

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA E EXPRESSÃO
DE METALOPROTEINASES (MMP-9 E MMP-2) E SEUS
INIBIDORES (TIMP-1 e TIMP-2) NA GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA
NEOPLÁSICA**

Hugo Henrique Ferreira
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura

GOIÂNIA
2012

HUGO HENRIQUE FERREIRA

**GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA E EXPRESSÃO
DE METALOPROTEINASES (MMP-9 E MMP-2) E SEUS
INIBIDORES (TIMP-1 e TIMP-2) NA GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA
NEOPLÁSICA**

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em Ciência
Animal da Escola de Veterinária e
Zootecnia da Universidade Federal de
Goiás para a obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal.

Área de concentração:

Patologia, Clínica e Cirurgia Animal

Orientador:

Prof.^a Dr.^a Veridiana Maria Brianezi Dignani de
Moura (EVZ/UFG)

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi (FCAV/UNESP)

Prof. Dr. Juan Carlos Duque Moreno (EVZ/UFG)

GOIÂNIA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

F383g Ferreira, Hugo Henrique.
Graduação histológica e expressão de metaloproteinases (MMP-9 e MMP-2) e seus inibidores (TIMP-1 e TIMP-2) na glândula mamária canina neoplásica [manuscrito] / Hugo Henrique Ferreira. – 2012.
xv, 82 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura; Coorientadores: Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi, Prof. Dr. Juan Carlos Duque Moreno.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2012.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Apêndices.

1. Neoplasia mamária canina. 2. Graduação histológica. I.
Título.

CDU:619: 618.19-006

Dedico este trabalho a todos aqueles que, de alguma forma, me motivaram a ser uma pessoa melhor. Em especial, à minha mãe, que mesmo dedicando-se muito ao trabalho, esteve sempre ao meu lado em todos os momentos difíceis, me orientando, consolando e compartilhando os momentos de felicidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força em todos os momentos difíceis enfrentados e por sempre me guiar aos melhores caminhos;

Aos meus pais, Maria de Fátima Ferreira e Félix Gomes Parreira, pelo amor, orientações e incentivo. E acima de tudo, pela dedicação que sempre tiveram para fornecer as melhores condições possíveis à minha felicidade. A vocês, o meu amor, respeito e admiração;

Aos meus irmãos, Murillo Parreira e Nayara Parreira, pela amizade, convívio e, principalmente, por me entenderem e ajudarem a superar os momentos angustiantes destes últimos anos;

Aos meus amigos, Adriana Marques de Faria, Adriana da Silva Santos, Denise Caroline Toledo, Júlia de Miranda Moraes e Mariana Batista Rodrigues Faleiro, por dividirem comigo muitas risadas, festas, trabalhos, aulas, leituras de lâminas, necropsias e, cada um da sua forma, ter me ajudado muito no desenvolvimento deste trabalho. A presença de cada um de vocês tornou essa jornada muito mais amena;

Ao grande amigo e companheiro, Marcio Henrique Leal Adorno Ferreira da Costa, por ter me auxiliado em diversos momentos na confecção deste trabalho e me ajudar sempre em tudo que preciso;

Aos amigos de setor, Lorena Lima, Rakel Cândido, Lea Resende Moura e Natália Menezes, pelos bons momentos passados juntos;

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura pela oportunidade de realização do mestrado e ajuda durante as fases de confecção deste trabalho;

Às professoras doutoras do Setor de Patologia Animal, Ana Paula Iglesias Santin, Moema Pacheco Chediak Matos e Regiane Gagno Porto pelo excelente convívio durante todos esses anos e por me receberem sempre com a maior disposição e atenção;

Aos co-orientadores, Prof. Dr. Juan Carlos Duque Moreno e Prof. Dr. Andriago Barbosa de Nardi pela ajuda durante as fases iniciais da pesquisa;

Aos técnicos, Antônio Souza da Silva e João Vilela Teixeira, pela ótima convivência, conversas e especialmente ao Antônio, pela confecção de parte das lâminas do experimento;

A CAPES pela bolsa fornecida durante todo o período do mestrado;

À Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, pela formação profissional e por ter sido minha segunda casa durante todos esses anos;

À coordenação da Pós-graduação pelas boas condições fornecidas para a realização deste estudo;

A todos os meus amigos, parentes e demais pessoas, que direta ou indiretamente contribuíram para que os meus dias fossem melhores e de certa forma ajudaram na realização deste trabalho;

A cada um de vocês, meus sinceros agradecimentos.

“Que eu jamais me esqueça que Deus me ama infinitamente, que um pequeno grão de alegria e esperança dentro de cada um é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois... A vida é construída nos sonhos e concretizada no amor.”

Francisco Cândido Xavier

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS	16
1. Aspectos anatomofisiológicos e histológicos da mama canina	16
2. Neoplasias mamárias na fêmea canina	19
3. Matriz Extracelular	24
4. Metaloproteinases de matriz, inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz e seu envolvimento nos processos neoplásicos.....	25
5. REFERÊNCIAS.....	33
CAPÍTULO 2 - CLASSIFICAÇÃO E GRADUAÇÃO HISTOLÓGICAS APLICADAS AOS TUMORES MAMÁRIOS DE CADELAS.....	42
RESUMO.....	42
INTRODUÇÃO	44
MATERIAL E MÉTODOS	45
RESULTADOS	47
DISCUSSÃO	49
CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS.....	52
CAPÍTULO 3 - EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES 9 (MMP-9) E 2 (MMP- 2) E SEUS INIBIDORES (TIMP-1 E TIMP-2) NO TECIDO MAMÁRIO CANINO NORMAL E NEOPLÁSICO	56
RESUMO.....	56
INTRODUÇÃO	58
MATERIAL E MÉTODOS.....	59
RESULTADOS	61
MMP-9	61
MMP-2	64
TIMP-1	66
TIMP-2	68
Correlação entre MMP-9, MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2	70
DISCUSSÃO	71
CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS.....	74
CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	79

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

- FIGURA 1 - Hormônios e seus efeitos no desenvolvimento da glândula mamária das cadelas..... 17
- FIGURA 2 - Cadeia mamária canina e sua respectiva drenagem linfática. A drenagem linfática da mama abdominal cranial pode ocorrer pela cadeia direcionada tanto ao linfonodo axilar quanto ao inguinal superficial (seta pontilhada). 18
- FIGURA 3 - Estrutura das MMP. As collagenases, estromelisinases, gelatinases e MT-MMP apresentam em comum os domínios pró-peptídeo, catalítico e C-terminal semelhante à hemoperoxidase. As gelatinases apresentam região de inserção semelhante à fibronectina no domínio catalítico e as MT-MMP possuem o domínio transmembrânico. 27
- FIGURA 4 - Mecanismo de ativação das metaloproteinases. O domínio pró- é removido pela combinação de uma clivagem no domínio e uma clivagem entre o domínio pró-peptídeo e o domínio catalítico. ... 28

CAPÍTULO 2 - CLASSIFICAÇÃO E GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA APLICADAS AOS TUMORES MAMÁRIOS DE CADELAS

- FIGURA 1 - Fotomicrografia de carcinoma mamário de cadela. Figura de mitose atípica ao centro (seta)..... 46
- FIGURA 2 - Distribuição dos tumores mamários malignos de acordo com o tipo e grau histológicos. CTP - carcinoma tubulopapilar; CS = carcinoma sólido; CPC = carcinoma papilar cístico; CA = carcinoma anaplásico; CTMB = carcinoma em tumor misto benigno; CC = carcinoma complexo; CSA = carcinosarcoma. 49

CAPÍTULO 3 - EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES 9 (MMP-9) E 2 (MMP-2) E SEUS INIBIDORES (TIMP-1 E TIMP-2) NA GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA NORMAL E NEOPLÁSICA

- FIGURA 1** - Fotomicrografias de glândula mamária canina. IHQ, anti-MMP-9, objetiva 20x. A) Mama normal. Células epiteliais (seta cheia) e estromais (seta vazada) com escores de marcação um e dois, respectivamente. B) Adenoma mamário simples. Escore um para células epiteliais (seta cheia) e estromais (seta vazada). C) Carcinoma tubulopapilar. Células epiteliais neoplásicas (seta cheia) e estromais (seta vazada) marcadas em escore três. D) Carcinoma complexo de mama. Marcação em escore dois nas células epiteliais neoplásicas (seta cheia) e três em células estromais (seta vazada)..... 62
- FIGURA 2** - Distribuição dos casos de acordo com a intensidade de marcação das células epiteliais acinares para o anticorpo anti-MMP-9 em mamas normais e neoplásicas..... 64
- FIGURA 3** - Fotomicrografias de glândula mamária canina. IHQ, anti-MMP2. A) Mama normal, objetiva 20x. Raras células epiteliais (seta cheia) e estromais (seta vazada) com escore de marcação um. B) Adenoma mamário simples, objetiva 40x. Escores um para células epiteliais (seta cheia) e ausência de marcação em células mesenquimais (seta vazada). C) Carcinoma tubulopapilar, objetiva 10x. Células epiteliais neoplásicas (seta cheia) e estromais (seta vazada) marcadas em escore um. D) Carcinoma complexo de mama, objetiva 20x. Escore de marcação um nas células e células estromais (seta vazada) e células epiteliais neoplásicas (seta cheia). 65
- FIGURA 4** - Fotomicrografias de glândula mamária canina. IHQ, anti-TIMP1. A) Mama normal, objetiva 20x. Células epiteliais (seta cheia) e estromais (seta vazada) com escore de marcação dois. B) Adenoma mamário simples, objetiva 20x. Escores um para células

epiteliais (seta cheia) e estromais (seta vazada). C) Carcinoma tubulopapilar, objetiva 40x. Poucas células epiteliais neoplásicas (seta cheia) e estromais (seta vazada) marcadas em escore um. D) Carcinoma complexo de mama, objetiva 20x. Marcação em escore um nas células e células estromais (seta vazada) e células epiteliais neoplásicas (seta cheia). 67

FIGURA 5 - Fotomicrografias de glândula mamária canina. IHQ, anti-TIMP2. A) Mama normal, objetiva 20x. Células epiteliais (seta cheia) e estromais (seta vazada) com escores de marcação um. B) Adenoma mamário simples, objetiva 10x. Células epiteliais (seta cheia) e estromais (seta vazada) com escore de marcação um. C) Carcinoma tubulopapilar, objetiva 20x. Células epiteliais neoplásicas (seta cheia) e estromais (seta vazada) marcadas em escore três. D) Carcinoma complexo de mama, objetiva 10x. Marcação em escore dois nas células epiteliais neoplásicas (seta cheia) e um em células estromais (seta vazada). 69

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

- QUADRO 1 - Classificação histológica dos tumores mamários caninos benignos e malignos de acordo com os critérios propostos por MISDORP et al. (1999) e GOLDSCHMIDT et al. (2011). 22

CAPÍTULO 2 - CLASSIFICAÇÃO E GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA APLICADAS AOS TUMORES MAMÁRIOS DE CADELAS

- QUADRO 1 - Relação dos anticorpos, recuperação antigênia, tampão e tempo utilizados para os anticorpos MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 na técnica de imuno-histoquímica..... 60
- QUADRO 2 - Escores aplicados à análise da marcação dos anticorpos MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2. 61

CAPÍTULO 3 - EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES 9 (MMP-9) E 2 (MMP-2) E SEUS INIBIDORES (TIMP-1 E TIMP-2) NA GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA NORMAL E NEOPLÁSICA

- QUADRO 1 - Recuperação antigênia, tampão e tempo utilizados na técnica de imunoistoquímica para MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2..... 60
- QUADRO 2 - Escores aplicados à análise da marcação dos anticorpos anti-MMP-2, anti-MMP-9, anti-TIMP-1 e anti-TIMP-2..... 61

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

QUADRO 1 - Classificação histológica dos tumores mamários caninos benignos e malignos de acordo com os critérios propostos por MISDORP et al. (1999) e GOLDSCHMIDT et al. (2011).	22
---	----

CAPÍTULO 2 - CLASSIFICAÇÃO E GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA APLICADAS AOS TUMORES MAMÁRIOS DE CADELAS

TABELA 1 - Distribuição dos tumores mamários de cadelas de acordo com a classificação de GOLDSCHMIDT et al. (2011) e graduação de ELSTON & ELLIS (1998).	48
--	----

CAPÍTULO 3 - EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES 9 (MMP-9) E 2 (MMP-2) E SEUS INIBIDORES (TIMP-1 E TIMP-2) NA GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA NORMAL E NEOPLÁSICA

TABELA 1 - Distribuição dos casos de acordo com os escores aplicados à intensidade de marcação e número de células marcadas com o anticorpo anti-MMP-9 em células epiteliais acinares e estromais periacinares em relação ao diagnóstico.....	63
TABELA 2 - Distribuição dos casos de acordo com os escores aplicados à marcação e número de células marcadas do anticorpo anti-MMP-2 em células epiteliais acinares e estromais periacinares em relação ao diagnóstico.....	66
TABELA 3 - Distribuição dos casos de acordo com os escores aplicados à intensidade de marcação e número de células marcadas com o anticorpo anti-TIMP-1 em células epiteliais acinares e estromais periacinares em relação ao diagnóstico.....	68

TABELA 4 - Distribuição dos casos de acordo com os escores aplicados à imunomarcagem e número de células marcadas do anticorpo TIMP-2 em células epiteliais acinares e estromais periacinares em relação ao diagnóstico	70
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

DAB - diaminobenzidina

ELISA - ensaio imunoenzimático indireto (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*)

HE - hematoxilina e eosina

IL-1 - interleucina 1

IL-6 - interleucina 6

kDa - quilodalton

MB - membrana basal

MEC - matriz extracelular

MMP - metaloproteinase(s)

MT-MMP - metaloproteinase(s) de membrana

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCR - reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction*)

SDS - dodecil sulfato de sódio

SPA/EVZ/UFG - Setor de Patologia Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás

TIMP - inibidor(es) tecidual(is) de metaloproteinase(s)

TGF- β - fator de crescimento transformador beta

TMA - microarranjo tecidual (*tissue microarray*)

