammary tissue were collected, including 23 neoplastics and 11 normal tissue, for histopatological analysis and investigation of expression of HSP 72 using Western blotting. Furthermore, the variables age to the diagnosis, breed, attacked mammary glands and histopatological classification of the tissue were investigated. Statistical analysis was carried out using *Chi-square* test (χ^2). The result were considered statistically significant in the $P < 0,05$. The major frequency of the neoplasm diagnostic was at 8 to 13 years old, at the inguinal and caudal abdominal mammary glands and no statistical difference was observed between malignants and benign tumors nor at histopatological classifications. The expression of HSP 72 was determined in normal and neoplastic mammary gland tissue, this last one presenting an accentuated expression of this protein. The neoplastic tissue presented a larger proportion of expression of the protein HSP 72 when compared to the normal tissue, being observed equivalence among benign and malignants tumors as for the expression of that protein.

1. INTRODUÇÃO

O estudo do câncer de mama em cadelas reveste-se de importância pela alta frequência com que surgem na rotina clínica de pequenos animais, constituindo a segunda forma mais comum de neoplasias nessa espécie. Adicionalmente, essa importância também é influenciada pelo fato de que os proprietários exigem cada vez mais que seus animais sejam objetos de atenções semelhantes às que são prestadas aos pacientes humanos. Além disso, a semelhança desses tumores, em diversos aspectos, com os tumores da mama na mulher, motiva o interesse no estudo da patologia comparada, a partir do uso de modelos animais.

As modificações na expressão de determinadas proteínas, associadas ao processo de malignização celular, necessitam ser caracterizadas e podem se tornar um dos pontos-chave no diagnóstico e na terapia tumoral. Um segmento promissor são as pesquisas a respeito da resposta celular ao estresse, envolvendo um grupo de proteínas denominadas “proteínas de choque térmico” ou HSP (heat shock protein). As aplicações clínicas provenientes desses estudos são potencialmente vastas e podem vir a ser fundamentais em diversas doenças, como o câncer. Muitas pesquisas estão em andamento, há muito que se descobrir e a relevância do assunto justifica plenamente o seu estudo e a sua divulgação.

Esse trabalho objetivou classificar histologicamente e investigar a expressão de Hsp 72 em tecido mamário normal e neoplásico de cadelas atendidas no serviço ambulatorial do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa no período de março a agosto de 2005.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Neoplasia mamária em cadelas

2.1.1. Anatomofisiologia da glândula mamária

A glândula mamária é classificada como uma glândula apócrina túbulo-alveolar composta, consistindo de estroma (estrutura de tecido conjuntivo), parênquima (porção epitelial), ductos, vasos e nervos. Já está presente, sob a forma de linhas mamárias subepidermais em fases precoces do embrião e, em animais do sexo feminino, cresce durante o desenvolvimento fetal aumentando após o nascimento (Frandsen, 1979).

A cadela possui cinco pares de glândulas mamárias, denominadas torácicas craniais, torácicas caudais, abdominais craniais, abdominais caudais e inguinais. Todas com a mesma organização estrutural, sendo formadas por lóbulos separados por septos conjuntivos, cujos ductos drenam para canais secretores mais calibrosos, os ductos lactíferos, que abrem direta e independentemente no mamilo, em número variável. Antes de atingir o mamilo, os ductos lactíferos formam uma dilatação ampolar designada por seio lactífero. O epitélio de revestimento dos ductos é formado por uma dupla camada de células epiteliais cúbicas ou cilíndricas baixas e à medida que vão se ramificando para formar dúctulos intralobulares, o epitélio transforma-se em simples cúbico ou cilíndrico (Peleteiro, 1994). Os alvéolos das glândulas mamárias são formados por um epitélio cilíndrico simples que sintetiza e secreta proteínas lácteas e lipídios durante a lactação (Kolb, 1987). Os ductos, assim como os alvéolos, são circundados por células mioepiteliais contráteis, que se assemelham a fibras musculares lisas, que se contraem sob a influência da ocitocina,

secretando o leite (Frandsen, 1979). Além do tecido epitelial, ainda há a presença de fibroblastos e células que compõem e sustentam o tecido mamário. Esta formação é de extrema importância no estudo dos tumores mamários, pois existe uma relação direta entre os componentes da lesão e o prognóstico (Zuccari et al., 2001a).

A circulação linfática promove o contacto de algumas glândulas homolaterais, mas não existe comunicação entre as cadeias mamárias direita e esquerda. Pode haver a comunicação linfática das glândulas abdominais craniais e torácicas caudais, sendo as abdominais craniais as únicas que drenam simultaneamente para o linfonodo axilar acessório e para o inguinal superficial. No entanto, todas as mamas têm drenagem independente para o linfonodo mais próximo. Em certos exemplares, tem sido ainda identificada uma ligação da circulação linfática entre a glândula abdominal cranial e a abdominal caudal (Peleteiro, 1994).

As glândulas mamárias diferenciam-se durante os sucessivos estágios de vida do animal (Kolb, 1987). Na fêmea impúbere ela é formada por um sistema tubular ramificado rudimentar, ligado aos ductos lactíferos. Quando sob o efeito dos estrógenos, durante a puberdade, o sistema tubular se desenvolve, com discreto aumento de células adiposas. Portanto, o volume externo da mama aumenta ligeiramente, o que acontece, sobretudo nas abdominais caudais e inguinais. A progesterona atua significativamente sobre as glândulas da cadela, e o tipo de ciclo estral destes animais determina uma ação prolongada desse hormônio durante o metaestro, que retorna ao seu nível basal cerca de 80 a 100 dias após o início do estro. Nas cadelas gestantes, a progesterona promove o desenvolvimento glandular, com proliferação das células epiteliais da porção terminal dos ductos intralobulares. Subseqüentemente, ocorre a formação dos alvéolos secretores, que são constituídos por epitélio cilíndrico simples entremeado por células mioepiteliais. Durante a fase de lactação e sob a ação de vários hormônios, os ductos e alvéolos secretores estão distendidos, uns cheios de leite e outros quase vazios, separados por septos conjuntivos finos. Quando termina a lactação, a maioria dos alvéolos é reabsorvida e a mama diminui de volume (Peleteiro, 1994).

Dessa forma, as glândulas mamárias se diferenciam e envolvem repetidamente a cada ciclo. Assim sendo, modificações organizacionais do tecido glandular, apesar de fisiológicas, podem levar ao desenvolvimento, em qualquer local desse tecido, mas especialmente na região epitelial, de alterações neoplásicas diversas (Zuccari et al., 2001a).

2.1.2. Tumor mamário em cadelas

Tumores de mama são freqüentes em cadelas adultas, compreendendo 52% de todas as neoplasias diagnosticadas (Allen et al., 1986), sendo esse tipo de tumor duas a três vezes mais comum na cadela do que na mulher (Peleteiro, 1994). A freqüência de malignidade entre esses tumores é de aproximadamente 50%; e entre essas a maioria é constituída por carcinomas e entre as benignas o tipo histológico mais encontrado é o adenoma (Allen et al., 1986; Allen & Mahaffey, 1989).

Todo aumento de tecido mamário deve ser avaliado como possível neoplasia, sendo que aumentos generalizados não relacionados com pseudociese, lactação ou mastite devem receber atenção especial. De forma semelhante, tumores de origem diversa daquela do tecido da mama, que aparecem na região das glândulas mamárias, também são de grande importância, pois diferentes tratamentos podem ser indicados para tumores como linfossarcomas, lipomas e mastocitomas (Zuccari et al., 2001a).

