



COMPARAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO DE CASPASES NOS DIFERENTES GRAUS DE MALIGNIDADE EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS

Geórgia Modé Magalhães¹; Italo César de Oliveira²; Flávia Cristina de Oliveira³; Priscila Pavini Cintra³; Ewaldo de Mattos Junior⁴.

1- Docentes do Programa de Mestrado em Medicina Veterinária de Pequenos Animais, Universidade de Franca – UNIFRAN, Franca-SP, Brasil

2-Graduandos- Universidade de Franca- UNIFRAN, Franca-SP, Brasil

3- Mestranda do Programa de Mestrado em Medicina Veterinária de Pequenos Animais, Universidade de Franca – UNIFRAN, Franca-SP, Brasil

Email do autor: georgiamode@hotmail.com

Recebido em: 30/09/2014 – Aprovado em: 15/11/2014 – Publicado em: 01/12/2014

RESUMO

Algumas células da neoplasia mamária canina maligna evitam induzir a apoptose. Sabe-se que quanto menor a quantidade de apoptose maior a agressividade tumoral. Pretende-se nesse estudo avaliar a agressividade entre os tipos histológicos tumorais mamários caninos. Os tumores de mama caninos são muito comuns em cadelas sendo a maioria diagnosticado como maligno. Objetivou-se nesse estudo comparar a imunomarcação de células em apoptose nos diferentes graus de malignidade de neoplasias mamárias caninas. Foram selecionados um total de 48 casos de neoplasias mamárias caninas do Setor de Patologia Veterinária do Hospital Veterinário da Unifran e os tipos histológicos e o grau de malignidade foram reclassificados de acordo com CASSALI et al. (2014). A técnica imuno-histoquímica empregada foi o sistema de detecção livre de biotina (REVEAL), com o anticorpo primário caspase3. As lâminas foram avaliadas em positivas ou negativas de acordo com a presença ou não de imunomarcação, e as positivas foram analisadas de acordo com a intensidade de imunomarcação. Das 48 amostras, 19 foram positivas, sendo a maioria em grau I, e dessas positivas não houve diferença estatística nos graus de malignidade em relação a intensidade de imunomarcação. Observou-se nesse estudo que a imunomarcação de caspase diminui de acordo com o aumento do grau de malignidade. Conclui-se que a caspase3 está diminuída nos carcinomas mamários grau III em relação ao grau I e II.

PALAVRAS-CHAVE: cães, imuno-histoquímica, neoplasias mamárias.

REGRADING AND DETERMINATION OF HISTOLOGIC TYPE PREVAILING IN CANINE MAMMARY TUMORS IN THE VETERINARY HOSPITAL OF THE UNIVERSITY OF FRANCA BETWEEN THE YEARS 2010 to 2012.

ABSTRACT

Some cells of malignant canine mammary neoplasia avoid inducing apoptosis. It is known that the smaller the amount of apoptosis increased tumor aggressiveness. This study aims to assess the aggressiveness between canine mammary tumor histological types. Canine mammary tumors are very common in dogs and most

diagnosed as malignant. The aim of this study is to compare the immunostaining of cells undergoing apoptosis in different degrees of malignancy of canine mammary neoplasms. A total of 48 cases of canine mammary neoplasms selected of Department of Veterinary Pathology, Veterinary Hospital of Unifran were reclassified according CASSALI et al.(2014).Immunohistochemical technique was the detection of free biotin (REVEAL) system with the primary antibody caspase 3. The slides were evaluated in positive or negative according to the presence or absence of immunostaining. If results were positive, they were analyzed according to the intensity of immunostaining. Of the 48 samples, 19 were positive, with the majority in grade I, and these positive no statistical difference in the degree of malignancy in relation to intensity of immunostaining. It was observed in this study to caspaseimmunostaining decreases with increasing degree of malignancy. We conclude that caspase 3 is decreased in mammary carcinomas grade III compared to grade I and II.

KEYWORDS: dogs, immunohistochemistry, mammary tumors.