RESUMO

Nas fêmeas caninas, as glândulas mamárias são os locais mais comuns para a ocorrência de neoplasias. Para avaliar o comportamento biológico dessas lesões empregam-se rotineiramente métodos histológicos descritivos que, associados à graduação histológica, auxiliam na predição prognóstica dessas enfermidades. Ainda, o desequilíbrio entre a quantidade tissular de metaloproteinases de matriz (MMP), enzimas proteolíticas implicadas em processos fisiológicos e patológicos, e seus inibidores (TIMP), desempenha papel importante na evolução e invasão tumoral. Para avaliar o comportamento biológico de alguns tipos tumorais frequentes da mama das cadelas esta pesquisa foi dividida em duas etapas. A primeira teve como objetivo relacionar a classificação e a graduação histológicas das neoplasias mamárias de cadelas, bem como correlacionar a graduação dos tumores malignos com o tamanho tumoral. Para isso, avaliaram-se 119 amostras de tumores mamários caninos, sendo considerados tumores todos os distúrbios do crescimento da glândula mamária canina, incluindo os neoplásicos (benignos e malignos) e os não neoplásicos (alterações hiperplásicas). Todos os tumores foram classificados e apenas os malignos graduados histologicamente e correlacionados ao tamanho tumoral. Concluiu-se que o carcinoma complexo é o tipo histológico mais comum e que possui menor grau histológico em relação aos demais tipos tumorais de classificação maligna. Ainda, neoplasias maiores que cinco centímetros foram predominantemente malignas (92,3% ou 12/13) e não foi observada correlação entre tamanho tumoral e grau histológico. A relação entre a classificação e a graduação histológica compreendeu instrumento auxiliar na descrição microscópica dos tumores mamários malignos das cadelas. A segunda etapa teve como objetivo avaliar a expressão de MMP-9, MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 no tecido mamário canino normal e neoplásico. Para isso, foram selecionadas 48 amostras de glândula mamária canina, sendo 14 de carcinoma complexo (CC), 13 de carcinoma tubulopapilar (CT), seis de adenoma mamário simples (AM) e 15 de mama normal (MN), submetidas à técnica de imuno-histoquímica para a avaliação da intensidade de marcação e do número de células epiteliais e estromais marcadas. Houve diferença na expressão de MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 de acordo com a histomorfologia mamária. A MMP-9 apresentou maior expressão

nas células epiteliais e estromais dos CC e CT em relação às MN. Constatou-se menor expressão de TIMP-1 nas células estromais do CC e superexpressão de TIMP-2 nas células epiteliais do CT. Ainda, houve correlação positiva entre MMP-9 e TIMP-1 quanto a intensidade de marcação e número de células epiteliais e estromais marcadas na MN, e entre MMP-9 e TIMP-2 nas células epiteliais neoplásicas do CT. Concluiu-se que há variação na expressão da MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 entre os tipos tumorais, além de correlação positiva entre TIMP-1 e MMP-9 nas mamas normais e entre MMP-9 e TIMP-2 no carcinoma tubulopapilar. A atividade equilibrada entre MMP-9, MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 é fundamental à homeostase da glândula mamária canina normal enquanto a superexpressão de MMP-9 e TIMP-2, e a expressão reduzida de TIMP-1 nos carcinomas pode representar condição adequada à evolução tumoral.

Palavras-chave: graduação histológica, histopatologia, imuno-histoquímica, matriz extracelular, metástase, neoplasia mamária.

ABSTRACT

In bitches, mammary glands are the most common sites for the occurrence of neoplasms. To evaluate the biological behavior of these lesions is routinely employ descriptive histological methods that, combined with histological grading, help predict prognosis of these diseases. The imbalance between the amount of tissue matrix metalloproteinases (MMPs), proteolytic enzymes involved in physiological and pathological processes, and their inhibitors (TIMP), plays an important role in development and tumor invasion. To evaluate the biological behavior of some common types of breast tumor bitches this research was divided in two steps. The first one was correlating histological classification and degree of mammary neoplasms in bitches, and to correlating the degree of malignancy and tumor size. For this, 119 samples were evaluated in canine mammary tumors, all tumors were considered disorders of the growth of canine mammary gland, including neoplastic (benign and malignant) and non-neoplastic (hyperplastic changes). All tumors were classified and only the malignant were graded histologically and correlated with tumor size. It was concluded that the complex carcinoma is the most common cancer histological type and which has the lowest histological grade compared to other malignant tumor types. Further, neoplasms larger than five centimeters were predominantly malignant (92,3% or 12/13) and no correlation was observed between tumor size and histologic grade. The relation between histological classification and graduation helped in microscopic description of malignant mammary tumors in bitches. The second step was to evaluate the expression of MMP-9, MMP-2 TIMP-1 and TIMP-2 in normal and neoplastic canine mammary tissue. For this purpose it was selected 48 samples of canine mammary tissue, 14 complex carcinomas (CC), 13 tubulopapillary carcinoma (TC), six simple mammary adenoma (MA) and 15 normal breast (MN), and submitted to technical immunohistochemistry for the evaluation of the intensity staining and the number of epithelial and stromal cells selected. Differences were observed in the expression of MMP-9 and TIMP-1 and TIMP-2 according to the mammary histomorphology. The MMP-9 showed higher expression in epithelial and stromal cells of the CC and CT compared to MN. It was found a lower expression of TIMP-1 in stromal cells of the CC and overexpression of TIMP-2 in

epithelial cells of the CT. Also a positive correlation between MMP-9 and TIMP-1 and the intensity staining and number of epithelial and stromal cells marked in MN and between MMP-9 and TIMP-2 on TC neoplastic epithelial cells. It was concluded that there is variation between expression of MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 among the tumor types, and a positive correlation between TIMP-1 and MMP-9 in normal mammary gland and between MMP-9 and TIMP-2 in tubulopapilar carcinoma. The balanced expression of MMP-9, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 is essential for the homeostasis of canine normal mammary gland, while the overexpression of MMP-9 and TIMP-2, and the reduced expression of TIMP-1 in carcinomas represents an appropriate condition to the tumor development.

Keywords: mammary neoplasia, extracellular matrix, histologic graduation, histopathology, immunohistochemistry, metastasis.

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Aspectos anatomofisiológicos e histológicos da mama canina

A glândula mamária é considerada uma glândula sudorípara apócrina modificada, estruturalmente classificada como tubuloalveolar composta. Durante a vida intrauterina formam-se dois espessamentos paralelos e lineares que se estendem da região axilar à inguinal, denominados linhas mamárias ou cristas mamárias. As células de cada linha se aglutinam em alguns pontos, dando origem aos botões mamários. Em cada botão, as células epiteliais invaginam-se e formam vários cordões sólidos no mesênquima subjacente. Nos cordões, pelo processo de cavitação, forma-se um lúmen que se comunica externamente com a epiderme. O mesênquima dérmico diferencia-se em tecido conjuntivo frouxo, dando sustentação aos ductos e às ramificações, e em tecido conjuntivo denso, formando feixes que dividem a glândula em lobos (CUNNINGHAM, 2007; SORENMO et al., 2011).

Durante a vida das fêmeas caninas, a glândula mamária sofre estímulos sucessivos que levam a sua diferenciação para que ocorra a produção do leite. Na fêmea que ainda não atingiu a puberdade, a mama é formada por um sistema tubular ramificado rudimentar, ligado a ductos lactíferos. Ao atingir a puberdade, sob influência do estrógeno, ocorre o desenvolvimento dos túbulos, com a formação de um botão na porção terminal, além de discreto aumento das células adiposas. Nas cadelas gestantes, a progesterona promove a proliferação das células epiteliais da porção terminal dos ductos interlobulares, bem como o alongamento e a ramificação terciária do sistema de ductos. Os ductos dão origem a múltiplos lóbulos e se desenvolvem os alvéolos, as unidades secretoras da glândula mamária (unidade lobuloalveolar) (GUYTON & HALL, 2002). Sob a influência de prolactina, as células alveolares sofrem mudanças, tornando-se secretoras. Assim, no parto, a glândula mamária consiste de uma estrutura ductolobuloalveolar, através da qual o produto da unidade lobuloalveolar é transmitido, via ductos e condutos, para os seios do teto e remoção pelo recém-nascido (SORENMO, 2003). Quando termina a lactação, a maioria dos

alvéolos é reabsorvida e a mama diminui de volume (PELETEIRO, 1994; CUNNINGHAM, 2007). A Figura 1 ilustra a relação entre hormônios e a diferenciação celular na glândula mamária canina.

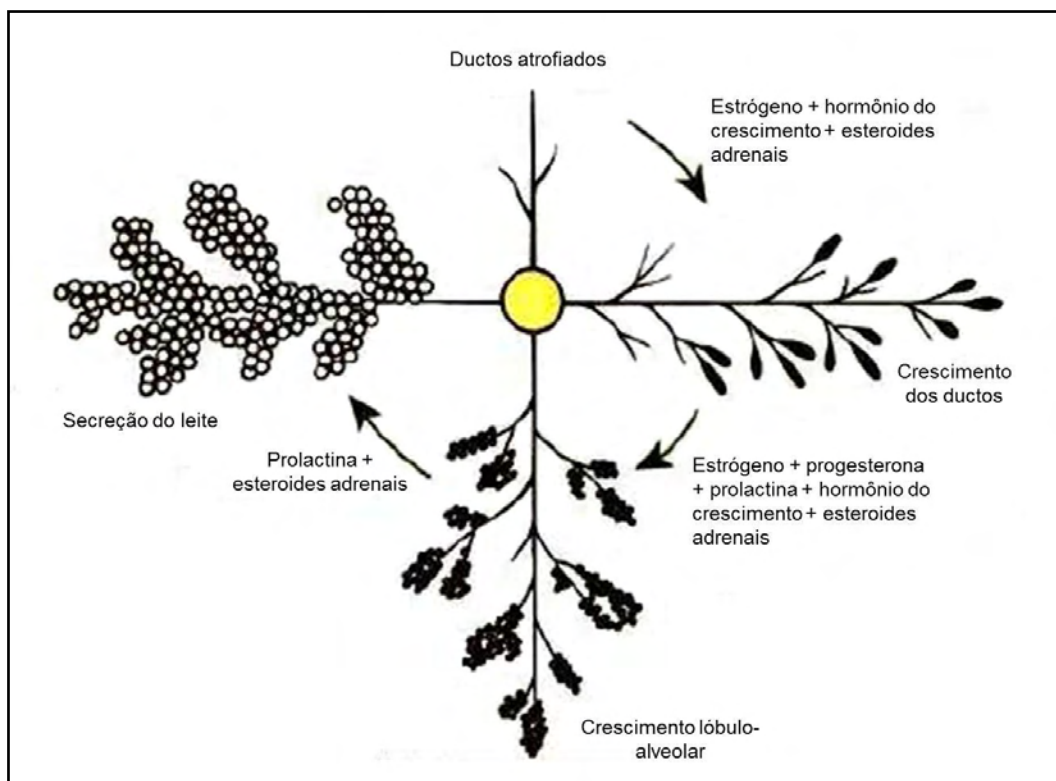


FIGURA 1 - Hormônios e seus efeitos no desenvolvimento da glândula mamária das cadelas
Fonte: adaptado de CUNNINGHAM (2007)

A maioria das cadelas possui cinco pares de glândulas mamárias, entretanto, alguns animais podem apresentar quatro a seis pares de glândulas. A nomenclatura de cada par decorre de sua localização anatômica, havendo dois pares torácicos (cranial e caudal), dois abdominais (cranial e caudal) e um inguinal (ZUCCARI et al., 2001; SORENMO et al., 2011).

Em cadelas normais e saudáveis a drenagem linfática das glândulas mamárias é realizada por ductos linfáticos direcionados aos linfonodos regionais, não havendo drenagem para a cadeia e linfonodos contralaterais. Assim, as mamas torácicas craniais e caudais e parte das abdominais craniais são drenadas para o linfonodo axilar. Já a drenagem de parte das abdominais craniais, bem como das abdominais caudais e inguinais é direcionada ao linfonodo inguinal superficial. Portanto, a mama abdominal cranial pode possuir

drenagem mista (Figura 2) (ZUCCARI et al., 2001; QUEIROGA & LOPES, 2002). Entretanto, PATSIKAS et al. (2006) demonstraram que cadelas portadoras de tumores mamários podem apresentar diferenças na drenagem linfática quando comparadas àquelas sem neoplasias, já que animais com carcinoma mamário localizado na mama inguinal podem exibir metástase retrógrada a partir do plexo linfático subcutâneo para a região interna do membro pélvico e para o linfonodo poplíteo.

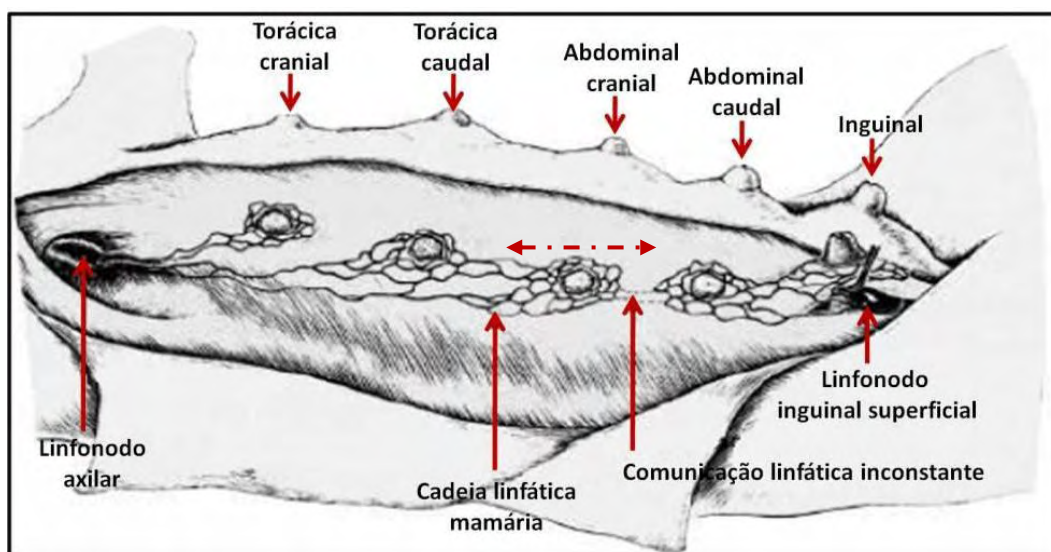


FIGURA 2 - Cadeia mamária canina e sua respectiva drenagem linfática. A drenagem linfática da mama abdominal cranial pode ocorrer pela cadeia direcionada tanto ao linfonodo axilar quanto ao inguinal superficial (seta pontilhada)

Fonte: adaptado de QUEIROGA & LOPES (2002)

Todas as mamas apresentam características estruturais semelhantes, sendo formadas por alvéolos secretores, cujo produto de secreção é transportado a ductos progressivamente mais calibrosos. Um ou dois alvéolos drenam para um ducto secretor, seguido pelo ducto intralobular e depois ao ducto lobar. Cada ducto lobar é formado pela confluência de numerosos ductos lobulares, e vários ductos lobares unem-se para formar o seio lactífero, que drena, por fim, para o canal do teto (CUNNINGHAM, 2007).