Como ocorre na maioria das neoplasias, a idade é um fator influente nos tumores mamários. Segundo Moulton et al. (1970), tumores mamários caninos são raros em cadelas com menos de 2 anos de idade, porém a incidência aumenta abruptamente aos 6 anos, continuando a aumentar até os 10 anos, quando a ocorrência começa a diminuir, sendo raros em cadelas com idade superior a 12 anos.

Muitos estudos indicam não haver predisposição racial para neoplasias mamárias (Moulton et al., 1970), entretanto raças como Spaniel Inglês, Cocker Spaniel, Pointer, Poodle, Labrador, Fox Terrier e Retriever são apontadas com uma maior ocorrência de tumor mamário (Cotchin, 1958; Mccaw, 1993).

Nas cadelas, o desenvolvimento de neoplasias mamárias é menos freqüente nas glândulas torácicas, sendo que a proporção aumenta gradativamente até as glândulas inguinais (Sorribas, 1995). Cerca de 60% desses tumores estão localizados nas mamas abdominais e inguinais, possivelmente por serem as que contêm maior quantidade de parênquima, com maior atividade proliferativa em resposta ao estrógeno (Moulton et al., 1970). Não raramente há mais de uma glândula atingida e às vezes toda a cadeia do mesmo lado se mostra afetada. É ainda possível encontrar mais de uma massa tumoral na mesma mama, o que permite considerar os tumores mamários em cadelas como neoplasias multicêntricas (Peleteiro, 1994).

A incidência de tumores mamários em cães machos é muito baixa. Segundo Brodey et al. (1983) a percentagem de machos atingidos num total de 1.954 casos foi menos que 1, e pode ser explicada, em parte, pela pequena quantidade de tecido mamário.

2.1.3. Etiologia das neoplasias mamárias

A hipótese do envolvimento de um componente etiológico de natureza hormonal tem sido a mais aceita atualmente, visto que se têm verificado diferenças significativas quanto ao risco em cadelas castradas e não castradas, dependendo ainda da fase em que a intervenção cirúrgica é efetuada (Peleteiro, 1994). Com a ovariosalpingohisterectomia (OSH) realizada antes do primeiro ciclo estral, existe 0,5% de risco de desenvolvimento de tumor mamário, sendo de 8% o risco quando a castração é feita após o primeiro ciclo e de 26% quando o procedimento é realizado após dois ou mais ciclos. Cadelas submetidas à castração após os dois anos e meio de idade, não são beneficiadas pelos efeitos profiláticos desse procedimento porque, nessa idade as glândulas mamárias já se desenvolveram plenamente (Schneider et al., 1969). É importante dizer que a OSH concomitante a mastectomia também não tem efeito sobre o prognóstico em animais com neoplasia mamária (Yamagami et al., 1996). Assim se cadelas castradas antes do primeiro cio têm chances mínimas de desenvolver neoplasia mamária, a dependência hormonal do tumor fica evidenciada (Moulton, 1990).

A relação do estrógeno com o aparecimento do tumor de mama baseia-se no conceito geral de que a divisão celular desempenha papel fundamental na sua patogênese, e que qualquer fator que aumenta a atividade mitótica no epitélio mamário aumentará o risco de aparecimento do tumor (Fonseca, 1998). É possível que ao agir como fatores iniciadores, ou mesmo como promotores, seja estimulando a multiplicação celular ou alterando o genoma das células, os hormônios não tenham por si só a capacidade de desencadear o desenvolvimento de uma neoplasia. No entanto, ao atuar em conjunto com outros fatores e em fases diferenciadas da formação de um tumor, é possível que tenham papel determinante (Peleteiro, 1994).

A medicação anticoncepcional em cadelas, promove a longo prazo, a formação de nódulos hiperplásicos nas glândulas mamárias e tais alterações podem iniciar ou predispor o tecido a transformação maligna. Portanto, os hormônios, se não

iniciam, pelo menos mantêm os tumores mamários caninos. Assim sua ação é determinante, seja estimulando a multiplicação celular, seja alterando o genoma das células tornando-as neoplásicas (Peleteiro, 1994).

Já se acreditou que tumores mamários estão associados a desordens endócrinas como ciclo estral irregular, ovário policístico, persistência de corpo lúteo e hiperplasia endometrial, porém estudos mais cautelosos não encontraram diferença significativa entre irregularidade do ciclo estral ou mesmo pseudogestação com o desenvolvimento de tumor mamário (Peleteiro, 1994).

Outras hipóteses citadas sobre a etiologia das neoplasias mamárias, são: origem viral; influência da dieta, principalmente no que se refere ao consumo de gordura e obesidade. A hipótese de etiologia viral ainda não foi confirmada com segurança, mas não deve ser descartada, pois partículas virais têm sido detectadas em células de tumores de mama em gatas e em cadelas, porém ainda não foi possível identificar qualquer tipo de vírus (Peleteiro, 1994).

O risco de aparecimento do tumor mamário pode estar ligado a fatores nutricionais interagindo já nos primeiros meses de vida do animal, principalmente antes do primeiro cio. A obesidade no primeiro ano de vida, assim como um ano antes do diagnóstico tumoral, parecem predispor as fêmeas à neoplasia. A alimentação caseira, principalmente no que se refere à alta ingestão de carnes bovinas e suínas, apresentou associação positiva com o desenvolvimento tumoral em cadelas (Sonnenschein et al., 1991).

2.1.4. Características microscópicas e histogênese

A complexidade do tumor mamário decorre principalmente do próprio tecido mamário, cuja estrutura histológica é heterogênea. As neoplasias originam-se a partir de células epiteliais ductuolares e/ou alveolares, células mioepiteliais adjacentes ao epitélio e/ou células do tecido conjuntivo intersticial (Zuccari et al., 2001b).

Histopatologicamente, os tumores mamários são interpretados como benignos ou malignos, ocorrendo com igual frequência em cães, enquanto em gatos 85% são considerados malignos (Mccaw, 1993).

Com base no histórico do animal e no seu exame físico, o tumor maligno caracteriza-se por apresentar um crescimento rápido, infiltração nos tecidos vizinhos e freqüente ulceração (Allen et al., 1986). Os critérios de malignidade aplicáveis na

avaliação microscópica são: grande densidade celular no esfregaço, com baixo grau de coesão, pleomorfismo celular, anisocariose, padrões irregulares de distribuição de cromatina, figuras de mitoses normais e anormais e presença de vários nucléolos no mesmo núcleo (Zuccari et al., 2001a). Já o tumor benigno possui crescimento lento e expansivo, tendo área circunscrita, não aderido aos tecidos adjacentes; suas células são bem diferenciadas, próximas do tecido normal e as atipias celulares são raras e discretas (Filho et al., 1998).

Uma característica importante do tumor mamário maligno é a capacidade metastática. As metástases ocorrem, primeiramente, via circulação linfática, aos linfonodos regionais e, posteriormente, via hematogêna aos pulmões. As glândulas adrenais, rins, coração, fígado, baço, ossos, cérebro e pele são órgãos também afetados, porém com menor frequência (Mccaw, 1993; Peleteiro, 1994).

O tópico da classificação das neoplasias mamárias em cadelas vem se popularizando, mas percebe-se que esse é um assunto controverso por causa de sua complexidade. Em 1999, foi publicada numa obra da Organização Mundial da Saúde (OMS) uma classificação, destinada a uniformizar critérios e classificações em cancerologia veterinária (Misdorp et al., 1999). Esta classificação, embora sujeita a algumas críticas, teve o mérito de conseguir a concordância ou pelo menos a adoção por parte de grande número de investigadores (Peleteiro, 1994).