INTRODUÇÃO

Os tumores de mama representam aproximadamente 52% de todas as neoplasias na fêmea canina, sendo que em média 73,4% (OLIVEIRA-FILHO et al., 2010), e 68,4% (De NARDI et al.; 2009), delas são malignas. Os tumores mamários caninos são úteis como modelo experimental para a espécie humana (QUEIROGA et al., 2011), sendo o diagnóstico inicial de uma neoplasia mamária em cadelas baseado na idade, histórico reprodutivo e sinais clínicos, incluindo a presença de edemas mamários e aumento de linfonodos regionais (CASSALI et al.,2007). Para se atribuir um diagnóstico e estimar um prognóstico a uma cadela com tumor mamário, é necessária a remoção cirúrgica do mesmo, seguindo-se a caracterização do tipo histológico, do grau de malignidade, o estadiamento clínico, a determinação do tamanho do tumor, a existência de metástase em linfonodos regionais e a presença de metástases distantes. Também devem ser avaliados fatores que interferem na proliferação celular, apoptose e desregulação da diferenciação celular (KUMARAGURUPARAN et al. 2006).

Cadelas com neoplasias mamárias malignas possuem uma sobrevida significativamente curta quando comparadas àquelas com neoplasias benignas. A sobrevida global em dois anos foi relatada por estar entre 25% e 40%. No entanto, esta sobrevida pode ser influenciada por vários fatores e pode variar significativamente dependendo do tipo histológico e do grau de diferenciação, do estágio da doença e do tratamento empregado. Cadelas com neoplasias pequenas e bem diferenciadas possuem um prognóstico excelente após ressecção cirúrgica, já as cadelas com neoplasias mais avançadas possuem um prognóstico mais reservado e podem necessitar de terapia adjuvante (ARGYLE & KHANNA 2013).

Algumas células da neoplasia mamária canina maligna evitam induzir a apoptose. Tem sido hipotetizado um defeito no sistema celular como, por exemplo, dano no DNA que produz moléculas pró-apoptóticas, ou esse defeito seria uma desregulação no mecanismo apoptótico (KLOPFLEISCH et al., 2011). Sabe-se que quanto menor a quantidade de apoptose maior a agressividade tumoral. Nesse estudo avaliou-se a agressividade entre os tipos histológicos tumorais mamários caninos.

Este trabalho apresentou como objetivo, imunodetectar a presença, quantificar a intensidade de imunomarcações de caspase e relacionar com os graus de malignidade das neoplasias mamárias caninas.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da respectiva universidade (UNIFRAN), número 037/13. Foram selecionados um total de 48 casos de neoplasias mamárias caninas do Setor de Patologia Veterinária do Hospital Veterinário da Unifran. Sendo sete amostras grau I, 18 amostras grau II e 23 amostras grau III. Os tipos histopatológicos e o grau de malignidade foram reclassificados de acordo com CASSALI et al. (2014). As lâminas foram avaliadas em positivas ou negativas de acordo com a presença ou não de imunomarcção. As amostras positivas foram avaliadas quanto a intensidade de imunomarcção.

A técnica imuno-histoquímica empregada foi o sistema de detecção livre de biotina (REVEAL), sendo a técnica baseada em RAMOS-VARA & MILLER (2014). Os cortes de tecido com 4 μ foram desparafinizados, reidratados e, então, foi realizada a recuperação antigênica com solução tampão EDTA pH 8,5 em panela a vapor (STEAMER) por 40 minutos. Em seguida, após resfriar por 20 minutos, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena por 20 minutos com a aplicação do Bloqueador de Peroxidase (reagente do kit Reveal Spring). Após essa etapa, os cortes foram lavados por cinco minutos em Tampão de Lavagem TBS com Tween 20. A seguir, os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução bloqueadora de reação inespecífica (Reagente do kit RevealSpring –Cod SPD-125) por 10 minutos. Ato contínuo, os cortes foram incubados em câmara úmida com o anticorpo primário (Caspase3, clone 25B881.1) na diluição de 1:200, e então incubado a 4°C por 18 horas. Depois os cortes foram novamente lavados em PBS, procedendo-se então a incubação com o polímero ligado a peroxidase, (Polímero Reveal HRP, kit Spring-cod SPD-125) por um período de 25 minutos. As lâminas foram novamente lavadas em água destilada, e a reação revelada pelo substrato cromogênicodiaminobenzidina (DAB líquido, reagente do kit Reveal Spring – Cód. SPD -125).

A seguir, a reação foi interrompida com a lavagem em água destilada, seguidas de contra coloração com Hematoxilina de Harris (1-2 minutos). Os cortes passaram pela bateria crescente de álcool e por xilol, foram montados com Permount (Fisher Scientific) e observados em microscopia de luz.