Cada alvéolo é revestido por epitélio cilíndrico simples, capaz de sintetizar proteínas e lipídios durante a lactação. Os ductos secretores e intralobulares são formados por epitélio cúbico ou cilíndrico simples e, à

medida que se unem para formar o ducto lobar, o epitélio se torna cilíndrico biestratificado (SORENMO et al., 2011).

Os ductos, assim como os alvéolos, são circundados por células mioepiteliais contráteis, que se assemelham a fibras musculares lisas e se contraem sob a influência da ocitocina, secretando o leite. Além do tecido epitelial, há fibroblastos e células que compõem e sustentam o tecido mamário (ZUCCARI et al., 2001; CUNNINGHAM, 2007), sendo essa formação de extrema importância no que diz respeito ao estudo das neoplasias mamárias, já que há relação entre os componentes neoplásicos e o prognóstico (MISDORP et al., 1999).

2. Neoplasias mamárias na fêmea canina

Entre todas as neoplasias diagnosticadas em caninos, as de origem na glândula mamária estão entre as de maior frequência. Considerando apenas as fêmeas caninas, essas representam aproximadamente 52% do total de neoplasias (WITHROW & VAIL, 2007).

Macroscopicamente, as neoplasias mamárias podem ser grandes ou pequenas, móveis ou fixas, ulceradas ou não, bem como podem apresentar aspecto sólido ou cístico e crescer e/ou infiltrar os tecidos com extrema rapidez, como nos casos dos carcinomas anaplásicos (WITHROW & VAIL, 2007). Por sua natureza heterogênea, se expressam de forma variada em cada paciente, fato que reflete não somente a dificuldade de obter a cura da doença, mas também de determinar fatores de risco ao desenvolvimento de metástases (WEIGELT et al., 2005).

Dentre os prováveis fatores de risco ao desenvolvimento da neoplasia mamária, a exposição hormonal e a idade do animal estão entre os mais documentados. Alguns estudos apontam que cadelas castradas antes de 2,5 anos têm uma redução considerável no risco de desenvolvimento de tumores malignos, e que este risco pode ser ainda mais reduzido pela esterilização antes do primeiro (SORENMO, 2003). Contudo, BEAUVAIS et al. (2012), revisando pesquisas que abordavam a correlação entre castração e neoplasias mamárias, observou resultados discordantes. Esses autores

concluíram que a força da evidência entre castração e tumores mamários é fraca, frente a escassêz de estudos publicados que adequadamente abordam esta questão.

A possibilidade de desenvolvimento neoplásico mamário é menor em cadelas com menos de cinco anos, exceto naquelas já expostas a hormônios exógenos (PELETEIRO, 1994; MISDORP, 2002). Há relatos de que a partir dos oito anos há aumento na incidência desses processos, com maior número de casos ocorrendo entre 10 e 11 anos (WITHROW & VAIL, 2007; OLIVEIRA FILHO et al., 2010). Também a ingestão de dietas ricas em carne e sobrepeso antes de um ano de idade são apontados como fatores de risco para o desenvolvimento de neoplasias mamárias nas fêmeas caninas (PEREZ ALENZA et al., 1998; SORENMO et al., 2011).

Estudos sugerem que linhagens genéticas de algumas raças apresentam maior risco ao desenvolvimento dos tumores mamários (GOLDSCHMIDT et al., 2001; SORENMO et al., 2011). Contudo, as raças variam consideravelmente a depender do local da pesquisa. Entre as mais citadas encontram-se Poodle, Cocker Spaniel, Setter Inglês, Pointer, Pastor Alemão, Maltês, Yorkshire e Dachshund (YAMAGAMI et al., 1996; GOLDSCHMIDT et al., 2001).

Na fêmea canina, os cinco pares de glândulas podem desenvolver neoplasias benignas e malignas. Entretanto, aproximadamente 60% destes ocorrem nas mamas inguinais (PELETEIRO, 1994; MISDORP, 2002). A causa dessa ocorrência é desconhecida, mas pode estar relacionada ao maior volume tecidual dessas glândulas, ao maior número de receptores hormonais e, conseqüentemente, à maior possibilidade de alterações proliferativas em resposta ao estrógeno (MISDORP, 2002). Ressalte-se que neoplasias sincrônicas são referidas em ocorrência acima de 70% (SORENMO et al., 2009), as quais são comumente independentes e de histomorfologia distinta (MISDORP, 2002).

Uma característica importante da neoplasia maligna é a capacidade metastática. Cerca de 30% dos carcinomas mamários causam metástases, frequentemente através dos ductos linfáticos para os linfonodos regionais e pulmões. Quando considerados os sarcomas, 75% originam metástases, frequentemente pela via hematogena (SORENMO, 2003; HELLMÉN, 2005).

A análise histológica do tumor compreende instrumento fundamental à obtenção de informações consistentes quanto ao prognóstico da neoplasia mamária, devendo ser considerada passo indispensável na orientação terapêutica dessas lesões. Além disso, é essencial para a avaliação minuciosa dos linfonodos regionais e orientação quanto ao estadiamento clínico do paciente portador da neoplasia (SORENMO, 2003; WITHROW & VAIL, 2007).

Nas últimas décadas diversos protocolos de classificação histológica para os tumores mamários caninos foram propostos (FOWLER et al., 1974; GILBERTSON et al., 1983; MISDORP, 1999), sendo o da Organização Mundial de Saúde (OMS) o mais utilizado (Quadro 1). Contudo, alguns tipos tumorais não são descritos nesse protocolo e, recentemente, duas novas classificações foram propostas, incluindo essas lesões (Quadro 1) (CASSALI et al., 2011; GOLDSCHMIDT et al., 2011).

Antes da classificação de MISDORP et al. (1999) não havia um método de classificação consensual utilizado nas pesquisas, o que refletia em diferença significativa quanto à proporção de neoplasias benignas e malignas e quanto aos tipos tumorais observados pelos diferentes autores. Recentemente, em estudo retrospectivo realizado por OLIVEIRA FILHO et al. (2010), adotando o sistema de classificação proposto por MISDORP et al. (1999), de um total de 1647 tumores mamários, os malignos de maior ocorrência foram o carcinoma simples do tipo tubulopapilar (32,37%), o carcinoma complexo (24,47%), o carcinossarcoma (9,95%) e o carcinoma simples do tipo sólido (7,07%). Entre os tumores benignos, os que tiveram maior ocorrência foram o tumor misto benigno (40,26%), o adenoma simples (31,54%) e o adenoma complexo (24,36%).

QUADRO 1 - Classificação histológica dos tumores mamários de cadelas conforme critérios propostos por MISDORP et al. (1999), GOLDSCHMIDT et al. (2011) e CASSALI et al. (2011).

Classificação histológica dos tumores mamários caninos			
	MISDORP et al. (1999)	GOLDSCHMIDT et al. (2011)	CASSALI et al. (2011)
Tumores benignos	Adenoma Adenoma simples Adenoma complexo Adenoma basaloide Fibroadenoma Fibroadenoma de baixa celularidade Fibroadenoma de alta celularidade Tumor misto benigno Papiloma ductal	Adenoma simples Adenoma papilar intraductal Adenoma ductal Com diferenciação escamosa Fibroadenoma Mioepitelioma Adenoma complexo Tumor misto benigno	Adenoma Adenoma complexo ou adenomioepitelioma Adenoma basaloide Fibroadenoma Tumor misto benigno Papiloma ductal
Lesões hiperplásicas e displásicas	Hiperplasia ductal Hiperplasia lobular Hiperplasia epitelial Adenose Cisto Ectasia ductal Fibrose focal Ginecomastia	Ectasia ductal Hiperplasia lobular (adenose) Regular Com atividade secretória Com fibrose interlobular Com atipia Epitelioma Papilomatose Alteração fibroadenomatosa Ginecomastia	Hiperplasia epitelial Ductal Lobular Adenose Lesões de células colunares Mudança em células colunares Hiperplasia Lesões atípicas
Tumores malignos	Carcinoma não infiltrativo (<i>In situ</i>) Carcinoma complexo Carcinoma simples Carcinoma tubulopapilar Carcinoma sólido Carcinoma anaplásico Tipos especiais de carcinomas Carcinoma de células espinhosas Carcinoma de células escamosas Carcinoma mucinoso Carcinoma rico em lipídio Sarcoma Fibrossarcoma Osteossarcoma Outros sarcomas Carcinossarcoma Carcinoma ou sarcoma em tumor benigno	Neoplasias epiteliais malignas Carcinoma <i>in situ</i> Carcinoma simples Tubular Tubulopapilar Papilar-cístico Cribriforme Carcinoma micropapilar invasivo Carcinoma sólido Comedocarcinoma Carcinoma anaplásico Carcinoma em adenoma complexo / tumor misto benigno Carcinoma complexo Carcinoma e epitelioma maligno Carcinoma misto Carcinoma ductal Carcinoma papilar intraductal Tipos especiais de carcinomas Carcinoma de células escamosas Carcinoma adenoescamoso Carcinoma mucinoso Carcinoma rico em lipídio Carcinomas com células de morfologia fusiforme Mioepitelioma maligno Carcinoma de células escamosas do tipo células fusiformes Carcinoma de células fusiformes Carcinoma inflamatório Sarcomas Osteossarcoma Condrossarcoma Fibrossarcoma Hemangiossarcoma Outros sarcomas Carcinossarcoma	Neoplasias epiteliais malignas Carcinoma <i>in situ</i> Carcinoma ductal <i>in situ</i> Carcinoma lobular <i>in situ</i> Carcinoma em tumor misto benigno Carcinoma complexo ou adenomioepitelioma maligno Carcinoma Papilar Carcinoma tubular Carcinoma sólido Carcinoma micropapilar Carcinoma lobular invasivo Carcinoma lobular pleomórfico Carcinoma secretório Carcinoma mucinoso Carcinoma rico em lipídio Carcinoma de células escamosas Carcinoma de células fusiformes Carcinoma Anaplásico Carcinoma com diferenciação sebácea Sarcomas Fibrossarcoma Osteossarcoma Carcinossarcoma Sarcoma em tumor misto benigno Outros sarcomas

Estudos epidemiológicos realizados em diversos países apontam diferenças entre as porcentagens de tumores malignos e benignos (ZUCCARI et al., 2001; MISDORP, 2002; ITOH et al., 2005; OLIVEIRA FILHO et al., 2010), explicadas, em parte, pela forma da coleta de dados. Estudos cuja porcentagem é obtida a partir de material submetido ao laboratório tendem a apresentar maior prevalência de tumores malignos, visto que nódulos pequenos, normalmente lesões benignas, não são removidos ou encaminhados para a avaliação histopatológica (OLIVEIRA FILHO et al., 2010). Ainda, durante a avaliação histopatológica, superestimar núcleos grandes e nucléolos proeminentes pode levar ao excesso de diagnósticos de carcinoma mamário (GOLDSCHMIDT et al., 2011). Entretanto, os critérios mais importantes para a confirmação de carcinoma mamário são tipo de tumor, pleomorfismo nuclear e celular significativos, índice mitótico, presença de áreas de necrose distribuídas aleatoriamente dentro da neoplasia, invasão linfática e peritumoral e metástase em linfonodos regionais (MISDORP, 2002).

A classificação proposta pela OMS (MISDORP et al., 1999) refere-se ao carcinoma não infiltrativo e ao carcinoma anaplásico como os tumores mamários de melhor e pior prognóstico, respectivamente. Estudos demonstram ainda que cadelas com carcinoma complexo apresentam maior sobrevida do que aquelas com carcinoma simples. Os mecanismos que explicam esse fato não estão completamente esclarecidos, mas infere-se que as células mioepiteliais desse tipo tumoral promovam supressão nos mecanismos de invasão das células epiteliais (YAMAGAMI et al., 1996).

De forma geral, cadelas que apresentam sarcomas na glândula mamária possuem pior prognóstico do que aquelas com tumores de origem epitelial, à exceção do carcinoma anaplásico, que é frequentemente associado com metástase precoce e alto índice de recidiva pós-cirúrgica (SORENMO, 2003).

Devido à heterogeneidade dos tumores mamários, em alguns casos, apesar da evidência histológica indicar malignidade ou algum tumor comprovadamente de pior prognóstico, isso nem sempre implica em curso clínico maligno. Um carcinoma simples tubulopapilar, por exemplo, pode apresentar comportamento agressivo em um animal enquanto que em outro pode não haver recidiva ou metástases durante longos períodos após o

procedimento cirúrgico (MISDORP, 2002). Dessa forma, pode-se, associado ao método de classificação histológica descritiva, fazer uso do método de graduação histológica, descrito primeiramente em humanos por ELSTON & ELLIS (1998).

A graduação histológica foi proposta como uma forma auxiliar de prever o prognóstico em mulheres que apresentavam carcinomas mamários. Nesse sistema a anaplasia é mensurada a partir da formação de túbulos, da atividade mitótica e do pleomorfismo nuclear das células epiteliais tumorais. Para cada característica é atribuída uma pontuação individual de um a três e sua soma determina o grau histológico de malignidade da neoplasia (I, II ou III), sendo I para resultado da soma até o valor cinco, II para os valores seis e sete e III para oito e nove (ELSTON & ELLIS, 1998). Os autores observaram que o grau de malignidade obtido pela somatória de todas as características apresenta significado prognóstico nesses pacientes, ao passo que as notas individuais atribuídas a cada uma das variáveis, se avaliadas isoladamente, não são indicativas de prognóstico desfavorável.