Segundo essa classificação, os tumores podem ser divididos em simples e complexos. Os tumores simples são aqueles compostos por células epiteliais ou por células mioepiteliais, ou seja, somente um tipo celular; já os complexos são aqueles formados por células epiteliais e por mioepiteliais, isto é, ambas as células. Os tumores mamários ainda podem ser classificados como mistos, termo usado quando há metaplasia, ou seja, presença de tecido ósseo ou cartilaginoso no tecido mamário, sendo esses tecidos formados a partir de células mioepiteliais (Brodey et al., 1983).

Desse modo, os tumores malignos podem ser classificados em carcinoma não infiltrativo (*in situ*), carcinoma complexo, carcinoma tubulopapilar simples, carcinoma sólido simples, carcinoma anaplásico simples, carcinoma de célula escamosa, carcinoma mucoso, carcinoma lipídico, fibrosarcoma, osteosarcoma, carcinosarcomas e carcinoma ou sarcoma em tumor benigno (Misdorp et al., 1999).

Os tumores benignos podem ser classificados como adenoma simples, adenoma complexo, adenoma basalóide, fibroadenoma de baixa celularidade,

fibroadenoma de elevada celularidade, tumor misto benigno e papiloma ductal (Misdorp et al., 1999).

Tumores como osteosarcoma, condrosarcoma, fibrosarcoma e liposarcomas ocorrem com baixa frequência em glândulas mamárias de cães (Jones et al., 2000).

2.1.5. Diagnóstico das neoplasias mamárias

Segundo Peleteiro (1994), o diagnóstico dos tumores de mama em cadelas compreende três etapas: o clínico, o citológico e o histopatológico.

O diagnóstico clínico deve basear-se no histórico do animal, onde não falte informações acerca da data de início da lesão, velocidade de crescimento, manifestações de prurido, eliminação de secreção e ainda dados sobre o comportamento sexual do animal. A palpação permite a identificação de tumores a partir de 0,5 cm, consistindo de nódulos firmes contrastando com o parênquima maleável da glândula mamária, sendo que todas as glândulas devem ser cuidadosamente palpadas, assim também como os linfonodos regionais. Também deve incluir radiografias torácicas, que devem ser realizadas mesmo que não haja suspeitas de metástase pulmonar. Só assim é possível indicar com alguma segurança qual a fase evolutiva em que o processo se encontra (Peleteiro, 1994).

Em comparação com a oncologia humana, o diagnóstico citológico em cadelas é pouco explorado, porém a citologia aspirativa constitui-se técnica auxiliar de diagnóstico que não deve ser descartada, especialmente quando se trata da avaliação de lesões clinicamente suspeitas (Peleteiro, 1994).

O diagnóstico histopatológico é fundamental para correta apreciação de qualquer lesão suspeita de neoplasia mamária, quer seja efetuado sobre o próprio tumor retirado cirurgicamente ou sobre um fragmento de biópsia cirúrgica. Em medicina veterinária, visto que o tratamento cirúrgico continua sendo o mais praticado, o diagnóstico histopatológico é geralmente realizado sobre a totalidade do tumor, não se justificando a realização de biópsia, exceto em casos particulares para os quais a cirurgia não está recomendada. Assim, a biópsia é feita para confirmar uma lesão neoplásica e, se possível, para colher indicações sobre o grau de malignidade que permita emitir um prognóstico (Peleteiro, 1994).

2.1.6. Tratamento das neoplasias mamárias

O diagnóstico precoce e a terapia rápida e adequada são necessários para prevenir metástases locais e à distância. As opções de tratamento dependem do estágio em que se encontra o tumor e incluem a excisão cirúrgica, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia ou uma combinação desses tratamentos (Novosad, 2003).

A intervenção cirúrgica é o tratamento mais comum, especialmente em nódulos pequenos e localizados (Sorribas, 1995). Segundo Allen & Mahaffey (1989) os procedimentos cirúrgicos são classificados em: lumpectomia (remoção apenas do nódulo tumoral), mastectomia simples (remoção apenas da glândula afetada), mastectomia regional (remoção da glândula afetada e de glândulas adjacentes), mastectomia unilateral (remoção de todas as glândulas homolaterais) e mastectomia bilateral (remoção de ambas as cadeias mamárias).

Grande parte dos procedimentos cirúrgicos é escolhida com base na drenagem linfática das glândulas mamárias, ou seja, se as glândulas torácicas cranial e caudal apresentarem tumor, então essas e a glândula abdominal cranial serão removidas; se as glândulas abdominais caudal e a inguinal forem acometidas, ambas serão removidas. Porém, se a glândula abdominal cranial apresentar tumor, deve-se fazer a mastectomia unilateral, já que ela drena, simultaneamente, para o linfonodo axilar acessório e para o inguinal superficial (Mccaw, 1993).

O avanço da quimioterapia tem sido lento em medicina veterinária devido ao alto custo, dificuldade de administração e os numerosos efeitos secundários, como trombocitopenia, linfopenia, anorexia, náuseas e vômitos (Brodey et al., 1983). As drogas quimioterápicas atuam sobre as células que estão em divisão ativa, sem discriminar entre as normais e as neoplásicas, por isso é necessário monitoramento constante do paciente. Ciclofosfamida, fluorouracil e doxorubicina são exemplos de drogas usadas como quimioterápicos (Sorribas, 1995).

Assim como na quimioterapia, não se têm informações precisas sobre a validade da radioterapia no tratamento de neoplasias mamárias em cadelas (Brodey et al., 1983). Além disso, o alto custo, as dificuldades de aplicação e os resultados incertos limitam o seu uso na medicina veterinária (Sorribas, 1995).

A imunoterapia é um método terapêutico em que há a estimulação das reações imunológicas do hospedeiro, com o objetivo de provocar resposta às células tumorais. Podem-se utilizar antígenos específicos do tumor que podem ser células

vivas, inativadas ou modificadas, assim como imunostimulantes inespecíficos como aplicação intravenosa de BCG (Bacilo Calmette-Guérin) ou vacinas de *Corynebacterium parvum* (Brodey et al., 1983; Sorribas, 1995).

Como receptores para estrógeno são encontrados em muitos tumores mamários, a terapia anti hormonal pode ser benéfica, porém, ainda não há estudos controlados relatando esse tipo de tratamento em medicina veterinária, devido a sua complexidade e ao alto custo das análises para a determinação desses receptores (Brodey et al., 1983; Sorribas, 1995).

2.1.7. Prognóstico

Os elementos de prognóstico nos tumores mamários estão representados por sinais objetivos que permitem prever, razoavelmente, as características evolutivas do tumor e, eventualmente, avaliar as respostas aos tratamentos. O prognóstico em cães varia de acordo com os seguintes fatores: tipo histológico, grau de invasão, grau de diferenciação, envolvimento dos linfonodos, atividade de receptores hormonais e a presença de ulceração (Hedlund, 2002).

