

## AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DE COX-2, HSP 27 E HSP 70 EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CADELAS<sup>1</sup>

Thalita Evani Silva de Oliveira<sup>2</sup>, João Paulo Machado<sup>3</sup>,  
Marlene Isabel Vargas Vilória<sup>4</sup>, Alessandra Sayeguy Arreguy Silva<sup>5</sup>,  
Andréa Pacheco Batista Borges<sup>6</sup>, Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo<sup>7</sup>

**Resumo:** *É crescente na oncologia veterinária o interesse pela expressão de HSP e COX-2 em neoplasias. Este trabalho tem como objetivo investigar quais subtipos de neoplasias benignas e malignas têm maior expressão destas proteínas e enzimas, respectivamente. 35 amostras de tumores mamários foram divididas em sete grupos de cinco amostras. A proteína HSP27 demonstrou imunomarcagem citoplasmática de células epiteliais e maior intensidade de expressão nas áreas marginais do tumor. A proteína HSP70 demonstrou imunomarcagem citoplasmática e nuclear de células epiteliais. A enzima COX-2 demonstrou imunomarcagem citoplasmática e nuclear de células epiteliais. Este trabalho fornece evidências de que a expressão das HSP não oferece valor diagnóstico ou prognóstico. Entretanto, a expressão da COX-2 mostrou-se diretamente proporcional ao grau de malignidade, auxiliando o diagnóstico.*

**Palavras-chaves:** *Carcinomas mamários, Cicloxigenase, proteína de choque térmico, imunomarcagem, sarcomas mamários.*

### Introdução

É crescente na oncologia veterinária o interesse por um grupo de proteínas denominadas “proteínas de choque térmico” (HSP - heat shock

---

<sup>1</sup> Parte do Trabalho de Iniciação Científica da primeira autora.

<sup>2</sup> Graduanda em Medicina Veterinária – FACISA/UNIVIÇOSA. E-mail: thalitavet@gmail.com

<sup>3</sup> Professor do curso de Medicina Veterinária – FACISA/UNIVIÇOSA. E-mail: jpmvet@gmail.com

<sup>4</sup> Professorado curso de Medicina Veterinária – UFV. E-mail: bebel@ufv.br

<sup>5</sup> Gestora do curso de Medicina Veterinária – FACISA/UNIVIÇOSA. E-mail: alarreguy@hotmail.com

<sup>6</sup> Professorado curso de Medicina Veterinária – UFV. E-mail: andrea@ufv.br

<sup>7</sup> Professor do curso de Medicina Veterinária – UFV. E-mail: jpatarro@ufv.br

protein). De acordo com Ciocca e Calderwood (2005) e Romanucci et al. (2006), estas proteínas são expressas em células sob condições normais de crescimento, onde participam de processos fisiológicos básicos, como proliferação e diferenciação celular e homeostase protéica. Além disso, o grau de expressão das HSP depende da atividade metabólica celular, ou seja, o aumento na expressão dessas é relativo ao aumento na demanda celular por síntese protéica e eventos secretores.

As enzimas cicloxigenases catalisam a formação de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico. A COX-2 é uma enzima induzida e expressada por células que participam do processo inflamatório, além de tecidos neoplásicos e por outras condições patológicas (GASPARINI et al., 2003).

Este trabalho tem como objetivo investigar quais subtipos de neoplasias benignas e malignas têm maior expressão das proteínas de choque HSP27 e, ou, HSP70 e, ou COX-2 de caninos portadores de lesões mamárias atendidas no Hospital Veterinário da UNIVIÇOSA em Viçosa, Minas Gerais.

### **Material e Métodos**

Foram analisados 97 protocolos de exame histopatológico de espécimes de biópsia de tumores da glândula mamária de cães no período de janeiro de 2008 a abril de 2013 (5 anos), arquivados no Laboratório de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde (FACISA/UNIVIÇOSA). Foram coletadas amostras de tecido mamário de três cadelas sem histórico de neoplasia mamária, provenientes do serviço de anatomopatologia do próprio Departamento, que constituíram o grupo controle (C). Trinta e cinco amostras de tumores mamários, divididas em sete grupos de cinco amostras, foram classificadas conforme CASSALI et al. (2011), e divididas nos seguintes grupos experimentais: adenoma complexo (AC), tumor misto benigno (TMB), carcinoma sólido (CS), carcinoma papilar (CP), carcinoma tubular (CT), carcinoma em tumor misto (CTM) e carcinossarcoma (Carcis).

No Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV) – BIOAGRO/UFV, na Universidade Federal de Viçosa foi realizada a análise imunoistoquímica para HSP27 (sc-1048, Santa Cruz Biotechnology®), HSP 70 (sc-1060, Santa Cruz Biotechnology®) e Cox-

2 (sc-1747, Santa Cruz Biotechnology®), nas diluições 1:75, 1:75 e 1:250, respectivamente. Para cada anticorpo, foram coletadas seis lâminas, sendo processadas para HSP27, HSP70 e COX-2, em duplicata. Os cortes de tecido com 4µm foram desparafinizados. Para o bloqueio da peroxidase endógena, as amostras permaneceram em solução a 3% de peróxido de hidrogênio em metanol absoluto por 30 minutos. Posteriormente, as amostras permaneceram em álcool 96%, 96% e 70% por 5 minutos, respectivamente. A recuperação antigênica foi realizada por calor úmido a 100°C, por 40 minutos, em tampão citrato, pH 6,0. A seguir, os sítios inespecíficos foram bloqueados incubando-se as lâminas com solução de avidina por 20 minutos, a temperatura ambiente, e em solução de biotina por 30 minutos, também a temperatura ambiente. A incubação *overnight* com o anticorpo primário foi em câmara úmida, a 4°C. Decorrido o tempo, os complexos imunes foram tratados com um anticorpo secundário (Anti-goat IgG-Biotin, B7014, SIGMA®) em câmara úmida, a 37°C, por 1h. Em seguida procedeu-se a incubação com o complexo estreptoavidina-peroxidase em câmara úmida, a 37°C, por 1h. A atividade da peroxidase foi detectada utilizando-se 0,2% de peróxido de hidrogênio em solução de 3-3'-diaminobenzidina (DAB, Dako K3468) aplicados aos cortes de tecido por 5min. Foi realizada contracoloração com hematoxilina de Harris por 30s, antes da lavagem (por 2min em água corrente), desidratação e montagem das lâminas.

A imunomarcção dos anticorpos foi analisada quanto à distribuição percentual, com escore variando de 0 a 4 (0 = 0%, 1 = < 10%, 2 = 10 - 30%, 3 = 31 - 60% e 4 = >60%) e intensidade baixa (+), moderada (++) e intensa (+++) (escore variando de 0 a 3). O escore total foi obtido pelo produto da distribuição pela intensidade, segundo Heller et al., 2005. Foram analisados 15 campos lâmina/tumor, sendo a marcação 0 a 2 considerada fraca, 3 a 6 moderada e 8 a 12 forte.

## Resultados e Discussão

A proteína HSP27 demonstrou imunomarcção citoplasmática de células epiteliais e maior intensidade de expressão nas áreas marginais do tumor,

conforme descrito por Romanucci *et al.* (2006). Todas as amostras foram positivas para HSP27, sendo predominante o escore superior a 8 (22/63%). Esses resultados divergem dos encontrados na literatura sobre o tema (PAULA, 2010 e ROMANUCCI *et al.*, 2006), onde são relatadas imunomarcações de baixa intensidade. Contudo, segundo Ciocca e Calderwood (2005), a expressão de Hsp27 é frequentemente aumentada em neoplasias, devido ao fato de inibirem a apoptose.

A proteína HSP70 demonstrou imunomarcação citoplasmática e nuclear de células epiteliais, corroborando Paula (2010) e Romanucci *et al.* (2006). Todas as amostras foram positivas para HSP70, com predomínio de escore 3 a 6 (22/63%). Em 6 amostras (17%) foi observado escore superior a 8, em amostras de CT (1), CP (1), CarciS (1) e CS (3). A alta expressão de HSP70 é um pré-requisito para a sobrevivência das células neoplásicas, por inibirem a apoptose, e está abundantemente expressa em tumores malignos. Sua expressão está correlacionada ao aumento da proliferação celular, à pobre diferenciação e metástase linfonodais (CIOCCA e CALDERWOOD, 2005).

A enzima COX-2 demonstrou imunomarcação citoplasmática e nuclear de células epiteliais, corroborando com Heller *et al.* (2005). Das amostras estudadas, 91,4% foram positivas para COX-2, com predomínio de escore superior a 8 (15/43%). No presente estudo foi observada a imunomarcação em todas as amostras de CS, divergindo do resultado encontrado por Heller *et al.* (2005), em que descrevem que a COX-2 não foi positiva em suas amostras.

### Conclusões

Este trabalho fornece evidências de que a expressão das HSP não oferece valor diagnóstico ou prognóstico. Entretanto, a expressão da COX-2 mostrou-se diretamente proporcional ao grau de malignidade, auxiliando o diagnóstico.

### Referências Bibliográficas

CASSALI, G.D.; *et al.* Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal Veterinary Pathology**, ano 4, n. 2, p. 153-180, 2011.

CIOCCA, D.R.; CALDERWOOD, S.K. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. **Cell Stress & Chaperones**, vol. 10, n. 2, p.86–103, 2005.

GASPARINI, G.; LONGO, R.; SARMIENTO, R.; MORABITO, A. Inhibitors of cyclooxygenase 2: a new class of anticancer agents? **The Lancet Oncology**, v.4, p.605-615, 2003.

HELLER DA., CLIFFORD CA., GOLDSCHMIDT MH., HOLT DE., SHOFER FS., SMITH A., SORENMO KU. Cyclooxygenase-2 Expression is Associated with Histologic Tumor Type in Canine Mammary Carcinoma. **Veterinary Pathology**, 46, 776- 780, 2005.

PAULA, A.C.B. **Imunomarcção de proteínas de estresse (HSP27, HSP72 e HSP90) e proteína p53 em neoplasias mamárias de cadelas**. 48f. Dissertação (Mestre em Patologia Animal), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, 2010.

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