3. Matriz Extracelular

A matriz extracelular (MEC) é uma rede complexa de componentes fibrosos e protéicos que preenchem os espaços intercelulares (PEREIRA et al., 2005). Proporciona arcabouço físico para a sustentação da estrutura tecidual, determinando a hidratação e, conseqüentemente, o volume do tecido, o que implica na criação de espaços para o transporte de moléculas, na organização dinâmica e na resistência às forças de compressão (SOUZA & PINHAL, 2011). Dessa forma, a MEC é responsável pela diversidade morfológica, funcional e patológica dos tecidos, proporcionando substrato apropriado para o crescimento e a diferenciação dos diferentes tipos celulares (BORNSTEIN & SAGE, 2002).

Entre os componentes da MEC encontram-se vários tipos de macromoléculas (proteoglicanos e glicosaminoglicanas), proteínas fibrilares como colágeno, e proteínas não-fibrilares como, laminina, fibronectina, tenascina, entactina e ondulina (PEREIRA et al., 2005). A síntese e secreção

dos seus componentes são realizadas por fibroblastos, condroblastos, osteoblastos e odontoblastos nos tecidos conjuntivo, cartilaginoso e ósseo, respectivamente. Algumas células epiteliais e musculares lisas também produzem e secretam os constituintes da membrana basal (FILHO et al., 2011).

A membrana basal (MB) ou lâmina basal, uma forma especializada da MEC (BORNSTEIN & SAGE, 2002), é considerada a primeira barreira contra a invasão neoplásica (EGEBLAD & WERB, 2002). Compreende uma camada delgada e flexível de matriz extracelular que se localiza sob o epitélio ou envolvendo células musculares e adiposas, separando-as do tecido conjuntivo adjacente (BORNSTEIN & SAGE, 2002).

Os componentes da MEC são renovados constantemente, mas com velocidade variável nos diferentes órgãos (FILHO et al., 2011). Quatro grandes famílias de proteínas são responsáveis por sua degradação proteolítica, as metaloproteinases, as aspartilproteases, as cisteínoproteases e as serinoproteases (NAKAHATA et al., 2009). Contudo, sua degradação depende, sobretudo, da ação das metaloproteinases (BREHMER et al., 2003).

4. Metaloproteinases de matriz, inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz e seu envolvimento nos processos neoplásicos

As metaloproteinases (MMP) constituem uma família de enzimas proteolíticas cuja atividade depende de cálcio e zinco. São diferenciadas entre si pela estrutura e habilidade em degradar um grupo específico de proteínas da MEC, sendo que, juntas, podem degradar todos os seus componentes protéicos (BREHMER et al., 2003). São encontradas em pequena quantidade nos tecidos, desempenhando diversas funções, como a regulação de processos inflamatórios, a remodelação tecidual, o desenvolvimento dos órgãos, a involução mamária, a reabsorção óssea e a embriogênese (PAGE-McCAW et al., 2007).

A família das MMP é representada por mais de 25 enzimas, categorizadas quanto a sua localização celular em secretada (MMP) ou ligada à membrana (MT-MMP). Já quanto a sua estrutura e especificidade de substrato se dividem em collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18),

que clivam a tripla hélice do colágeno; gelatinases (MMP-2 e MMP-9), que degradam o colágeno e a gelatina desnaturada; do tipo de membrana (MT1-MMP a MT6-MMP, também conhecidas como MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25, respectivamente), responsáveis por degradar fibronectina, gelatina, agregan e outros substratos da MEC; estromelinas (MMP-3, MMP-10 e MMP-11), que degradam os proteoglicanos; e as matrilisinas (MMP-7), que degradam fibronectina e laminina (VISSE & NAGASE, 2003; PAGE-McCAW et al., 2007). Na Tabela 1 estão representadas as principais MMP e seus substratos.

TABELA 1 - Principais metaloproteinases e seus substratos específicos.

Colagenases	MMP-1	Colágenos tipos I, II, III, VII e X
	MMP-8	Colágenos tipos I, II, III, VII e X
	MMP-13	Colágenos tipos I, II, III, IV, VII, X, XIV; tenascina, agregan e fibronectina
	MMP-18	Colágenos tipos I, IV, V, X; laminina-5 e TGF- β
Gelatinases	MMP-2	Colágeno tipo IV, Gelatinas tipo I, IV, V e X; laminina-5 e TGF- β
	MMP-9	Colágeno tipo IV, Gelatinas tipo I, IV, V e X; laminina-5 e TGF- β
Estromelinas	MMP-3	Colágenos tipos III, IV, IX e X; gelatina; pró-MMP-1; laminina; proteoglicano; fibronectina, elastina, E-caderina; percelana e pró-MMP-13
	MMP-10	Colágenos tipos III, IV, IX e X; gelatina; pró-MMP-1; lâminina e proteoglicanos
	MMP-11	Alfa-1-antiprotease
Matrilisinas	MMP-7	Gelatina, fibronectina, pró-MMP-1; laminina e colágeno IV
Metaloproteinases de membrana	MMP-14	Pró-MMP-2; gelatina, colágenos, fibronectina e proteoglicanos
	MMP-15	Pró-MMP-2; fibronectina; tenascina e laminina
	MMP-16	Pró-MMP-2; gelatina; colágeno III e fibronectina
	MMP-17	Não determinado
	MMP-24	Não determinado
	MMP-25	Colágeno IV, gelatina, fibronectina, fibrina

Fonte: Adaptado de RODASKI & PIEKARZ (2009)

As MMP revelam domínios estruturais distintos. A maioria delas possui três domínios, o pró-peptídeo, o catalítico e o C-terminal, semelhante à hemoperoxina, que está ligado ao domínio catalítico por uma região de ligação dobradiça flexível (KESSENBROCK et al., 2010). Além dos citados, as MT-MMP também possuem um domínio transmembrânico C-terminal, enquanto as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) apresentam repetições de fibronectina do tipo II inseridas no domínio catalítico, e a MMP-7 (matrilisina) carece de um domínio C-terminal (Figura 3) (BOURBOULIA & STETLER-STEVENSON, 2010).

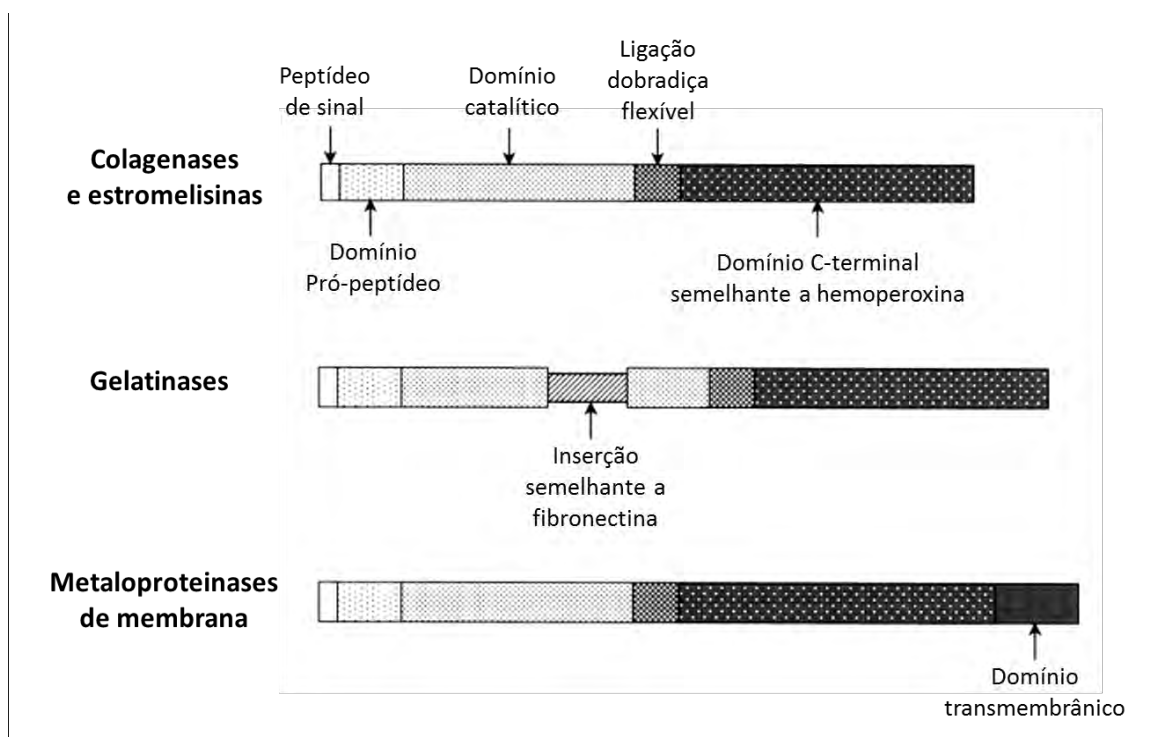


FIGURA 3 - Estrutura das MMP. As colagenases, estromelisinases, gelatinases e MT-MMP apresentam em comum os domínios pró-peptídeo, catalítico e C-terminal semelhante a hemoperoxina. As gelatinases apresentam região de inserção semelhante a fibronectina no domínio catalítico e as MT-MMP possuem o domínio transmembrânico

Fonte: adaptado de CURRAN & MURRAY (2000)

As MT-MMP estão ligadas covalentemente à membrana celular enquanto as MMP secretadas localizam-se na superfície celular por meio de ligações com integrinas ou de interação com proteoglicanos e colágeno tipo IV (EGEBLAD & WERB, 2002). Cada tipo de MMP é ativado de maneira distinta,

sendo que a ativação das MMP tipo secretada ocorre no meio extracelular e a das MMP tipo membrana, no intracelular (RUNDHAUG, 2003).

As MMP são secretadas no ambiente pericelular na forma de pró-enzimas inativas, denominadas zimógenos, devido à interação de um resíduo de cisteína do domínio pró-peptídeo com os íons de zinco do sítio catalítico. Somente após a interrupção dessa ligação no meio extracelular, pelas serinaproteases como a plasmina, a triptase e a quinase, que a enzima se torna ativa (Figura 4) (STAMENKOVIC, 2000; VISSE & NAGASE, 2003). Além disso, algumas MMP podem ser ativadas por processos de autoativação ou autoclivagem, bem como por uma cascata em que uma MMP ativa é capaz de ativar uma MMP latente (STAMENKOVIC, 2000). Outras, como a MMP11, MMP28 e as MT-MMP, podem ser ativadas no meio intracelular por furinas citoplasmáticas semelhantes às serinaproteases antes de alcançar a superfície celular (STERNLICHT & WERB, 2001).

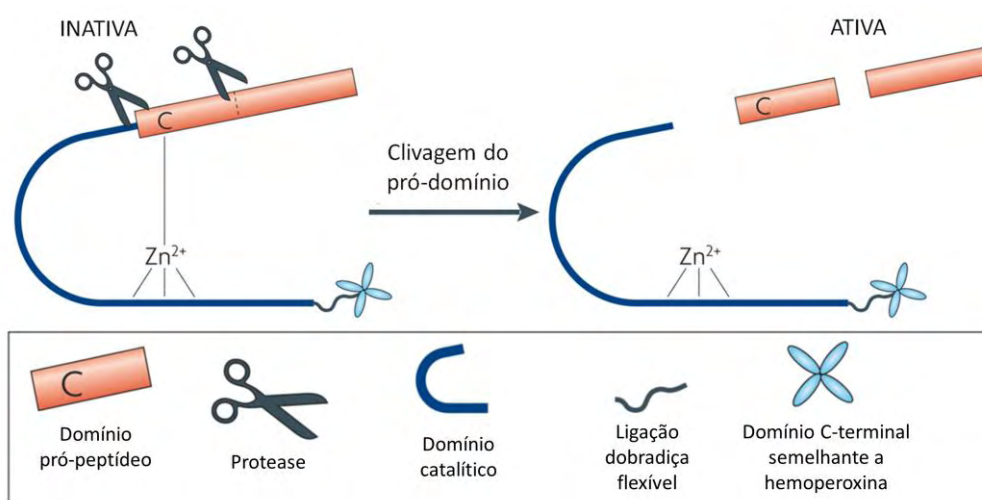


FIGURA 4 - Mecanismo de ativação das metaloproteínases. O domínio pró- é removido pela combinação de uma clivagem no domínio e uma clivagem entre o domínio pró-peptídeo e o domínio catalítico
Fonte: adaptado de PAGE-McCAW et al. (2007)

As principais células envolvidas na síntese e secreção das MMP são as inflamatórias, como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos e mastócitos, e ainda células endoteliais, fibroblastos e células progenitoras hematopoiéticas (KESSENBRÖCK et al., 2010). Normalmente as MMP são

sintetizadas em quantidades muito baixas, sendo sua atividade proteolítica regulada em três níveis: transcrição, ativação proteolítica do zimogênio e inibição da enzima ativa pela presença de inibidores específicos das MMP, nomeados inibidores teciduais de metaloproteinases, os TIMPs (MURPHY & NAGASE, 2008). Por isso, a degradação da MEC em situações fisiológicas está relacionada ao equilíbrio entre a produção, a ativação e a inibição, o que impede sua proteólise excessiva (NAGASE et al., 2006).

Além de participar da degradação dos componentes estruturais da MEC, a proteólise promovida pelas MMP pode criar um espaço para a migração celular, além de regular a arquitetura tecidual, produzir substratos específicos de clivagem que desempenham alguma atividade biológica e podem também ativar, desativar ou modificar sinalizadores moleculares (STERNLICHT & WERB, 2001; ORTEGA & WERB, 2002; SCHENK & QUARANTA, 2003). Assim, direta ou indiretamente as MMP desempenham ampla gama de atividades importantes na fisiologia da célula (NAGASE et al., 2006).

Os TIMP são pequenas proteínas endógenas, de 21 a 28 kDa, que além de regular a atividade funcional das MMP por inibição, podem ativar MMP específicas (CURRAN & MURRAY, 1999). A família TIMP é composta pelas proteínas TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4, que possuem domínio N- e C-terminal com seis resíduos de cisteína conservados, que formam três pontes dissulfídicas cada. A região N-terminal liga-se ao domínio catalítico das MMP e inibe sua atividade enquanto que a C-terminal interage com as pró-formas, estabilizando o complexo inibidor da pró-enzima (BOURBOULIA & STETLER-STEVENSON, 2010).

Por regular a atividade das MMP, o principal papel fisiológico das TIMP é mediar a degradação da membrana basal (MB) e da MEC, assim como o desenvolvimento e a remodelação teciduais (WOESSNER & NAGASE, 2000). Outras funções atribuídas a essas proteínas incluem a modulação do crescimento, a proliferação, a migração e a invasão celular e os efeitos antiangiogênicos. Contudo, nem todos esses efeitos são mediados pela atividade inibitória das TIMP sobre as MMP (BREW & NAGASE, 2010).