2.2. Proteínas de choque térmico

2.2.1. Resposta celular ao estresse

As células e tecidos estão em constantes alterações quando expostos a condições extremas que causam estresse agudo ou crônico. Conseqüentemente, para que haja uma sobrevivência é necessária uma evolução da resposta celular para detectar, monitorar e responder a essas alterações. A exposição prolongada ao estresse interfere na eficiência do funcionamento celular, com conseqüências negativas nas propriedades bioquímicas das proteínas que, sob condições ideais existem em um estado termodinamicamente estável. Em um ambiente hostil, essas proteínas podem ser encontradas desnaturadas, numa configuração incorreta ou então agregadas, tudo isso alterando a sua homeostase, levando a uma resposta inicialmente denominada “resposta ao choque térmico” (HSR), onde há uma elevada síntese das “proteínas de choque térmico” (HSP) que reparam os danos protéicos e garantem a recuperação celular (Morimoto, 1998). Na maiorias das situações, essa

resposta é benéfica para o organismo, mas algumas vezes, como por exemplo, no câncer as células utilizam-se dessas moléculas como um mecanismo defensivo que acaba interferindo em algumas terapias (Grover, 2002).

Em 1962, descobriu-se que a exposição de células da glândula salivar de *Drosophila melanogaster* ao calor produzia o surgimento de um novo padrão de espessamento em cromossomos, que representavam sítios específicos de transcrição para a síntese de proteínas, por essa razão o nome “Resposta ao Choque Térmico” (Ritossa, 1962). Porém, somente em 1974, demonstrou-se que o estresse térmico induzia a expressão de genes, até então quiescentes, que permitiam as células “estressadas” sintetizar uma grande quantidade de determinado grupo de proteínas, que foram denominadas “Proteínas de Choque Térmico” ou HSP (heat shock protein) (Tissières et al., 1974). Posteriormente, mostrou-se que além do calor, a resposta ao choque térmico também é induzida quando as células são expostas a outros desafios, incluindo anoxia, isquemia, etanol, nicotina, metais pesados e agentes virais (Lindquist, 1986; Welch, 1992). Consequentemente, o termo “heat shock protein”, apesar de consagrado, não é o mais apropriado baseado no fato de que muitos agentes ou tratamentos deletérios resultam numa similar alteração na expressão gênica. Assim, a melhor nomenclatura seria “proteína de estresse” (Whitley et al., 1999). Muitos desses agentes/tratamentos que induzem tal resposta têm a propriedade de serem “cátropos protéicos”, ou seja, afetam a conformação e consequentemente a função das proteínas (Minowada & Welch, 1995).

Verificou-se, posteriormente, que a HSR era um acontecimento praticamente universal entre todos os seres vivos. Os genes que codificam para as HSPs são encontrados em todos os organismos desde bactérias até plantas e mamíferos, além de serem altamente conservados, demonstrando baixa variação da região codificadora entre as espécies. A similaridade dos seus aminoácidos entre a *Escherichia coli* e a *Drosophila melanogaster* e entre a *Drosophila melanogaster* e o *Homo sapiens* é de aproximadamente 70%. Essa baixa variação genética e sua presença desde procariotos até eucariotos sugerem uma grande importância dessas moléculas durante a evolução e um papel na proteção das células durante e após o estresse (Lindquist, 1986).

Embora implicadas na proteção celular contra efeitos adversos, mostrou-se que as HSPs não são induzidas apenas em condições de estresse. Praticamente todas elas são expressas constitutivamente, isto é, em células sob condições normais de

crescimento (cerca de 5-10% do volume total protéico), onde participam de processos fisiológicos básicos como o ciclo, a proliferação e a diferenciação celulares, tendo como função a manutenção da homeostase protéica (Craig, 1985; Lindquist, 1986; Lindquist & Craig, 1988; Fuller et al., 1994). Além disso, seu grau de expressão parece ser dependente da atividade metabólica celular, ou seja, o aumento na expressão de HSP ocorre provavelmente devido ao aumento na demanda celular por síntese protéica e eventos secretórios (Welch, 1992).

2.2.2. Proteínas de estresse

As HSPs são agrupadas em famílias: HSP 27, HSP 40, HSP 60, HSP 70, HSP 90 e HSP 110, de acordo com suas seqüências de aminoácidos e com seus pesos moleculares (em Kd), determinados pelo método SDS PAGE (gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio) e podem estar presentes no citoplasma, mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo (Jäättelä & Wissing, 1992; Welch, 1992).

HSP 70

A família HSP 70 é altamente conservada e demonstra de 60 a 78% de identidade entre suas seqüências nas células eucariotas e de 40 a 60% de identidade entre células eucariotas e a *Escherichia coli* (Craig, 1985; Lindquist, 1986). As proteínas pertencentes a essa família são conhecidas pela habilidade de se ligarem a cadeias peptídicas, desempenhando as seguintes funções: proteção de proteínas “nascentes”, transporte de proteínas através de membranas, remontagem de proteínas desnaturadas e degradação protéica (Becker & Craig, 1994).

As formas de HSPs 70 que estão presentes tanto no citoplasma quanto no núcleo celular são frequentemente chamadas de HSP 72 e HSP 73. A proteína HSP 73 é sintetizada constitutivamente em todas as células de mamíferos, sendo então denominada como HSP 70 constitutiva. Já a síntese da HSP 72 é restrita a células que passaram por algum estresse, conseqüentemente é referida como a forma induzida da HSP 70. Essas duas proteínas exibem seqüências extremamente homólogas (95%) e propriedades bioquímicas similares. Ainda pertencem a esse grupo a GRP 78 ou BIP, encontrada no retículo endoplasmático e a GRP 75, presente na mitocôndria (Craig, 1985).

O principal mecanismo de ação das HSPs, mediante o qual conferem proteção, seria o de atuarem como “chaperonas” moleculares. Chaperona, expressão inexistente em português, serve para designar moléculas que, sem fazer parte da estrutura final das proteínas, evitam interações incorretas entre estas, auxiliam na montagem final das mesmas, bem como em sua síntese, dobramento e degradação (Ellis, 1987).

As proteínas funcionais intracelulares estão normalmente presentes em suas formas nativas, completamente dobradas. Entretanto, processos vitais da biogênese protéica, tais como a sua síntese e sua transmigração para os compartimentos intracelulares requerem que a proteína exista, temporariamente, em conformação desdobrada ou parcialmente dobrada (Alberts et al., 2004).

Em condições normais, os polipeptídeos corretamente dobrados têm as porções hidrofóbicas de seus aminoácidos voltadas para o interior da molécula, ao passo que os componentes hidrofílicos voltam-se para o exterior. Isto possibilita solubilidade em meio aquoso e impede agregação, que de outro modo ocorreria pela interação das áreas hidrofóbicas expostas com aquelas de outras moléculas. Se a proteína estivesse desdobrada (o que ocorre em determinadas fases de sua síntese e transporte entre organelas), agregações indevidas poderiam existir, levando à perda destes polipeptídeos (Alberts et al., 2004). As proteínas HSPs atuam evitando tais interações aleatórias até que o término do processo de dobramento ocorra e a proteína adquira resistência (Jolly & Morimoto, 2000). Na medida em que o choque térmico e outras condições estressantes causam um efeito de desdobramento parcial das proteínas celulares, a capacidade das HSPs de proteger as células contra os efeitos adversos do estresse torna-se uma extensão lógica de sua função normal como chaperonas (Becker & Craig, 1994).

Vários estudos têm demonstrado que a citoproteção induzida pela HSPs pode também ser atribuída parcialmente à supressão da apoptose (Samali & Orrenius, 1998), porém, o preciso mecanismo desse efeito ainda precisa ser esclarecido. Uma evidência adicional que confirma a relação entre a citoproteção e a resistência a apoptose é o fato de que células que apresentam falhas ao responder ao stress são sensíveis à morte celular via apoptose (Sreedhar et al., 1999).