A análise foi realizada verificando se houve ou não marcação, considerando positiva ou negativa e foi analisada a intensidade de marcação de acordo com o programa Image Pro Plus. Foram avaliados e fotomicrografados cinco campos em objetiva de 40x, realizada a análise computacional e logo após a média de cada amostra. Os resultados foram analisados pelos testes não paramétricos ANOVA e seguidos por Kruskal Wallis.

RESULTADOS

As imunomarcções foram citoplasmáticas (Figura1) e observou-se células epiteliais e mioepiteliais positivas. Nos carcinomas mamários grau I foram avaliadas sete amostras, sendo cinco delas positivas para caspase e duas negativas, total de 71% de positividade para a caspase. Nos carcinomas mamários grau II foram avaliadas 18 amostras, sendo oito positivas e dez negativas, totalizando 44% de positividade para a caspase. E nos carcinomas mamários grau III foram analisadas 23 amostras sendo seis positivas e 17 negativas, totalizando 26% de imunomarcção para a caspase.

Na análise de intensidade de imunomarcacão nos casos positivos não foram encontradas diferenças significativas entre os graus, com valor de $p=0,26$ (Figura 2). Os tipos histopatológicos que apresentaram imunomarcacão de caspase estão descritos no quadro 1.

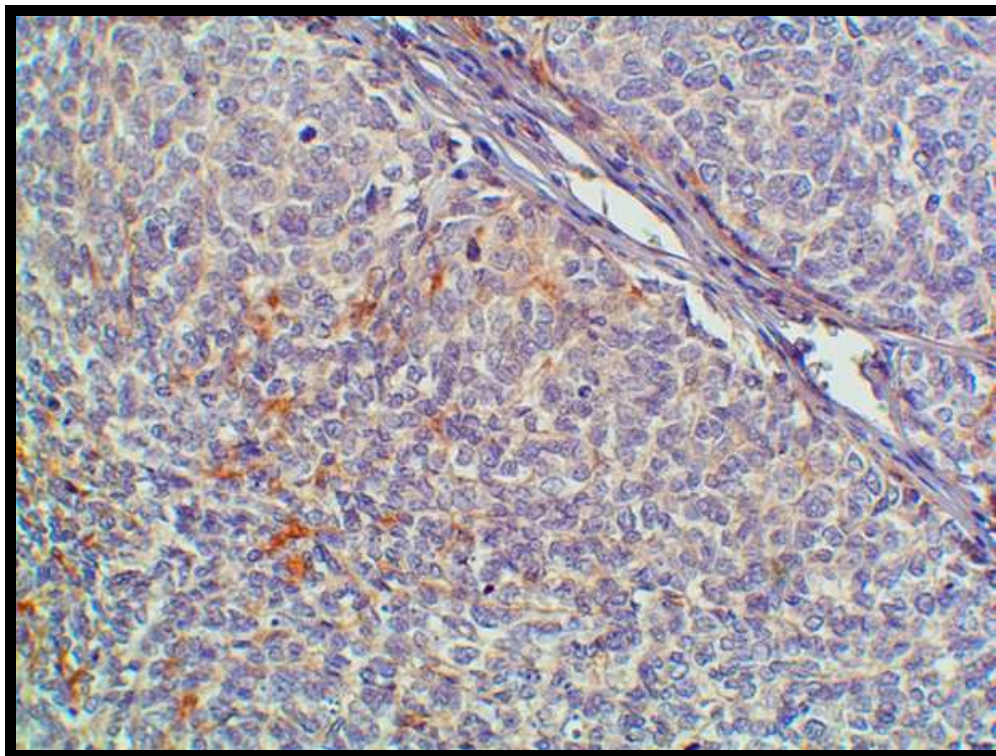


FIGURA 1: Fotomicrografia de carcinoma mamário padrão sólido grau II em cadela. Obj 40x. Imuno-histoquímica pelo método livre de biotina (REVEAL), DAB. Imunomarcacão citoplasmática em células epiteliais mamárias.