Cada TIMP é capaz de inibir várias MMP, na razão de 1:1, formando complexos TIMP-MMP, incapazes de ligar-se ao substrato (CURRAN &

MURRAY, 2000). Entre todas, a TIMP-1 é a de menor capacidade inibitória por possuir baixa afinidade com as MT-MMP (MMP-14, MMP-16 e MMP-24) (BAKER et al., 2002; TALLANT et al., 2010). Entretanto, é capaz de inibir fortemente MMP-7, MMP-9, MMP-1 e MMP-3 (BOURBOULIA & STETLER-STEVENSON, 2010). A TIMP-2 é o único membro das TIMP capaz de agir como inibidor e ativador das MMP, e pode interagir com MT1-MMP e pró-MMP-2, facilitando a ativação da pró-MMP (BOURBOULIA & STETLER-STEVENSON, 2010). A TIMP-3 inibe MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-13 e liga-se tanto à pró-MMP-2 quanto à pró-MMP-9. Já a TIMP-4 pode se ligar a pró-MMP-2 e inibir as MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9 e MMP-14 (TALLANT et al., 2010).

A regulação da atividade das TIMP é realizada por citocinas (IL-1, IL-6) e fatores de crescimento, de forma semelhante ao que ocorre nas MMP (SUN, 2010). Sua concentração tissular geralmente excede em muito a concentração de MMP, limitando assim a atividade proteolítica destas enzimas para alguns focos pericelulares (STETLER-STEVENSON, 2008).

As primeiras evidências da participação das MMP na progressão dos processos neoplásicos foram verificadas a partir de estudo em animais. COUSSENS & WERB (1996) demonstraram que células cancerosas benignas adquiriam propriedades malignas com o aumento da expressão das MMP. Por outro lado, células malignas tornavam-se menos agressivas quando a expressão ou a atividade das MMP reduziam. Ainda, ITOH et al. (1998), ao realizar injeção intravenosa de células neoplásicas em camundongos, observaram que animais deficientes em MMP-2 e MMP-9 apresentavam menor capacidade de colonização metástática pulmonar quando comparados ao camundongo normal.

Para avaliar o papel das MMP nos tumores os estudos têm utilizado métodos como hibridização *in situ* (CARDILLO et al., 2006), imunohistoquímica (LOUKOPOULOS et al., 2003), zimografia (JOBIM et al., 2009), *western-blotting* (HOFMANN et al., 1999), ensaio imunoenzimático (ELISA) (WILSON et al., 2006) e reação em cadeia da polimerase (PCR) (ARESU et al., 2011).

Em humanos, a primeira função atribuída às MMP nas neoplasias malignas foi a promoção de metástases, a partir da criação de um caminho na

MEC pelo qual as células neoplásicas pudessem passar e colonizar tecidos distantes (LIOTTA et al., 1982). Na medicina, a expressão e a atividade das MMP estão associadas a metástase, invasão e pior prognóstico em tumores pulmonares, mamários, gástricos, neuroblastoma, melanomas, condrossarcomas e carcinomas prostáticos, colorretais, orais, esofágicos e de células escamosas (CURRAN & MURRAY, 1999).

Sabe-se que, além de afetar a proliferação, a adesão e a migração das células, as MMP podem liberar fatores de crescimento e gerar fragmentos ou proteínas funcionais a partir da degradação da MEC (NOËL et al., 2008). As células neoplásicas podem estimular as células do estroma a sintetizar MMP de forma parácrina, pela secreção de interleucinas, interferons e fatores de crescimento (STERNLICHT & WERB, 2001), e estas, por sua vez, podem ativar outras peptidases (NAKAHATA et al., 2009). Com isso, as células neoplásicas são capazes de criar um microambiente que suporta o crescimento e inibe sinais apoptóticos, o que contribui para a progressão tumoral (BOURBOULIA & STETLER-STEVENSON, 2010).

Por degradar o colágeno tipo IV como substrato primário, e este ser um dos maiores constituintes da MB, maior atenção tem sido focada nas gelatinases A (MMP-2) e B (MMP-9) e em seus inibidores, TIMP-1 e TIMP-2, considerando sua provável relevância no processo invasivo das neoplasias malignas (PUCCI-MINAFRA et al., 2000). A MMP-2 e a MMP-9 são expressas por diversas células normais e neoplásicas, cujos substratos são principalmente colágeno IV, V, elastina, gelatina, fibronectina e laminina (RODASKI & PIEKARZ, 2009), sendo que a atividade enzimática ocorre preferencialmente nas células estromais adjacentes às tumorais (BREHMER et al., 2003).

Em humanos há associação entre a expressão de MMP-9 e um pior prognóstico quando considerados as neoplasias mamárias (VAN'T VEER et al., 2002). Também, o aumento de sua expressão já foi observado em células endoteliais pré-malignas no pulmão (HIRATSUKA et al., 2002). Além disso, a maior expressão de MMP-2 em carcinomas de bexiga mostrou-se proporcional ao maior índice metastático deste aos pulmões (HUA & MUSCHEL, 1996).

Em cães pouco se conhece sobre o papel das metaloproteinases no processo de evolução dos diferentes tipos de neoplasias. Em um estudo,

LOUKOPOULOS et al. (2003) demonstraram níveis mais elevados de pró-MMP-9, pró-MMP-2 e MMP-2 ativa em algumas neoplasias malignas, como o osteossarcoma e o condrossarcoma, quando comparadas à neoplasias benignas. Notaram ainda que sarcomas apresentavam maior quantidade de MMP-2 do que carcinomas e que os níveis teciduais de pró-MMP-9 estão relacionados ao grau histológico de osteossarcomas.

ARESU et al. (2011), avaliando tumores mamários de cadelas, observaram maior imunomarcagem de MMP2, MMP-9 e MT-MMP1 em células mesenquimais perineoplásicas e epiteliais malignas quando comparadas aos adenomas mamários. Observaram também menor imunomarcagem de TIMP-2 e MMP-13 nos carcinomas. Ainda, acentuada expressão de MMP-2 e MMP-9, e menor de TIMP-1 e TIMP-2 foram observadas por KAWAI et al. (2006) em carcinomas mamários quando comparados aos adenomas.

No tecido prostático, FALEIRO (2010), avaliando a imunomarcagem de MMP-2 e MMP-9 em próstatas caninas normais com lesões proliferativas, observou menor expressão destas enzimas nos tecidos normais e com hiperplasia prostática benigna quando comparadas a atrofia inflamatória proliferativa, neoplasia intraepitelial e carcinoma. Já DOCAMPO et al. (2011) observaram diferença na expressão de MMP-9 entre melanomas e melanocitomas, enquanto que para MMP-2 e MT-MMP1 não houve diferença.

Enquanto a maioria dos estudos se concentra no papel facilitador das MMP em relação às metástases (CURRAN & MURRAY, 2000, HIRATSUKA et al., 2002; LOUKOPOULOS et al., 2003), há alguns que se referem à função protetora de algumas dessas enzimas na progressão tumoral. Nesse contexto, McCAWLEY et al. (2004), comparando o comportamento biológico de camundongos deficientes em MMP-3 com carcinoma espinocelular e normais, observaram correlação positiva entre expressão de MMP-3, tumores de crescimento lento e progressão clínica branda. Ainda, de acordo com YANG et al., 2001, nas neoplasias de cólon em humanos, a expressão elevada de MMP-12 pelas células proliferadas está associada ao maior tempo de sobrevida.

Quanto as TIMP, apesar da expressão aumentada nas neoplasias ser relacionada a maior sobrevida (NAKOPOULOU et al., 2003), há referências contrárias, que apontam maior ocorrência de metástases e menor sobrevida

nos pacientes com aumento dessas proteínas nas neoplasias malignas (WURTZ et al., 2005; VIZOSO et al., 2007; BREW & NAGASE, 2010). O aumento na expressão das TIMP e sua correlação com o pior prognóstico tem sido atribuída às funções secundárias, não relacionadas com a inibição das MMP. O TIMP-1, por exemplo, desempenha atividades antiapoptótica, angiogênica e promotora de crescimento, o que pode resultar em favorecimento do desenvolvimento tumoral em relação à ação inibitória destes sobre as MMP (WURTZ et al., 2005).

Além do conhecimento do papel das MMP e TIMP na evolução dos diferentes tipos tumorais, também é de interesse a sua possível utilização como biomarcadores para o câncer, auxiliando na definição do prognóstico do paciente com câncer, e como possíveis fontes terapêuticas (BOURBOULIA & STETLER-STEVENSON, 2010).

5. REFERÊNCIAS

1. ARESU, L.; GIANTIN, M.; MORELLO, E.; VASCELLARI, M.; CASTAGNARO, M.; LOPPARELLI, R.; ZANCANELLA, V.; GRANATO, A.; GARBISA, S.; ARICÒ, A.; BRADASCHIA, A.; MUTINELLI, F.; DACASTO, M. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in canine mammary tumors, **BMC Veterinary Research**, London, v. 7, n. 33, 2011.
2. BAKER, A. H.; EDWARDS, D. R.; MURPHY, G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. **Journal of Cell Science**, London, v. 115, p. 3719-3727, 2002.
3. BEAUVAIS, W.; CARDWELL, J. M.; BRODBELT, D. C. The effect of neutering on the risk of mammary tumours in dogs – a systematic review. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v.53, p.314-322, 2012.
4. BORNSTEIN, P.; SAGE, H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 14, p. 608-616, 2002.
5. BOURBOULIA, D.; STETLER-STEVENSON, W. G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. **Seminars in Cancer Biology**, Philadelphia, v. 20, n. 3, p. 161-168, 2010.

6. BREHMER, B.; BIESTERFELD, S.; JAKSE, G. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and-9) and their inhibitors (TIMP-1 and -2) in prostate cancer tissue. **Prostate câncer and prostate diseases**, London, n. 6, p. 217-222, 2003.
7. BREW, K.; NAGASE, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1803, p. 55-71, 2010.
8. CARDILLO, M. R.; DI SILVEIRO, F.; GENTILE, V. Quantitative immunohistochemical and in situ hybridization analysis of metalloproteinases in prostate cancer. **Anticancer research**, Kapandriti, v. 26, n. 2, p. 973-982, 2006.
9. CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; DE NARDI, A. B.; FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A. C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, A. C.; DALECK, C. R.; SALGADO, B. S.; FERNANDES, C. G.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; AULER, P. A.; MAGALHÃES, G. M.; SILVA, J. O.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; OLIVEIRA, L. O.; MALM, C.; ZUCCARI, D. A. P. C.; TANAKA, N. M.; RIBEIRO, L. R.; CAMPOS, L. C.; SOUZA, C. M.; LEITE, J. S.; SOARES, L. M. C.; CAVALCANTI, M. F.; FONTELES, Z. G. C.; SCHUCH, I. D.; PANIAGO, J.; OLIVEIRA, T. S.; TERRA, E. M.; CASTANHEIRA, T. L. L.; FELIX, A. O. C.; CARVALHO, G. D.; GUIM, T. N.; GUIM, T. N.; GARRIDO, E.; FERNANDES, S. C.; MAIA, F. C. L.; DAGLI, M. L. Z.; ROCHA, N. S.; FUKUMASU, H.; GRANDI, F.; MACHADO, J. P.; SILVA, S. M. M. S.; BEZERRIL, J. E.; FREHSE, M. S.; PAES DE ALMEIDA, E. C.; CAMPOS, C. B. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, Belo Horizonte, v. 4, n.2, p. 153-180, 2011.
10. COUSSENS, L. M., WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. **Chemistry and Biology**, Cambridge, v. 3, p. 895-904, 1996.
11. CUNNINGHAM, J. G. The mammary gland. In: **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 4 ed. Saunders Elsevier, St. Louis: MO, USA, 2007, p. 517-425.
12. CURRAN, S.; MURRAY, G. I. Matrix Metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. **Journal of Pathology**, Sussex, v. 189, p. 300-308, 1999.
13. CURRAN, S.; MURRAY, G. I. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. **European Journal of Cancer**, New York, v. 36, p. 1621-1630, 2000.

14. DOCAMPO, M.; CABRERA, J.; RABANAL, R. M.; BASSOLS, A. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and membrane-type 1 matrix metalloproteinase in melanocytic tumors of dogs and canine melanoma cell lines. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 72, n. 8, p. 1087-1096, 2011.
15. EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the Matrix Metalloproteinase in Cancer Progression. **Nature Reviews/Cancer**, London, v. 2, p. 161-174, 2002.
16. ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Assessment of histological grade. In: **Systemic Pathology - The Breast**. 3. ed. Churchill and Livingstone, London, v. 13, p. 365–384, 1998.
17. FALEIRO, M. B. R. **Expressão de MMP-2, MMP-9 e upar- em próstatas caninas normais e com HPB, PIA, PIN e carcinoma**. Goiânia, 2010, 97p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária e Zootecania, Universidade Federal de Goiás.
18. FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 1, 2011, 1524p.
19. FOWLER, E. H.; WILSON, G. P.; KOESTER, A. Biologic behavior of canine mammary neoplasms based on a histogenic classification. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 11, p. 212-229, 1974.
20. GILBERTSON, S. R.; KURZMAN, I. D.; ZACHRAU, R. E.; HURVITZ, A. I.; BLACK, M. M. Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 20, n. 2, p. 127-42, 1983.
21. GOLDSCHMIDT, M. H.; SHOFR, F. S.; SMELSTOYS, J. A. Neoplastic lesions of the mammary gland. In: MOHR, U. **Pathobiology of the aging dog**. Ames, IA: Iowa State University Press, 2001. p. 168-178.
22. GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 48, n. 1, p. 117-131, 2011.
23. GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 973p.
24. HELLMÉN, E. Complex mammary tumours in the female dog: a review. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 72, p. 90-97, 2005.