2.2.3. HSPs no câncer

Células tumorais parecem ser dependentes do nível elevado das HSPs já que o aumento na expressão dessas proteínas tem sido observado em muitas neoplasias, como por exemplo, no câncer de mama em mulheres e cadelas, que apresentaram alto nível de HSP 70 e HSP 90 (Kumaraguruparan et al., 2006; Romanucci et al., 2006). Um estudo comprovou que a redução dessa proteína resulta em massiva morte de células tumorais, sendo observado inclusive em carcinoma mamário humano. Isso indica que a alta expressão de HSP 72 é um pré-requisito para a sobrevivência da célula neoplásica em humanos (Nylandsted et al., 2000).

A expressão das HSPs ocorre em resposta a diversos insultos e o sinal que dispara essa indução está relacionado com o acúmulo de proteínas desnaturadas no interior da célula (Ananthan et al., 1986). Porém, ainda não foi esclarecido o motivo pelo qual essas proteínas têm sua expressão aumentada no câncer. Uma hipótese é de que as células cancerosas têm uma vida “estressante” devido à falta de nutrientes, de oxigênio e espaço limitado, fatores que são importantes na indução de um grande número de HSPs (Söti & Csermely, 1998).

No câncer, as proteínas de choque térmico estão envolvidas em vários aspectos: participam da dobragem de numerosos produtos de proto-oncogenes e oncogenes, interagem com a proteína p53 mutante e tem papel importante na proteção celular contra apoptose (Wei et al., 1995; Samali & Orrenius, 1998), apesar de não se saber ao certo qual seria o mecanismo exato onde essas proteínas atuariam.

Outro ponto importante é o fato de que muitas HSPs estão relacionadas com o prognóstico e a resposta a determinados tratamentos de alguns tipos de câncer, como exemplo pode-se citar a HSP 70, cuja expressão está associada à ocorrência de metástase, a um prognóstico reservado e a resistência a quimioterápicos no câncer de mama (Ciocca et al., 1993; Liu et al., 1996; Vargas Roig et al., 1998).

Implicações no tratamento

As proteínas de choque térmico por terem implicação na progressão e na resposta tumoral a algumas terapias, têm sido alvo de pesquisas relacionadas ao seu uso em estratégias de tratamento. Pesquisas já em andamento baseiam-se no uso de agentes que interferem com o nível celular ou com a funcionalidade das HSPs e no

uso dessas proteínas em vacinas, explorando sua habilidade de agir como adjuvantes na indução de uma resposta imune anti tumoral (Sõti, 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto que originou este trabalho foi submetido à Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa e aprovado sob processo de número 15/2005.

Foram usados nesse estudo 23 amostras de tecido mamário provenientes de cadelas atendidas na rotina cirúrgica do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa que apresentaram neoplasia mamária, no período de março a agosto de 2005. A partir das fichas desses animais, foram coletados os seguintes dados: raça, idade ao diagnóstico, glândulas mamárias acometidas e diagnóstico histopatológico da lesão.

Ainda foram realizadas biópsias em tecido mamário de três cadelas, clinicamente sadias, provenientes do canil experimental do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, totalizando 11 amostras utilizadas como controle.

3.1. Coleta das amostras

Após jejum hídrico e sólido de 12 horas, todos os animais foram sedados com Acepromazina¹ na dose de 0,1 mg por Kg de peso vivo, por via intravenosa. Os animais foram anestesiados com Tiopental² sódico na dose de 12,5 mg por Kg de peso vivo e mantidos com Halotano³ a 3 %, sendo este o protocolo de rotina do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

¹Acepran® 1% - Univet S.A. Indústria Veterinária.

²Tiopental® 1g - Abbott Laboratório do Brasil Ltda.

³Halotano® - Hoechst do Brasil Química e Farmacêutica S.A.

Foram coletadas amostras de tecido mamário tanto dos animais que apresentavam a patologia, quanto dos animais hígidos usados como controle. Todas essas amostras foram divididas em duas partes: uma destinada à análise histopatológica e a outra à detecção de HSP 72. Após isso os animais foram encaminhados para seus proprietários sendo estes devidamente orientados quanto ao pós-operatório e todas as análises experimentais foram realizadas em laboratório.

3.2. Processamento e análise histopatológica

A análise histopatológica foi realizada no setor de Histopatologia do Hospital Veterinário da UFV, sendo os fragmentos fixados em formol 10% por 24 horas; em seguida as amostras foram desidratadas em um banho em álcool a 90%, por duas horas e em dois banhos em álcool 100% por duas horas cada. Logo após, as amostras foram diafanizadas em dois banhos sucessivos em xilol por uma hora cada.

As amostras foram então cortadas em micrótomo calibrado para cortes de 5 micras, coradas pela técnica rotineira de hematoxilina-eosina e analisados em microscópio de luz.

Densidade celular no esfregaço, arquitetura das células, dimensões nucleares, padrões de distribuição de cromatina, figuras de mitoses e número de nucléolos, foram os parâmetros utilizados para determinar a presença de neoplasia, posteriormente classificadas de acordo com o proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Misdorp et al., 1999).

3.3. Identificação de HSP 72 nos tecidos mamários

As amostras foram envolvidas individualmente em papel alumínio e plástico, identificadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas no freezer a – 80°C para análise posterior. As análises para identificação de HSP 72 no tecido mamário foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas – BIOAGRO/UFV, usando o anticorpo Monoclonal Anti-Heat Shock Protein 70 (HSP 70) preparado contra HSP 70 de ratos (SIGMA).

Extração das proteínas – As amostras foram retiradas do freezer, pesadas, maceradas com nitrogênio líquido e homogeneizadas com o tampão de extração (15

mM Tris HCL - pH 7,5; 600 mM de NaCl; 1mM PMSF), na relação de 1:10. Em seguida, as amostras foram colocadas em microtúbulos, os quais foram identificados e mantidos em gelo por aproximadamente 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas em 14.000 g, a 4° C, durante 20 minutos para a retirada do precipitado (restos celulares) e o sobrenadante foi armazenado no refrigerador a – 20° C.

Quantificação da amostra – Os extratos de proteínas totais foram quantificados de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando-se as três réplicas preconizadas.

Eletroforese SDS-PAGE – Eletroforese em géis de poliacrilamida (PAGE) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) foi realizada essencialmente como descrita por LAEMMLI (1970). O extrato protéico, contendo 60 µg de proteína, foi incubado por 5 minutos, a 100°C, em tampão da amostra (glicerol 10% (v/v), SDS 2,3%, azul-de-bromofenol 0,25%, 2-mercaptoetanol 5% (v/v) e Tris-HCl 0,0625 mol/L, pH 6,8) antes de ser aplicado no gel. Em cada gel foram colocadas amostras de tumores malignos, benignos e tecido mamário normal. A eletroforese foi conduzida por aproximadamente 16 horas, a 48V, no tampão de corrida (Tris-HCl 0,025 mol/L, glicina 0,2 mol/L, EDTA 1 mmol/L e SDS 3,5 mmol/L). Este procedimento foi realizado para a obtenção de dois géis. Um deles foi corado com solução corante [metanol 40% (v/v), CH₃COOH 7,5% (v/v) e “coomassie brilliant blue” R-250 0,01%], por aproximadamente 12 horas, e descorado em solução de metanol 10% (v/v) e ácido acético 7,5% (v/v). O outro gel foi submetido à técnica de imunoblotting e sondado com Monoclonal Anti-Heat Shock Protein 70 contra HSP 72.