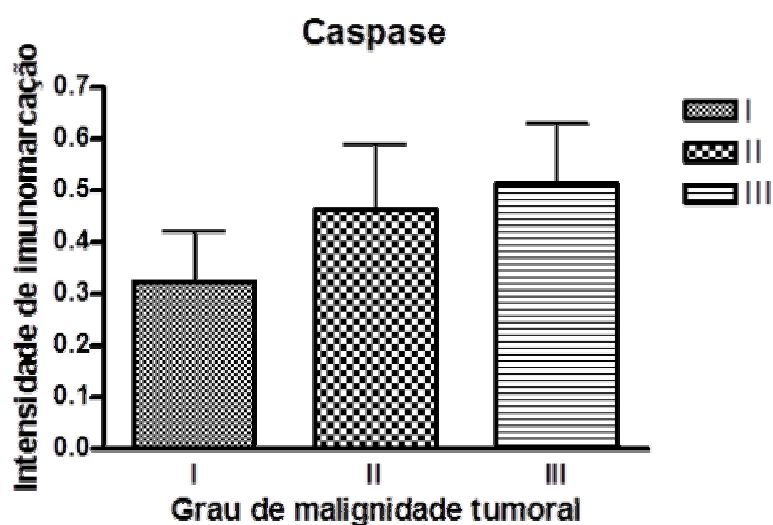


FIGURA 2: Comparações de intensidade de imunomarcacão para Caspase3 nos diferentes graus de malignidade em neoplasias mamárias caninas.

QUADRO 1. Resultados dos tipos histopatológicos de neoplasias mamárias caninas imunomarcadas pela Caspase -3 e avaliadas quanto a intensidade de marcação.

Neoplasia	Número de amostras
Carcinoma tubular grau I	3
Carcinoma tubular grau II	2
Carcinoma tubular grau III	2
Carcinoma papilar grau I	1
Carcinoma papilar grau II	2
Carcinoma papilar grau III	2
Carcinoma sólido II	2
Carcinoma em Tumor Misto grau I	1
Carcinoma em Tumor Misto grau II	2
Carcinoma em Tumor Misto grau III	2
Total	19

DISCUSSÃO

Observou-se nesse estudo que a imunomarcagem de caspase diminuiu de acordo com o aumento do grau de malignidade. Autores reconheceram que em culturas de células neoplásicas humanas a caspase-3 estava inibida em neoplasias malignas, porém em outro estudo imuno-histoquímico a caspase estava alta nos tumores malignos, sendo assim deve-se avaliar se a caspase3 está na forma ativa ou se é a sua forma inativada (pró-forma) que está aumentada e não está induzindo a apoptose propriamente dita (KRAJEWSK et al., 1999). Autores têm reconhecido uma diminuição da expressão de caspase8 e 9, e aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e BCL-X. Porém, com o rápido crescimento do tumor há um estresse citotóxico incluindo hipóxia e deprivação de oxigênio, sendo assim, há um estímulo para essas células entrarem em apoptose (KLOPFLEISCH et al., 2011).

A caspase3 é uma caspase efetora que cliva e ativa a pró-caspase 8, evoluindo para o processo de apoptose (FINDALO & KYPRIANOU, 2012). Os artigos em neoplasias mamárias são conflitantes (OLSSON & ZHIVOTOVSKY, 2011) alguns demonstram que há aumento da expressão das caspases3 (TERZIAN et al., 2007) e caspase8 outros incluindo este trabalho demonstram diminuição da expressão dessas caspases em neoplasias mamárias malignas (KUMARAGURUPARAN et al., 2006). A diminuição da expressão da caspase 3 indica a sobrevivência de células em neoplasias mamárias (O'DONOVAN et al., 2003).

Em relação à intensidade de imunomarcção autores compararam epitélio mamário normal com carcinomas invasivos sugerindo que o gene que controla a apoptose Bcl-2 tende a ser menor nos carcinomas do que em epitélio normal (ZAPATA et al., 1998). Nesse estudo não houve diferença significativa entre os graus de malignidade em relação a intensidade de imunomarcção da caspase 3.

CONCLUSÃO

Conclui-se que acaspase3 está diminuída nos carcinomas mamários grau III em relação ao grau I e II. E quando presente, não há diferença de intensidade de imunomarcção nos diferentes graus de malignidade em neoplasias mamárias caninas. Mais estudos devem ser feitos devido à contradição com outros trabalhos do gênero.

REFERÊNCIAS

ARGYLE, D. J.; KHANNA, C. Tumor Biology and Metastasis In: WITHROW, S. J; VAIL, D.M. **Withrow&MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 5. ed. Missouri: Saunders Elsevier, cap. 2. p. 30-50.2013.