25. HIRATSUKA, S.; NAKAMURA, K.; IWAI, S.; MURAKAMI, M.; ITOH, T.; KIJIMA, H.; SHIPLEY, J. M.; SENIOR, R. M.; SHIBUYA, M. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. **Cancer Cells**, New York, v. 2, n. 4, p. 289-300, 2002.
26. HOFMANN, U. B.; WESTPHAL, J. R.; WASS, E. T.; ZENDMAN, A. J.; CORNELISSEN, I. M.; RUITER, D. J.; Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression. **British Journal of Cancer**, Edinburgh, v. 81, n. 5, p. 774-782, 1999.
27. HUA, J.; MUSCHEL, R. J. Inhibition of matrix metalloproteinase 9 expression by a ribozyme blocks metastasis in a rat sarcoma model system. **Cancer Research**, Baltimore, v. 56, n. 22, p. 5279-5284, 1996.
28. ITOH, T.; TANIOKA, M.; YOSHIDA, H.; YOSHIOKA, T.; NISHIMOTO, H.; ITOHARA, S. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. **Cancer Research**, Baltimore, v.58, p.1048-1051, 1998.
29. ITOH, T.; UCHIDA, K.; ISHIKAWA, K.; KUSHIMA, K.; KUSHIMA, E.; TAMADA, H.; MORITAKE, T.; NAKAO, H.; SHII, H. Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: Differences between small-breed dogs and others. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 67, n. 3, p. 345-347, 2005.
30. JOBIM, F. C.; XAVIER, N. L.; UCHOA, D. M.; CRUZ, D. B.; SACIOTO, M.; CHEMELLO, N.; SCHWARTSMANN, G. Prevalence of vascular-endothelial growth factor, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in primary breast cancer. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.42, n.10, 2009.
31. KAWAI, K.; UETSUKA, K.; DOI, K.; NAKAYAMA, H. The activity of matrix metalloproteinase (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in mammary tumors of dogs and rats. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 68, n. 2, p. 105-111, 2006.
32. KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment, **Cell**, Cambridge, v. 141, n. 1, p. 52-67, 2010.
33. LIOTTA, L. A.; THORGEIRSSON, U. P.; GARBISA, S. Role of collagenases in tumor cell invasion. **Cancer and Metastasis Reviews**, Boston, v. 1, n. 4, p. 277-88. 1982.

34. LOUKOPOULOS, P.; MUNGALL, B. A.; STRAW, R. C.; THORNTON, J. R.; ROBINSON, W. F. Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Involvement in Canine Tumors. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 40, n. 4, p. 382-94, 2003.
35. McCAWLEY, L. J.; CRAWFORD, H. C.; KING, L. E., MUDGETT, J, MATRISIAN, L. M. A protective role for matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma. **Cancer Research**, Baltimore, v. 64, n. 19, p. 6965-6972, 2004.
36. MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, T. P. **Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide reference on Comparative Oncology, 1999. p. 1-59.
37. MISDORP, W. Tumours of the Mammary Gland. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**. Iowa State University Press, Ames, IA, 2002, p. 575-606.
38. MURPHY, G.; NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Molecular Aspects of Medicine**, Elmsford, v. 29, n. 5, p. 290-308, 2008.
39. NAGASE, H; VISSE, R; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular Research**, London, v. 69, p. 562-573, 2006.
40. NAKAHATA, A. M.; OLIVA, M. L. V.; OKAMOTO, O. K. Qual é a importância das peptidases em câncer? **Einstein**, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 237-242, 2009.
41. NAKOPOULOU, L.; GIANNOPOULOU, I.; LAZARIS, A.; ALEXANDROU, P.; TSIRMPA, I.; MARKAKI, S.; PANAYOTOPOULOU, E.; KERAMOPOULOS, A. The favorable prognostic impact of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 protein overexpression in breast cancer cells. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Kobenhavn, v. 111, p. 1027-1036, 2003.
42. NOËL, A.; JOST, M.; MAQUOI, E. Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface. **Seminars in Cell Developmental Biology**, London, v.19, n.1, p.52-60. 2008.
43. OLIVEIRA FILHO, J. C. O.; 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**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 2, p. 177-185, 2010.

44. ORTEGA, N.; WERB, Z. New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. **Journal of Cell Science**, London, v. 115, n. 22, p. 4201-4214, 2002.
45. PAGE-McCAW, A., EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 8, n. 3, p. 221-233, 2007.
46. PATSIKAS, M. N.; KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOY, E., PAPAZOGLU, L. G.; PAPADOPOULOU, P. L.; TZEGAS, S.I.; TZIRIS, N. E.; KAITZIS, D. G.; DIMITRIADIS, A. S.; DESSIRIS, A. K. The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, Berlin, v. 35, p. 228-234, 2006.
47. PELETEIRO, M. C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 89, n. 509, p. 10-29, 1994.
48. PEREIRA, A. L. A.; VERAS, S. S. L.; SILVEIRA, E. J. D.; SEABRA, F. R. G.; PINTO, L. P.; SOUZA, L. B.; FREITAS, R. A. The role of matrix extracellular proteins and metalloproteinases in head and neck carcinomas: an updated review. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, Rio de Janeiro, v. 71, n. 1, p. 81-86, 2005.
49. PEREZ ALENZA, D.; RUTTEMAN, G. R.; PENA, L. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 12, p. 132-139, 1998.
50. PUCCI-MINAFRA, I.; MINAFRA, S.; LA ROCCA, G.; BARRANCA, M.; FONTANA, S.; ALAIMO, G.; OKADA, Y. Zymographic analysis of circulating and tissue forms of colon carcinoma gelatinase A (MMP-2) and B (MMP-9) separated by mono- and two-dimensional electrophoresis. **Matrix Biology**, Stuttgart, v. 20, p. 419-427, 2000.
51. QUEIROGA, F.; LOPES, C. Canine mammary tumours, research on new prognostic factors. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 97, p. 119-127, 2002.
52. RODASKI, S.; PIEKARZ, C.H. Biologia do câncer. In: DALECK, C.R.; DE NARDI, A.B.; RODASKI, S. **Oncologia em Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, p. 23-51, 2009.
53. RUNDHAUG, J.E. Matrix metalloproteinases, angiogenesis and cancer. **Clinical Cancer Research**, Atlanta, v. 9, p. 551-554, 2003.

54. SCHENK, S.; QUARANTA, V. Tales from the cryptic sites of the extracellular matrix. **Trends Cellular Biology**, Cambridge, v. 13, n. 7, p. 366-375, 2003.
55. SELMAN, P. J.; VAN GARDEREN, E.; MOL, J. A.; VAN DER INGH, T. S. Comparison of the histological changes in the dog after treatment with the progestins medroxyprogesterone acetate and proligestone. **Veterinary Quarterly**, The Hague, v. 17, p. 128-133, 1995.
56. SORENMO, K. U. Canine mammary gland tumors. **The Veterinary Clinics - Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 33, p. 573-596, 2003.
57. SORENMO, K. U.; KRISTIANSEN, V. M.; COFONE, M. A.; SHOFR, F. S.; BREEN, A. M.; LANGELAND, M.; MONGIL, C. M.; GRONDAHL, A. M.; TEIGE, J.; GOLDSCHMIDT, M. H. Canine mammary gland tumors; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. **Veterinary and Comparative Oncology**, Madison, v. 7, p. 162-172, 2009.
58. SORENMO, K. U.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M. H. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 48, n. 1, p. 85-97, 2011.
59. SOUZA, R. S.; PINHAL, M. A. S. Interações em processos fisiológicos: a importância da dinâmica entre matriz extracelular e proteoglicanos. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, Santo André, v. 36, n. 1, p. 48-54, 2011.
60. STAMENKOVIC, I. Extracellular matrix remodeling: the role of matrix metalloproteinases. **Journal of Pathology**, Review, Sussex, v.200, p.448-464, 2003.
61. STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 17, p. 463-516, 2001.
62. STETLER-STEVENSON, W. G. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. **Science Signaling**, Washington, v. 1, n. 27, 2008.
63. STOVRING, M.; MOE, L.; GLATTRE, E. A population based case-control study of canine mammary tumors and clinical use of medroxyprogesterone acetate. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Kobenhavn, v. 105, p. 590-596, 1997.

64. SUN, J. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases are Essential for the Inflammatory Response in Cancer Cells. **Journal of Signal Transduction**, New York, p. 1-7, 2010.
65. TALLANT, C; MARRERO, A; GOMIS-RÜTH, F. X. Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1803, p. 20-28, 2010.
66. VAN'T VEER, L. J.; DAI, H.; VAN DE VIJVER, M. J.; HE, Y. D.; HART, A. A. M.; MAO, M.; PETERSE, H. L.; VAN DER KOOY, K. MARTON, M. J.; WITTEVEEN, A. T.; SCHREIBER, G. J.; KERKHOVEN, R. M.; ROBERTS, C.; LINSLEY, P. S.; BERNARDS, R.; FRIEND, S. H. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**, London, v. 415, n. 6871, p. 530-536, 2002.
67. VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, Baltimore, v. 92, n. 8, p. 827-829, 2003.
68. VIZOSO, F. J.; GONZALEZ, L. O.; CORTE, M. D.; RODRIGUEZ, J. C.; VAZQUEZ, J.; LAMELAS, M. L.; JUNQUERA, S.; MERINO, A. M.; GARCIA-MUNIZ, J. L. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. **British Journal of Cancer**, Edinburgh, v. 96, n. 6, p. 903-911, 2007.
69. WEIGELT, B.; PETERSE, J. L.; VAN'T VEER, L. J. Breast cancer metastasis: Markers and modelis. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 5, n. 8, p. 591-602, 2005.
70. WILSON, S.; WAKELAM, M. J.; HOBBS, R. F.; RYAN, A. V.; DUNN, J. A.; REDMAN V. D. Evaluation of the accuracy of serum MMP-9 as a test for colorectal cancer in a primary care population. **BMC Cancer**, London, v. 6, p. 258, 2006.
71. WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Small Animal Clinical Oncology**, 4.ed. St. Louis, Missouri, USA: Saunders, Elsevier, 2007, 864p.
72. WOESSNER, J. F.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and TIMPs. **Oxford University Press**, New York, p. 130-135, 2000.
73. WURTZ, S. O.; SCHROHL, A.; MOLLER, N.; SORENSEN, N.; LADEMANN, U.; CHRISTENSEN, I. J.; MOURIDSEN, H.; BRUNNER, N. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, Woodlands, v. 12, n. 215-227, 2005.

74. YAMAGAMI, T.; KOBAYASHI, T., TAKAHASHI, K., SUGIYAMA, M. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 58, p. 1079-1083, 1996.
75. YANG, W.; ARII, S.; GORRIN-RIVAS, M. J.; MORI, A.; ONODERA, H.; IMAMURA, M. Human macrophage metalloelastase gene expression in colorectal carcinoma and its clinicopathologic significance. **Cancer**, Philadelphia, v. 91, p. 1277-1283, 2001.
76. ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Fisiopatogenia da neoplasia mamária em cadelas. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 32, p. 50-54, 2001.

CAPÍTULO 2 - CLASSIFICAÇÃO E GRADUAÇÃO HISTOLÓGICAS APLICADAS AOS TUMORES MAMÁRIOS DE CADELAS

RESUMO

O método de graduação histológica descritiva, uma vez associado ao método de classificação, pode fornecer informações suficientes para prever o comportamento biológico da neoplasia mamária. Assim, este trabalho teve como objetivo relacionar a classificação e a graduação histológicas das neoplasias mamárias de cadelas, bem como correlacionar a graduação das neoplasias malignas e o tamanho tumoral. Para isso, foram selecionados 119 casos de neoplasias mamárias de cadelas no arquivo do Setor de Patologia Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (SPA/EVZ/UFG), Goiânia, GO, referentes ao período entre janeiro de 2007 a outubro de 2011. As neoplasias malignas foram reclassificadas, graduadas, e o tamanho do tumor correlacionado com o grau histológico. Concluiu-se que o carcinoma complexo é o tipo histológico mais comum (37,1%), e que possui menor grau histológico em relação aos demais tipos tumorais de classificação maligna. Ainda, neoplasias maiores que cinco centímetros foram predominantemente malignas (92,3% ou 12/13). Não se observou correlação entre tamanho tumoral e grau histológico. A relação entre a classificação e a graduação histológica compreendeu instrumento auxiliar na descrição microscópica dos tumores mamários malignos das cadelas.

Palavras-chave: glândula mamária, grau histológico, histopatologia.

CHAPTER 2 – HISTOLOGICAL CLASSIFICATION AND GRADE IN MAMMARY GLAND NEOPLASIA OF THE BITCH

ABSTRACT

The descriptive method of histological grading, once associated with the method of classification, may provide enough information to predict the biological behavior of mammary neoplasia. Therefore, the objective of this study was to correlate histological classification and degree of mammary neoplasms in bitches, and also to correlate the degree of malignancy and tumor size. For this purpose were selected 119 canine mammary neoplasia in the file of the Setor de Patologia Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (SPA/EVZ/UFG), Goiânia, GO, in the period from January 2007 to October 2011. Malignant neoplasias were reclassified, graduated, and the tumor size was correlated with the histological grade. It was concluded that the complex carcinoma is the most common histological type and which has a lower histological grade compared to other malignant tumor types (37,1%). Further, neoplasms larger than five centimeters were predominantly malignant (92,3% or 12/13). No correlation was observed between tumor size and histologic grade. The relationship between histological classification and graduation helped in microscopic description of malignant mammary tumors in bitches.

Keywords: mammary gland, tumor grade, histopathology.

INTRODUÇÃO

Entre todos os tipos de neoplasias diagnosticadas nas fêmeas caninas, as de origem na glândula mamária representam cerca de 52% (RUTTEMAN et al. 2001). A classificação histológica destas lesões é indispensável, devendo ser considerada um dos passos para a definição prognóstica e a orientação terapêutica (RUTTEMAN et al. 2001). Além disso, é essencial para a avaliação minuciosa dos linfonodos regionais ao tumor, visando a determinação do estágio clínico da neoplasia (WITHROW & VAIL, 2007).

A fim de prever o comportamento biológico das neoplasias mamárias caninas, inúmeras classificações histológicas foram propostas (DUTRA et al., 2004). Entretanto, a heterogeneidade histológica observada nestas lesões implica em dificuldades consideráveis na concepção de um sistema de classificação que garanta a reprodutibilidade de uma categorização prognóstica consistente. Essas dificuldades são refletidas pelos diferentes sistemas de classificação até agora propostos (FOWLER et al., 1974; GILBERTSON et al., 1983; MISDORP, 1999; CASSALI et al., 2011; GOLDSCHMIDT et al., 2011).