Imunoblotting – As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, usando-se o sistema de transferência da BIORAD (EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Após a transferência (em aproximadamente uma hora a 0,70 Amperes constantes), a membrana de nitrocelulose foi imersa em solução de bloqueio (non-fat dry milk – BIORAD) por uma hora e, em seguida, foram feitas quatro lavagens, por 15 minutos cada, à temperatura ambiente, com TBS-T [Tris-HCl 0,01 mol/L, pH 7,6, NaCl 1,5 mmol/L, Tween-20 0,1% (v/v)] sendo depois

incubada com o anticorpo Monoclonal Anti-Heat Shock Protein 70 (SIGMA), numa diluição 1:5.000 por três horas sob agitação. Após o período de incubação, a membrana foi lavada com TBS-T quatro vezes, por 15 minutos cada, e em seguida incubada com o anticorpo Anti-Mouse IgG (fosfatase alcalina - SIGMA), numa diluição de 1:10.000, por aproximadamente duas horas. A membrana foi lavada extensivamente com TBS-T, novamente por quatro vezes de 15 minutos cada, e subseqüentemente, incubada com tampão da enzima (Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 9,8, NaCl 0,1 mol/L, MgCl₂ 0,5 mol/L) por dez minutos. A atividade da fosfatase alcalina foi detectada, usando-se os substratos NBT (azul-nitro-tetrazolium, GIBCO/BRL) e BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, GIBCO/BRL).

3.4. Análise estatística

Os dados foram analisados por meio de construção de tabelas de frequência e a comparação entre as proporções das variáveis pesquisadas, pelo teste de Qui-quadrado (χ^2), utilizando um nível de significância de 5%. As análises foram realizadas no programa BioEstat, versão 2.0 (AYRES *et al.*, 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação histopatológica

As 11 amostras coletadas do tecido mamário normal foram caracterizadas como glandular exócrino composto, tubulo-acinoso misto, estando de acordo com a descrição de Frandson (1979).

Foram verificados e classificados, por análise histopatológica, 23 fragmentos mamários com alterações, provenientes de 13 animais atendidos no Hospital Veterinário da UFV, no período de março a agosto de 2005.

Os animais pesquisados neste estudo pertenciam a 10 raças, incluindo o grupo classificado como sem raça definida (SRD), distribuídos segundo a Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição dos animais pesquisados em relação ao tumor de mama, segundo a raça, Hospital Veterinário, DVT/UFV, março a agosto 2005.

Raça	Número de Animais	Frequência (%)
Sem raça definida (SRD)	3	23,0 a
Pastor Alemão	2	15,4 b
Beagle	1	7,7 b
Boxer	1	7,7 b
Cocker Spaniel	1	7,7 b
Doberman	1	7,7 b
Maltês	1	7,7 b
Pastor Canadense	1	7,7 b
Pinscher	1	7,7 b
Poodle	1	7,7 b
Total	13	100

Nota: letras diferentes na coluna indicam diferença ao nível de 5% de significância.

Dos 13 animais pesquisados, observou-se que 23% deles era constituída de animais mestiços, sendo caracterizados como sem raça definida (SRD) e que 10 animais (77%) pertenciam a alguma raça pura.

A análise da tabela 1 indicou não haver diferença entre as freqüências de animais com neoplasia mamária segundo a raça ($p > 0,05$; GL=9), sendo que apenas os animais sem raça definida (SRD) apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados às demais raças ($p < 0,05$; GL=9).

Como pode ser observado na tabela 1, os animais SRD foram os que tiveram uma maior ocorrência dentro do grupo, porém não foi possível estabelecer uma raça específica na qual houve um maior número de casos, conforme observado por Moulton et al (1970) e Peleteiro (1994), que afirmaram não haver uma predisposição racial para as neoplasias mamárias.

A distribuição de casos segundo a faixa etária indicou maior concentração de casos em animais com idade de 8 a 13 anos (84,6%) ($p < 0,05$; GL=1), sendo que não foram encontrados casos em animais com idade superior a 14 anos (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição dos animais pesquisados em relação ao tumor de mama, segundo a idade ao diagnóstico, Hospital Veterinário, DVT/UFV, março a agosto de 2005.

Faixas Etárias (anos)	Número de Animais	Freqüência (%)
02 - 07	2	15,4 a
08 - 13	11	84,6 b
Total	13	100

Nota: letras diferentes na coluna indicam diferença ao nível de 5% de significância.

Tais resultados estão de acordo com Moulton et al (1970) e Peleteiro (1994) ao afirmarem que a idade é um fator importante nas neoplasias mamárias, estipulando como uma faixa etária de concentração os animais com idade de 6 a 12 anos, relatando menor freqüência desses tumores em cadelas com idade inferior a 6 e superior a 12 anos.

Conforme a Tabela 3, as glândulas inguinais apresentaram as maiores proporções de acometimento (43,5%), entretanto não houve diferença quando as diferentes glândulas foram comparadas entre si ($p > 0,05$; GL=4).

Tabela 3 - Distribuição dos resultados em relação ao tumor de mama, segundo a glândula mamária acometida, Hospital Veterinário, DVT/UFV, março a agosto de 2005.

Glândula Acometida	Número de Glândulas	Frequência (%)
Torácica Cranial	-	-
Torácica Caudal	2	8,7 a
Abdominal Cranial	5	21,7 a
Abdominal Caudal	6	26,1 a
Inguinal	10	43,5 a
Total	23	100

Nota: letras diferentes na coluna indicam diferença ao nível de 5% de significância.

Optou-se também por fazer uma análise com as glândulas abdominais caudais e inguinais agrupadas, totalizando 69,6% dos casos (Tabela 4). Nessa segunda análise, verificou-se diferença quando tais glândulas foram comparadas com as demais ($p < 0,05$; GL=3).

Tabela 4 - Distribuição dos resultados em relação ao tumor de mama, segundo a glândula mamária acometida, Hospital Veterinário, DVT/UFV, março a agosto de 2005.

Glândula Acometida	Número de Glândulas	Frequência (%)
Torácica Cranial	-	-
Torácica Caudal	2	8,7 a
Abdominal Cranial	5	21,7 a
Abdominal Caudal e Inguinal	16	69,6 b
Total	23	100

Nota: letras diferentes na coluna indicam diferença ao nível de 5% de significância.

Esses dados confirmam os relatos de Moulton et al (1970) e Brodey et al (1983) que observaram maior tendência dos tumores a se desenvolverem nas glândulas localizadas mais caudalmente e relacionaram tal fato à maior quantidade de parênquima glandular nestas mamas.

Segundo os resultados do diagnóstico histopatológico os tumores foram inicialmente classificados em malignos e benignos (Figuras 2 e 3), obtendo-se as frequências de 52,2% e 47,8% respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição dos resultados em relação ao tumor de mama, segundo classificação histopatológica, Hospital Veterinário, DVT/UFV, março a agosto de 2005.

Classificação		
Histopatológica	Número de Tumores	Frequência (%)
Neoplasia Maligna	12	52,2 a
Neoplasia Benigna	11	47,8 a
Total	23	100

Nota: letras diferentes na coluna indicam diferença ao nível de 5% de significância.

A análise desta tabela mostrou uma igualdade estatística entre as duas classificações ($p > 0,05$; GL=1), conforme reportado por Allen et al (1986), Allen & Mahaffey et al (1989) e Peleteiro (1994), que estabeleceram uma frequência de malignidade entre esses tumores de 50%.