CASSALI, G. D.; GOBBI, H.; MALM, C.; SCHMITT, F. C. Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumor: comparative features with human tumors. **Cytopathology**, v. 18, n. 3, p. 191-196, 2007.

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A. B.; GHEVER, C.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; OLIVEIRA, L. O.; SUEIRO, F. A. R.; BESERRA, H. E. O.; BERTAGNOLLI, A. C.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; CAMPOS, C. B.; ARAUJO, M. R.; CAMPOS, L. C.; MONTEIRO, L. N.; NUNES, F. C.; HORTA, R. S.; REIS, D. C.; LUVIZOTTO, M. C. R.; MAGALHÃES, G. M.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; TANAKA, N. M.; GRANDI, F.; UBUKATA, R.; BATSCHINSKI, K.; TERRA, E. M.; SALVADOR, R. C. L.; JARK, P. C.; DELECRODI, J. E. R.; NASCIMENTO, N. A.; SILVA, D. N.; SILVA, L. P.; FERREIRA, K. C. R. S.; FREHSE, M. S.; DI SANTIS, G. W.; SILVA, E. O.; GUIM, T. N.; KERR, B.; CINTRA, P. P.; SILVA, F. B.F.; LEITE, J. S.; MELLO, M. F. V.; FERREIRA, M. L. G.; FUKUMASU, H.; SALGADO, B. S.; TORRES, R. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors – 2013. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 7, n. 2, p. 38-69, 2014.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; ROCHA, N. S.; FERNANDES, S. C. Neoplasias mamárias. In: DALECK, C. R; DE NARDI, A. B; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**.1. ed. São Paulo: Roca, cap. 26, p. 371-383. 2009.

FIANDALO, M. V.; KYPRIANOU, N. Caspase control: protagonists of câncer cell apoptosis. **Experimental Oncology**, v. 34, n. 3, p. 165-175, 2012.

KLOPFLEISCH, R.; VON EULER, H.; SARLI, G.; PINHO, S. S.; GÄRTNER F.; GRUBER A. D. Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors : news from an old disease. **Veterinary Pathology**, v.48, p.98, 2011.

KRAJEWSKI, S.; KRAJEWSKA, M.; TURNER, B. C.; PRATT, C.; HOWARD, B.; ZAPATA, J. M.; FRENKEL, V.; ROBERTSON, S.; IONOV, Y.; YAMAMOTO, H.; PERUCHO, M.; TAKAYAMA, S.; REED, J. C. Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v.6, p. 29-40, 1999.

KUMARAGURUPARAN, R.; PRATHIBA, D.; NAGINI, S. Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammarytumours. **Veterinary Science**, v. 81, n. 2, p. 218-224, 2006.

O'DONOVAN, N.; CROWN, J.; STUNELL, H.; HILL, A. D.; MCDERMOTT, E.; O'HIGGINS, N.; DUFFY, M. J. Caspase 3 in breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 2, p.738-742, 2003.

OLIVEIRA FILHO, J. C.; KOMMERS, G. D.; MASUDA, E. K.; MARQUES, B. M. F. P. P.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n. 2, p. 177-185, 2010.

OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY, B. Caspases and cancer, review. **Cell Death and Differentiation**, v. 18, p. 1441-1449, 2011.

QUEIROGA, F. L.; RAPOSO, T.; CARVALHO, M. I.; PRADA, J.; PIRES, I. Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. **In Vivo**, v. 25 p.455-466, 2011.

RAMOS-VARA, J. A.; MILLER, M. A. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique. **Veterinary Pathology**, v. 51, n.1, p.42-87, 2014.

TERZIAN, A. C. B.; ZUCCARI, D. A. P. C.; PEREIRA, R. S.; PAVAM, M. V.; RUIZ, C. M.; SUEIRO, F. A. R.; COELHO, J. Avaliação da caspase-3 e Ki-67 como marcadores prognósticos nas neoplasias mamárias em cadelas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and animal Science**, v. 44, n.2, p. 96-102, 2007.

ZAPATA, J. M.; KRAJEWSKA, M.; KRAJEWSKI, S.; HUANG, R. P.; TAKAYAMA, S.; WANG, H.G.; ADAMSON, E.; REED, J. C. Expression of multiple apoptosis-regulatory genes in human breast cancer cell lines and primary tumors. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.47, n.2, p. 129-140, 1998.