Frente às dificuldades para realizar a classificação histopatológica, sua associação aos métodos de gradação histológica pode fornecer informações suficientes para prever o comportamento biológico da neoplasia mamária (KARAYANNOPOULOU et al., 2005). Em humanos, o método mais amplamente utilizado para a gradação destas lesões é o de Elston e Ellis, que têm mostrado forte relação com o prognóstico em mulheres acompanhadas no período pós-cirúrgico (ELSTON & ELLIS, 1998). Entretanto, os critérios para o escore das neoplasias mamárias não são utilizados sistematicamente em medicina veterinária, o que ainda tem limitado a predição prognóstica (FERREIRA et al., 2003).

Este trabalho teve como objetivo relacionar a classificação e a gradação histológicas das neoplasias mamárias de cadelas, bem como correlacionar a gradação das neoplasias malignas e o tamanho da lesão.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 119 tumores mamários caninos no arquivo do Setor de Patologia Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (SPA/EVZ/UFG), Goiânia, GO, referentes ao período entre janeiro de 2007 a outubro de 2011. Foram considerados tumores mamários os distúrbios do crescimento da glândula mamária canina, incluindo os neoplásicos (benignos e malignos) e os não neoplásicos (alterações hiperplásicas).

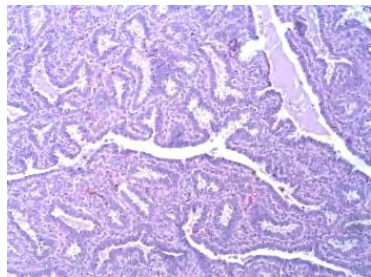
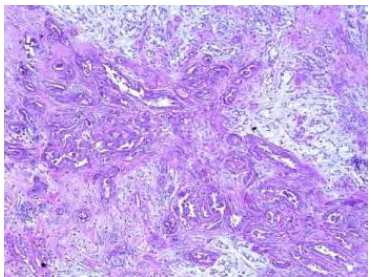
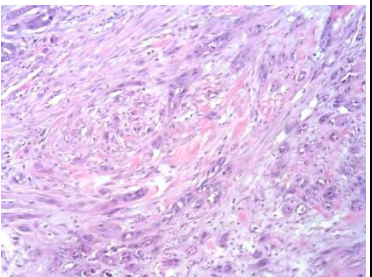
As lâminas referentes aos casos foram reavaliadas e classificadas conforme os critérios histomorfológicos propostos por GOLDSCHMIDT et al. (2011) para tumores mamários de cadelas, sendo as proliferações malignas submetidas a graduação histológica. Dados como raça, idade e tamanho do tumor foram registrados. Conforme preconiza a Organização Mundial da Saúde (MISDORP, 2002) foram classificados em T1 os tumores menores que 3cm, em T2 os que mediam de 3-5 cm, e em T3 os maiores que 5cm.

As neoplasias mamárias malignas foram graduadas de acordo com os critérios de ELSTON & ELLIS (1998), que constituem método semiquantitativo, com a avaliação de três parâmetros: formação tubular, contagem mitótica e pleomorfismo nuclear. Para cada parâmetro foi atribuído um escore numérico de um a três, e a soma destes produziu o grau do tumor, estabelecido em Grau 1 quando da soma entre 3-5, Grau 2 entre 6-7 e Grau 3 entre 8-9.

Os túbulos foram avaliados à objetiva de 4x e considerados bem formados quando era possível identificar um lúmen claro. Atribuíram-se o escore um quando havia mais de 75% de túbulos bem formados na neoplasia, o escore dois quando estes estavam presentes entre 10 e 75% do tumor e o escore três para neoplasias com menos de 10% de túbulos bem formados (Quadro 1).

Em cada neoplasia, as mitoses foram contadas em dez campos à objetiva de 40x, sendo atribuídos os escores um quando da contagem até sete, dois, entre 8-17, e três, acima de 17 mitoses.

QUADRO 1 - Escores aplicados à quantidade de túbulos para a obtenção do grau dos tumores mamários malignos de cadelas

Escore 1 Formação tubular >75%	Escore 2 Formação tubular entre 10 e 75%	Escore 3 Formação tubular <10%
		

Contaram-se apenas as mitoses características (Figura 1), excluindo-se estruturas nucleares que se assemelhassem a núcleos picnóticos ou em cariorrexia, bem como campos que apresentavam apenas tecido conjuntivo de sustentação ou áreas de necrose.

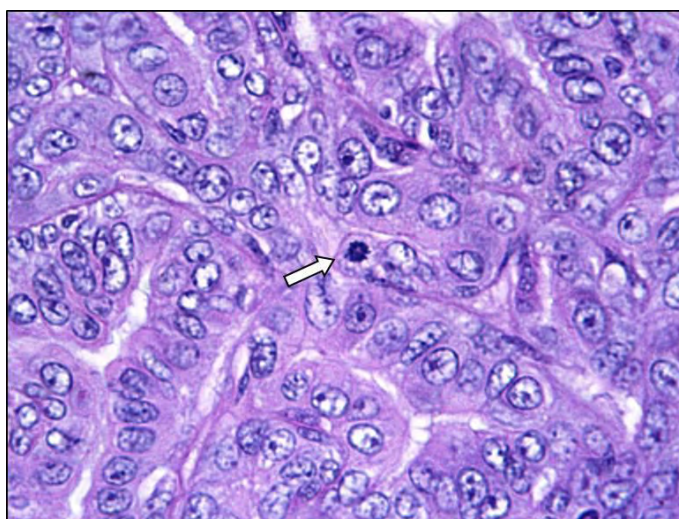
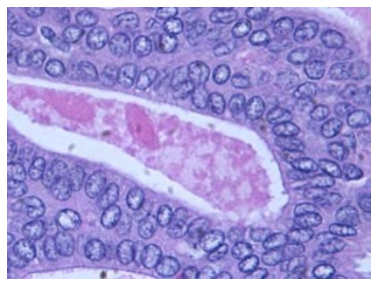
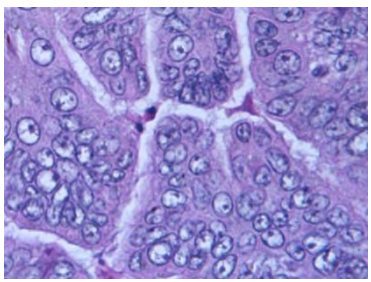
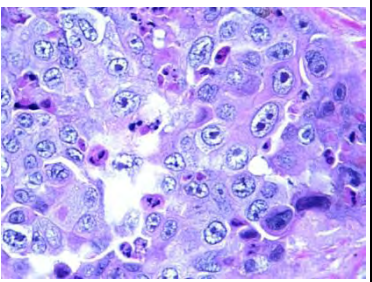


FIGURA 1 - Fotomicrografia de carcinoma mamário de cadela. Figura de mitose atípica ao centro (seta).

Em relação ao pleomorfismo nuclear, em tumores cujas células apresentavam núcleo pequeno, redondo, com baixa variação de tamanho e cromatina homogênea, foi atribuído escore um. O escore dois foi aplicado a tumores com células epiteliais apresentando cromatina vesiculada, nucléolo ocasionalmente proeminente e moderada variação no tamanho e na forma

nucleares. Tumores que exibiam moderado a acentuado aumento do tamanho nuclear, cromatina vesiculada e nucléolos grandes e múltiplos receberam escore três (Quadro 2).

QUADRO 2 - Escores aplicados ao pleomorfismo nuclear para a obtenção do grau dos tumores mamários malignos de cadelas.

Escore 1	Escore 2	Escore 3
		

O teste de correlação de Spearman foi utilizado para correlacionar o grau histológico dos tumores com o seu tamanho. Os dados foram processados nos programas Excel 2010 e Graphpad, versão 3.0.

RESULTADOS

Em relação aos dados clínicos, dos 119 tumores avaliados, 29 (24,36%) eram de animais sem raça definida (SRD) e 90 (75,64%) de cadelas de raça pura, cinco das quais se destacaram, como Poodle (34 / 37,7%), Cocker (12 / 13,33%), Pinscher (9 / 10%), Teckel (6 / 6,66%) e Yorkshire (5 / 5,55%).

Das 119 neoplasias avaliadas, 89 (74,78%) correspondiam a proliferações malignas e 30 (25,22%) a processos benignos (tumores benignos e lesões hiperplásicas).

A idade das fêmeas caninas foi informada em 117 casos, com média de 9,5 anos ($\pm$ 4-16) para aquelas com tumores malignos e de 8,2 anos ($\pm$ 4-11) para as que apresentaram lesões benignas.

A localização na cadeia mamária foi informada em 58 animais. Destes, 28 (48,27%) apresentaram tumor nas mamas inguiniais, 18 (31,03%) na mama abdominal caudal, quatro (6,89%) na abdominal cranial, cinco (8,62%) na torácica caudal e três (5,17%) na torácica cranial.

O tamanho dos tumores foi descrito em 46 casos, destes 17 (37,77%) eram menores que 3cm (T1), 16 (35,55%) mediam entre 3-5cm (T2), e 13 (28,88%) eram maiores que 5cm (T3). Os tumores malignos apresentaram porcentagens de 70,58% (12/17), 81,25% (13/16) e 92,3% (12/13), para T1, T2 e T3, respectivamente.

Entre os tumores malignos, o carcinoma complexo foi o diagnóstico mais comum (37,1%), seguido pelo carcinossarcoma (22,5%), carcinoma tubulopapilar (13,5%), e o carcinoma sólido e o carcinoma em tumor misto benigno (CTMB), cada um com 9,0%. Entre os benignos, os mais comuns foram o tumor misto benigno (47,8%) e o adenoma complexo (26,1%). Quando graduados, 64,04% dos tumores malignos era grau I, 25,84% grau II e 10,1% grau III (Tabela 1).

TABELA 1 - Distribuição dos tumores mamários de cadelas de acordo com a classificação de GOLDSCHMIDT et al. (2011) e graduação de ELSTON & ELLIS (1998).

Classificação	n / %	Graduação (n / %)		
Lesões hiperplásicas	(n=7)	--		
Hiperplasia mamária lobular	5 (71,4%)	--		
Hiperplasia fibroepitelial	2 (28,6%)	--		
Tumores benignos	(n=23)	--		
Adenoma simples	4 (17,4%)	--		
Adenoma complexo	6 (26,1%)	--		
Tumor misto benigno	11 (47,8%)	--		
Fibroadenoma	2 (8,7%)	--		
Tumores malignos	(n=89)	Grau I	Grau II	Grau III
Carcinoma tubulopapilar	12 (13,5%)	9 (75%)	3 (25%)	--
Carcinoma sólido	8 (9,0%)	--	4 (50%)	4 (50%)
Carcinoma papilar cístico	6 (6,7%)	6 (100%)	--	--
Carcinoma anaplásico	2 (2,2%)	--	--	2 (100%)
CTMB	8 (9,0%)	8 (100%)	--	--
Carcinoma complexo	33 (37,1%)	30 (91%)	3 (9%)	--
Carcinossarcoma	20 (22,5%)	4 (20%)	13 (65%)	3 (15%)
Total	(n=119)	57 (64,04%)	23 (25,84%)	9 (10,11%)

CTMB: carcinoma em tumor misto benigno

Dos carcinomas tubulopapilares e complexos avaliados, todos se enquadraram nos graus I e II, sendo a maioria grau I. Quando considerados os carcinomas sólidos, todos receberam grau II ou III, e os anaplásicos grau III. Já no caso dos carcinossarcomas, a maioria era grau II (65%), entretanto também havia neoplasias de graus I (20%) e III (15%) (Figura 2).

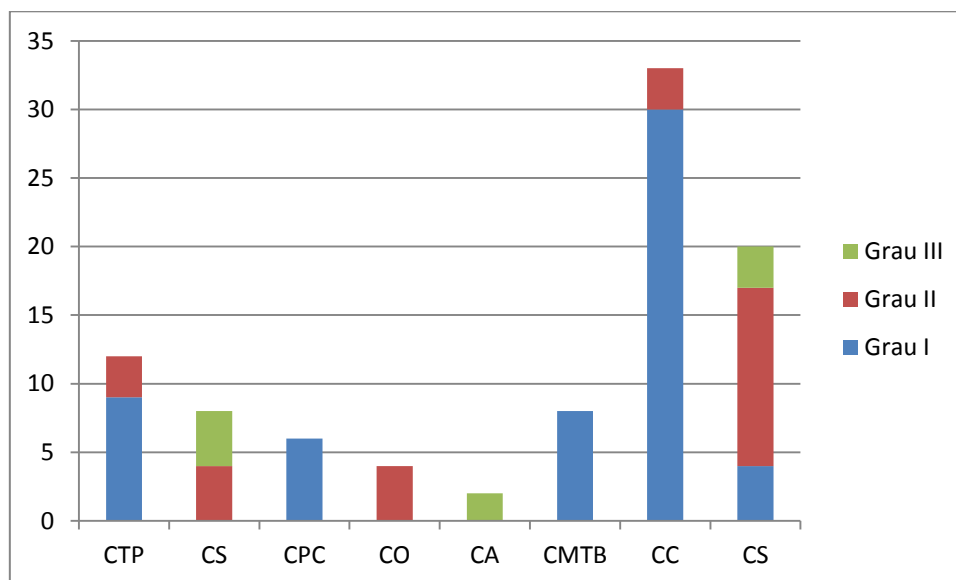


FIGURA 2 - Distribuição dos tumores mamários malignos de acordo com o tipo e grau histológicos. CTP - carcinoma tubulopapilar; CS = carcinoma sólido; CPC = carcinoma papilar cístico; CA = carcinoma anaplásico; CTMB = carcinoma em tumor misto benigno; CC = carcinoma complexo; CSA = carcinossarcoma.

Não foi observada correlação entre o tamanho do tumor e o grau histológico, quando avaliados todos os tipos de tumores malignos ($p = 0.1113$). Entretanto, não foi possível a avaliação por tipo histomorfológico devido ao escasso número de tumores com a informação referente ao tamanho.

DISCUSSÃO

Dos 90 animais de raça pura deste estudo, a maioria referia-se a raças como Poodle, Cocker, Pinscher, Dashchund e Yorkshire. Para OLIVEIRA FILHO et al. (2010), a ligação entre raças e tumores mamários pode variar de

acordo com o local do estudo, podendo refletir, em parte, a população canina da região. Contudo, as referidas raças foram as mesmas descritas outros estudos (MOE, 2001; ITOH et al., 2005; SORENMO et al., 2011), o que pode sugerir maior predisposição destas aos tumores mamários.