A tabela 6 mostra os tipos de neoplasias encontradas nas amostras coletadas das glândulas alteradas desses animais, classificadas de acordo com a OMS (1999). A análise estatística indicou não haver diferença entre os diferentes tipos histológicos ($p > 0,05$; GL=7).

Tabela 6 – Distribuição dos resultados em relação ao tumor de mama, segundo classificação histopatológica, Hospital Veterinário, DVT/UFV, março a agosto de 2005.

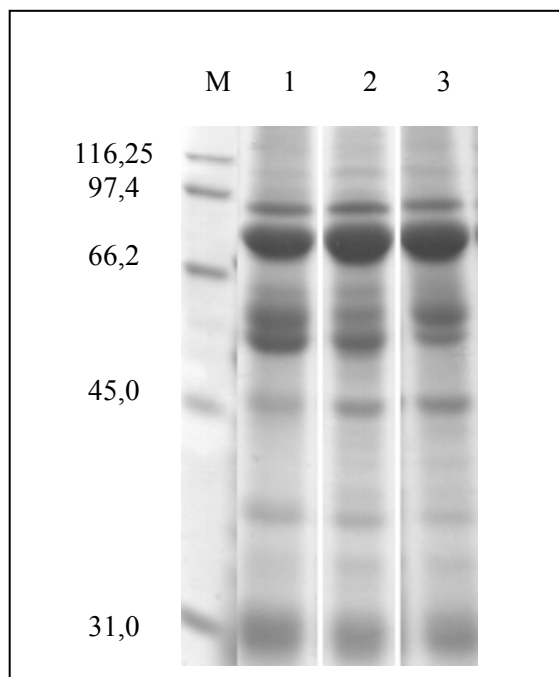
Classificação histopatológica	Número de Tumores	Frequência (%)
Carcinoma Simples	5	21,7 a
Adenoma Complexo	5	21,7 a
Tumor Misto Benigno	5	21,7 a
Carcinosarcoma	3	13,0 a
Carcinoma Complexo	2	8,7 a
Carcinoma <i>in situ</i>	1	4,4 a
Adenoma simples	1	4,4 a
Osteossarcoma	1	4,4 a
Total	23	100

Nota: letras diferentes na coluna indicam diferença ao nível de 5% de significância.

4.2. Expressão de HSP 72

Com a finalidade de pesquisar a presença de proteínas HSP 72 em tumores mamários de cadelas, proteínas totais de tecidos mamários (Figura 1A) foram sondadas com o anticorpo monoclonal anti-HSP 72 de ratos. Este anticorpo reconheceu especificamente duas proteínas que migraram com uma massa molecular aparente de aproximadamente 70 kDa, identificadas imunologicamente como sendo as proteínas HSP 72 e HSP 73 de cães. Um resultado representativo da expressão da HSP 73 e HSP 72 em neoplasia mamária maligna, benigna e tecido normal é apresentado na Figura 4 B.

A



B



Figura 1. Expressão de HSP 72 e 73 em tecido mamário de cadelas. Quantidades similares de proteínas totais extraídas de tumor mamário maligno (1), tumor mamário benigno (2) e tecido mamário normal (3) foram separadas por SDS-PAGE e visualizadas por Coomassie (A) ou transferidas para membrana de nitrocelulose e sondadas com o anticorpo anti-HSP 70 (B).

Consistente com um padrão de expressão constitutivo, a proteína HSP 73 foi identificada em todas as amostras de tecidos analisadas, enquanto que a expressão da HSP 72 ocorreu de forma mais acentuada nos tecidos neoplásicos (canaletas 1 e 2), não sendo visualizada no tecido mamário normal (canaleta 3) (Figura 1B).

Os resultados da expressão de HSP 72 nos tecidos mamários normais e neoplásicos do presente estudo são apresentados na Tabela 7 e 8.

Tabela 7 - Expressão de HSP 72 em tecido mamário neoplásico e normal.

Classificação Histopatológica	Nº amostras/Expressão de HSP 72	% animais com indução
Tecido neoplásico	23/15	65,2
Tecido normal	11/2	18,2

Estes resultados indicam que uma grande proporção das amostras neoplásicas apresentou expressão de HSP 72 (65,2%), enquanto apenas 18,2% das amostras normais apresentaram níveis elevados dessa proteína. Uma vez que essa expressão é induzida em resposta a diversas condições de estresses fisiológicos, como citado por Lindquist & Craig (1988) e Fuller et al (1994), provavelmente os níveis elevados de HSP 72 em amostras de tecidos mamários normais sejam um indicativo de um desequilíbrio homeostático nestas células, não provenientes do processo de carcinogênese.

A relação da classificação histopatológica com a expressão da proteína HSP 72 indicou uma equivalência entre tumores malignos e benignos (66,6% e 63,6% respectivamente), sugerindo não haver ligação entre o tipo histopatológico e a indução dessa proteína (Tabela 8).

Tabela 8 - Expressão de HSP 72 em tecido mamário neoplásico

Classificação Histopatológica	Nº amostras/Expressão de HSP 72	% animais com indução
Neoplasia Maligna	12/8	66,6
Neoplasia Benigna	11/7	63,6

Conforme Kumaraguruparan et al (2006) e Romanucci et al (2006), elevados níveis de HSP 72 têm sido observados em diversas condições de neoplasia humana, incluindo tumores mamários e, mais recentemente, também em neoplasia canina de glândulas mamárias. De fato, elevados níveis de proteínas da família de HSP 70 em células tumorais têm sido associados com a função dessas chaperonas em atividades proliferativas de células ou em condições de estresses do microambiente celular, como hipóxia, impostas pelo desenvolvimento de neoplasia, de acordo com Söti e Csermely (1998). Entretanto, os resultados apresentados nesta investigação não

confirmaram o potencial da HSP 72 como alvo para terapias ou prognóstico da doença em cães, devido à falta de uma correlação absoluta entre sua expressão e os tecidos apresentando neoplasia. Apesar disso, a tendência observada para indução de HSP 72 em tecidos tumorais caninos sugere um envolvimento da proteína no processo de carcinogênese, conforme observado em tumores de glândulas mamárias humanas.

5. CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado esse estudo e de acordo com os objetivos propostos, é possível concluir que:

- A faixa etária das cadelas que apresentou um maior número de casos de tumor mamário à época do diagnóstico foi a de animais entre 8 e 13 anos de idade.
- Não foi possível estabelecer uma raça específica na qual houve um maior número de casos, sendo os animais sem raça definida os mais acometidos.
- As glândulas mamárias abdominais caudais e inguinais foram as mais acometidas.
- A incidência de neoplasias malignas e benignas foi estatisticamente igual.
- Não se observou diferença significativa entre os diferentes tipos histológicos encontrados.
- A expressão da proteína HSP 72 foi comprovada através da técnica empregada, tanto em tecido mamário normal quanto neoplásico.
- Tecidos neoplásicos apresentaram uma maior proporção de expressão da proteína HSP 72 quando comparados ao tecido normal.
- Observou-se equivalência entre tumores benignos e malignos quanto a expressão da HSP 72.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Proteínas. In: ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.129-88.

ALLEN, S. W.; PRASSE, K. W.; MAHAFFEY, E. A. Cytologic Differentiation of benign from malignant canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.23, n.6, p.649-55, 1986.

ALLEN, S. W.; MAHAFFEY, E. A. Canine mammary neoplasia: prognostic indicators and response to surgical therapy. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.25, p.540-6, 1989.

ANANTHAN, J.; GOLDBERG, A. L.; VOELLMY, R. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of the heat shock genes. **Science**, v.232, n.4749, p.522-24, 1986.

AYRES, M., AYRES JÚNIOR, M., AYRES, D. L., SANTOS, A. S. BioEstat 2.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém/Brasília: Sociedade Civil Mamirauá/ CNPq, 2000. 272p.

BECKER, J.; CRAIG, E. A. Heat shock proteins as molecular chaperones. **European Journal of Biochemistry**, v.219, n.1-2, p.11-23, 1994.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.171, p.248-254, 1976.

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

CIOCCA, D.R.; CLARK, G.M.; TANDON, A.K.; et al. Heat shock protein hsp 70 in patients with axillary lymph node negative breast cancer: prognostic implications. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, p. 570-4, 1993.

COTCHIN, E. Mammary neoplasms of the bitch. **Journal Comparative Pathology**, v.68, n.1, p.1-22, 1958.

CRAIG, E. A. The heat shock response. **CRC Critical Reviews in Biochemistry**, v.18, n.3, p.239-80, 1985.

ELLIS, R. J. Proteins as molecular chaperones. **Nature**, v.328, n.6129, p.378-9,1987.

FILHO, G. B.; GUIMARÃES, R. C.; BOGLIOLO, L. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: FILHO, G. B. **Patologia Geral**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1998. p.148-92.

FRANDSON, R. D. Anatomia das glândulas mamárias. In: FRANDSON, R. D. **Anatomia e Fisiologia dos Animais Domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. p.366-73.

FONSECA, S. C. **Avaliação dos níveis séricos de 17, β -estradiol e progesterona em cadelas portadoras de neoplasias mamárias**. 1998. 87f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

FULLER, K. J.; ISSELS, R. D.; SLOSMAN, D. O. Cancer and the heat shock response. **European Journal of Cancer**, v.30, n.12, p.1884-91, 1994.

GROVER, A. Molecular biology of stress responses. **Cell Stress e Chaperones**, v.7, n.1, p.1-5, 2002.

HEDLUND, C. S. Cirurgia dos Sistemas Reprodutivo e Genital. In: FOSSUM, T.W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. São Paulo: Rocca Ltda, 2002. p. 571-637.

JÄÄTTELÄ, M.; WISSING, D. Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. **Annals of Medicine**, v.24, n.4, p.249-58, 1992.

JOLLY, C.; MORIMOTO, R. I. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. **Journal of the National Cancer Institute**, v.92, n.19, p.1564-72, 2000.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. Sistema genital. In: JONES, T. C.; HUNT, R. D.; HKING, N. W. **Patologia Veterinária**. São Paulo, Manole, 2000. p.1169-1244.

KOLB, E. Fisiologia da glândula mamária. In KOLB, E. **Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. p.413-4.

KUMARAGURUPARAN, R.; KARUNAGARAN, D.; BALACHANDRAN, C.; et al. Of humans and canines: A comparative evaluation of heat shock and apoptosis-associated proteins in mammary tumors. **Clinica Chimica Acta**, v.365, n.1-2, p.168-76, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-695, 1970.

LINDQUIST, S. The heat shock response. **Annual Review of Biochemistry**, v.55, p.1151-191, 1986.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat shock proteins. **Annual Review of Genetics**, v.22, p.631-77, 1988.

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

McCAW, D. L. Diseases of the mammary gland. In: BOJRAB, M. J. **Disease Mechanisms in Small Animal Surgery**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993. p.184-6.

MINOWADA, G.; WELCH, W. J. Clinical implications of the stress response. **The Journal of Clinical Investigation**, v.95, n.1, p.3-12, 1995.

MISDORP, W ; ELSE, W.R. ; HELLMEM, E ; LIPSCOMB, T.P. **Histopatological classification of mammary tumors of the dog and the cat** – World Health Organization – Internacional histological classification of tumors of domestic animals - Second series, vol. 7, Washington, DC, 59 p, 1999.

MORIMOTO, R. I. Regulation of heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones and negative regulators. **Genes e Development**, v.12, n.24, p.3788-796, 1998.

MOULTON, J. E.; TAYLOR, D. O. N.; DORN, C. R.; ANDERSEN, A. C. Canine mammary tumors. **Pathology Veterinary**, v.7, n.4, p.289-320, 1970.

MOULTON, J. E. Tumors of the mammary gland. In: MOULTON, J. E. **Tumors in Domestic Animals**. California: University of California Press, 1990. p. 518-549.

NYLANDSTED, J.; BRAND, K.; JÄÄTTELÄ, M. **Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells**, v.926, p.122-25, 2000.

NOVOSAD, C.A. Principles of treatment for mammary gland tumors. **Clinical Technical Small Animals Practice**, v.18, n.2, p.107-9, 2003.

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

RITOSSA, F. A. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**, v.18, n.12, p.571-73, 1962.

ROMANUCCI, M.; MARINELLI, A.; SARLI, G.; SALDA, L. D. Heat shock protein expression in canine malignant mammary tumors. **BMC Cancer**, v.6, p.171-82, 2006.

SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. **Cell Stress Chaperones**, v. 3, p. 228-36, 1998.

SCHNEIDER, R.; DORN, C.R.; TAYLOR, D.O. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. **Journal of National Cancer Institute**, v.43, p. 1249-61, 1969.

SONNENSCHNEIN, E. G.; GLICKMAN, L.T.; GOLDSCHMIDT, M. H.; McKEE, L. J. Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case control study. **American Journal of Epidemiology**, v. 133, n. 7, p. 694-703, 1991.

SORRIBAS, C. E. Glândula Mamária. In: SORRIBAS, C. E. **Reproduccion en los animales pequeños**. Buenos Aires: Inter Médica, p.91-102, 1995.

SOTI, C.; CSERMELY, P. Molecular chaperones in the etiology and therapy of cancer. **Pathology Oncology Research**, v. 4, n. 4, p. 316-21, 1998.

SÕTI, C.; NAGY, E.; GIRICZ, Z.; VÍGH, L.; CSERMELY, P.; FERDINANDY, P. Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. **British Journal of Pharmacology**, v.146, p.769-80, 2005.

SREEDHAR, A.S.; PARDHASARADHI, B.V.; BEGUM, Z.; et al. Lack of heat shock response triggers programmed cell death in a rat histiocytic cell line. **FEBS Letters**, v. 456, p. 339-42, 1999.

TISSIÈRES, A.; MITCHELL, H. K.; TRACY, U. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. **Journal of Molecular Biology**, v.85, n.3, p.389-98, 1974.

VARGAS ROIG, L.M.; GACO, F.E.; TELLO, O.; et al. Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. **International Journal of Cancer**, v. 79, p. 468-75, 1998.

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

WEI, Y.Q.; ZHAO, X.; KARIYA, Y.; et al. Inhibitors of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat shock protein (HSP) 70 expression in tumor cells. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, v. 40, p. 73-8, 1995.

WHITLEY, D.; GOLDBERG, S. P.; JORDAN, W. D. Heat shock proteins: A review of the molecular chaperones. **Journal of Vascular Surgery**, v. 29, n. 4, p. 748-51, 1999.

YAMAGAMI, T.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, K.; SUGIYAMA, M. Influence of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant mammary tumors. **Journal of Small Animal Practice**, v. 37, p. 462-4, 1996.

ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N.S. Correlação entre biópsia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.1, p.1-8, 2001 a.

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