Os tumores localizavam-se predominantemente nas mamas inguinais e abdominais caudais, representando 79,3% do total. Os dois últimos pares de glândulas são descritos como o local mais comum para a ocorrência do primeiro tumor, raramente afetando as mamas torácicas craniais. A explicação mais aceita é que a maior quantidade de parênquima e de receptores hormonais predispõe esses pares mamários à ocorrência de neoplasias (DONNAY et al., 1995), uma vez que o componente hormonal é envolvido na gênese dos tumores mamários das cadelas (SORENMO, 2003).

A média de idade das cadelas com tumores mamários benignos e malignos deste estudo é semelhante àquela descrita por outros autores (OLIVEIRA et al. 2003, SORENMO et al., 2009). De acordo com SORENMO et al. (2011), a idade é um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento de tumores mamários em cães. Ainda, na década de 1970, TAYLOR et al. (1976) demonstraram que o risco ao desenvolvimento das neoplasias mamárias caninas começa a tornar-se significativo a partir dos oito anos, aumentando progressivamente após essa idade.

A relação entre a classificação maligna e o tamanho do tumor observada neste estudo é semelhante àquela descrita por OLIVEIRA FILHO et al. (2010). A correlação entre esta característica e o grau histológico não foi significativa ($p=0.1113$), assim como observado por KARAYANNOPOULOU et al. (2005). A ausência de correlação pode ser atribuída ao número elevado de tumores em tamanho T3 (7/13) e baixa graduação histológica, a exemplo de um dos carcinomas do tipo papilar cístico, que apresentava diâmetro maior que 25 cm e grau histológico I.

Ainda, diante da ausência de informações clínicas em muitos casos deste estudo, ressalta-se a importância de conscientizar o profissional veterinário quanto à necessidade da descrição detalhada dos dados do animal e das características clínicas do tumor, mediante o preenchimento de um protocolo padronizado para cadelas portadoras de tumores mamários, com

vistas ao emprego da correlação entre o grau histológico e o tamanho tumoral como método auxiliar na predição prognóstica.

As neoplasias mais frequentes foram o carcinoma complexo e carcinossarcoma. A alta prevalência destes tipos tumorais também foi observada nos estudos de DALECK et al. 1998, ZUCCARI et al. 2001 e OLIVEIRA et al. 2003. Considerando que os tipos tubulopapilar, sólido e anaplásico integram o grupo denominado carcinomas simples na classificação MISDORP (1999), alta prevalência destes tumores também foi observada neste estudo, à semelhança ao observado por KARAYANNOPOULOU et al. (2005).

No presente estudo, a relação entre os tumores malignos e benignos, incluindo nestes últimos as lesões hiperplásicas, foi de 69% para 31%. Contudo, essa relação tem se mostrado amplamente variável. Em estudo realizado no exterior os tumores malignos mostraram valores menores que 54% para os tumores malignos (ITOH et al. 2005), enquanto pesquisas nacionais descrevem até 91% de neoplasias malignas (MARTINS et al., 2002). Essa diferença pode ser atribuída, em parte, ao tempo prolongado entre a observação do desenvolvimento tumoral pelo proprietário, a avaliação clínica e o diagnóstico histológico (OLIVEIRA et al. 2003), além da maior consciência em relação à necessidade da remoção precoce dos tumores. Há evidências de que o tempo prolongado possibilita não apenas a progressão tumoral, mas também a transformação de tumores benignos em malignos (SORENMO et al., 2009).

No presente estudo, a relação entre o tipo e o grau histológicos das neoplasias malignas foi evidente. Pode-se observar que o carcinoma complexo, o carcinoma papilar-cístico e o carcinoma em tumor misto benigno predominaram na graduação I, sendo que resultados semelhantes foram observados por REZAIE et al. (2009), sugerindo o baixo grau de malignidade destes tipos tumorais.

Os carcinomas tubulopapilares foram classificados predominantemente na categoria grau I, enquanto o carcinoma sólido se dividiu igualmente entre os graus II e III, e o carcinoma anaplásico restringiu-se ao grau III. Estes achados reforçam o fato de que, entre os carcinomas simples, o tubulopapilar é o menos agressivo, seguido pelos tipos sólido e anaplásico (MISDORP, 1999). Este último é considerado o tumor mamário mais agressivo

das cadelas, uma vez que invariavelmente exibe recidiva e metástases precoces (MISDORP, 2002). Estes achados reforçam a importância da associação entre o diagnóstico histológico e a graduação histológica, uma vez que os tipos tumorais malignos não se distribuem uniformemente entre os três graus histológicos, o que pode refletir comportamento biológico distinto e diferenças no prognóstico e na sobrevida (KARAYANNOPOULOU et al., 2005).

CONCLUSÕES

O carcinoma complexo de glândula mamária é o tipo histológico mais comum, e que possui menor grau histológico em relação aos demais tipos tumorais de classificação maligna. Ainda, neoplasias maiores que cinco centímetros foram predominantemente malignas.

Não houve correlação entre tamanho tumoral e grau histológico.

A relação entre a classificação e a graduação histológica compreendeu instrumento auxiliar na descrição microscópica dos tumores mamários malignos das cadelas.

REFERÊNCIAS

1. CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; DE NARDI, A. B.; FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A. C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, A. C.; DALECK, C. R.; SALGADO, B. S.; FERNANDES, C. G.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; AULER, P. A.; MAGALHÃES, G. M.; SILVA, J. O.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; OLIVEIRA, L. O.; MALM, C.; ZUCCARI, D. A. P. C.; TANAKA, N. M.; RIBEIRO, L. R.; CAMPOS, L. C.; SOUZA, C. M.; LEITE, J. S.; SOARES, L. M. C.; CAVALCANTI, M. F.; FONTELES, Z. G. C.; SCHUCH, I. D.; PANIAGO, J.; OLIVEIRA, T. S.; TERRA, E. M.; CASTANHEIRA, T. L. L.; FELIX, A. O. C.; CARVALHO, G. D.; GUIM, T. N.; GUIM, T. N.; GARRIDO, E.; FERNANDES, S. C.; MAIA, F. C. L.; DAGLI, M. L. Z.; ROCHA, N. S.; FUKUMASU, H.; GRANDI, F.; MACHADO, J. P.; SILVA, S. M. M. S.; BEZERRIL, J. E.; FREHSE, M. S.; PAES DE ALMEIDA, E. C.; CAMPOS, C. B. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, Belo Horizonte, v. 4, n.2, p. 153-180, 2011.

2. DALECK, C. R.; FRANCESCHINI, P. H.; ALESSI, A. C.; SANTANA, A. E.; MARTINS, M. I. M. Aspectos clínicos e cirúrgicos do tumor mamário canino. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 1, p. 95-100, 1998.
3. DONNAY, I.; RAUIS, J.; DEVLEESHIUWER, N.; WOUTERS-BALLMAN, P.; LECLERCQ, G.; VERSTEGEN, J. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 56, n. 9, p. 1188-1194, 1995.
4. DUTRA, A. P.; GRANJA, N. V. M.; SCHMITT, F. C.; CASSALI, G. D. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Medical and Biologic Research**, Ribeirão Preto, v. 37, p. 1673-1681, 2004.
5. ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Assessment of histological grade. In: **Systemic Pathology – The Breast**, 3. ed. London: Churchill and Livingstone, 1998. v. 13, p. 365–384.
6. FERREIRA, E.; BREGUNCI, G. C.; SCHMITT, F. C.; CASSALI, G. D. Protocol for the anatomopathological examination of canine mammary tumors. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, p. 105-109, 2003.
7. FOWLER, E. H.; WILSON, G. P.; KOESTER, A. Biologic behavior of canine mammary neoplasms based on a histogenic classification. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 11, p. 212-229, 1974.
8. GILBERTSON, S. R.; KURZMAN, I. D.; ZACHRAU, R. E.; HURVITZ, A. I.; BLACK, M. M. Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 20, n. 2, p. 127-42, 1983.
9. GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 48, n. 1, p. 117-131, 2011.
10. ITOH, T.; UCHIDA, K.; ISHIKAWA, K.; KUSHIMA, K.; KUSHIMA, E.; TAMADA, H.; MORITAKE, T.; NAKAO, H.; SHII, H. Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: Differences between small-breed dogs and others. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 67, n. 3, p. 345-347, 2005.
11. KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T. C.; DESSIRIS, A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary

- carcinomas: application of a human grading method. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburg, v. 133, n. 4, p. 246-252, 2005.
12. MARTINS, A. M. C. R. P. F.; TAMASO, E.; GUERRA, J. L. Retrospective review and systematic study of mammary tumors in dogs and characteristics of the extracellular matrix. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 38-42, 2002.
 13. MISDORP, W. Tumours of the Mammary Gland. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**. Iowa State University Press, Ames, IA, 2002, p. 575-606.
 14. MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, T. P. **Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide reference on Comparative Oncology, 1999. p. 1-59.
 15. MOE, L. Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, Oxford, v. 57, p. 439-443, 2001.
 16. OLIVEIRA, L. O.; OLIVEIRA, R. T.; LORETTI, A. P.; RODRIGUES, R.; DRIEMEIER, D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta Scientiae Veterinaria**, Porto Alegre, v. 31, n. 2, p. 105-110, 2003.
 17. OLIVEIRA FILHO, J. C. O.; 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**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 2, p. 177-185, 2010.
 18. REZAIE, A.; TAVASOLI, A.; BAHONAR, A.; MEHRAZMA, M. Grading in Canine Mammary Gland Carcinoma. **Journal of Biological Sciences**, New York, v. 9, p. 333-338, 2009.
 19. RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J. & MACEWEN E.G. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW S.J. & MACEWEN E.G. **Small Animal Clinical Oncology**. 3.ed.: Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. p. 455-477.
 20. SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **The Veterinary Clinics - Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 33, p. 573-596, 2003.
 21. SORENMO, K. U.; KRISTIANSEN, V. M.; COFONE, M. A.; SHOFER, F. S.; BREEN, A. M.; LANGELAND, M.; MONGIL, C. M.; GRONDAHL, A. M.; TEIGE, J.; GOLDSCHMIDT, M. H. Canine mammary gland tumors; a

histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. **Veterinary and Comparative Oncology**, Madison, v. 7, p. 162–172, 2009.

22. SORENMO, K. U.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M. H. Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 48, n. 1, p. 85-97, 2011.
23. TAYLOR, G. N.; SHABESTARI, L.; WILLIAMS, J.; MAYS, C. W.; ANGUS, W.; MCFARLAND, S. Mammary neoplasia in a closed Beagle colony. **Cancer Research**, Baltimore, v. 36, p. 2740-2743, 1976.
24. WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Small Animal Clinical Oncology**, 4.ed.: St. Louis, Missouri, USA: Saunders, Elsevier, 2007, 864p.
25. ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Fisiopatogenia da neoplasia mamária em cadelas. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 32, p. 50-54, 2001.

CAPÍTULO 3 - EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES 9 (MMP-9) E 2 (MMP-2) E SEUS INIBIDORES (TIMP-1 E TIMP-2) NA GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA NORMAL E NEOPLÁSICA

RESUMO

As metaloproteinases de matriz (MMP) são enzimas proteolíticas envolvidas em processos fisiológicos e patológicos, e sua atividade é regulada pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP). Este estudo teve como objetivo avaliar a expressão de MMP-9, MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 no tecido mamário canino normal e neoplásico a fim de verificar o comportamento dessas proteínas em diferentes diagnósticos e correlacionar a expressão das MMP e TIMP. Foram selecionadas 48 amostras de tecido mamário canino, sendo 14 de carcinoma complexo, 13 de carcinoma tubulopapilar, seis de adenoma mamário simples e 15 de mama normal, submetidas à técnica de imuno-histoquímica com os anticorpos anti-MMP-9, anti-MMP-2, anti-TIMP-1 e anti-TIMP-2, para a avaliação da intensidade de marcação e do número de células epiteliais e estromais marcadas. A MMP-9 apresentou maior expressão nas células epiteliais e estromais dos carcinomas tubulopapilar e complexo. Constatou-se menor expressão de TIMP-1 nas células estromais do carcinoma complexo e maior expressão de TIMP-2 nas células epiteliais neoplásicas do carcinoma tubulopapilar. Ainda, houve correlação positiva entre MMP-9 e TIMP-1 quanto à intensidade de marcação e número de células epiteliais e estromais marcadas na glândula mamária normal, e entre MMP-9 e TIMP-2 nas células epiteliais neoplásicas do carcinoma tubulopapilar. Concluiu-se que há variação na expressão da MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 entre os tipos histomorfológicos, além de correlação positiva entre TIMP-1 e MMP-9 nas mamas normais e entre MMP-9 e TIMP-2 no carcinoma tubulopapilar. A atividade equilibrada entre MMP-9, MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 é fundamental à homeostase do tecido mamário canino normal enquanto o aumento da expressão de MMP-9 e TIMP-2, e a expressão reduzida de TIMP-1 nos carcinomas pode representar condição adequada à evolução tumoral.

Palavras-chave: cão, glândula mamária, gelatinases, neoplasia.

CHAPTER 3 - EXPRESSION OF METALLOPROTEINASES 2 (MMP-2) AND 9 (MMP-9) AND THEIR INHIBITORS (TIMP) IN CANINE NORMAL AND NEOPLASTIC MAMMARY GLAND

ABSTRACT

Matrix metalloproteinases (MMP) are proteolytic enzymes involved in physiological and pathological processes, and its activity is regulated by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP). This study aimed to evaluate the expression of MMP-9, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 in normal and neoplastic canine mammary tissue to verify the behavior of these proteins in the different diagnoses. Forty eight samples were selected from mammary tissue canine with 14 complex carcinoma, 13 tubulopapillary carcinoma, six simple mammary adenoma and 15 normal mammary gland, submitted to immunohistochemistry with anti-MMP-9, anti-MMP-2, anti-TIMP-1 and anti-TIMP-2, to evaluate the intensity of the staining and the number of epithelial and stromal cells selected. The MMP-9 showed higher expression in epithelial and stromal cells of tubulopapillary and complex carcinomas. It was found lower expression of TIMP-1 in the stromal cells of carcinoma complex and overexpression of TIMP-2 in neoplastic epithelial of tubulopapillary carcinoma. Also, was present a positive correlation between MMP-9 and TIMP-1 regarding the intensity staining and number of epithelial and stromal cells labeled in normal mammary gland, and between MMP-9 and TIMP-2 regarding epithelial neoplastic cells in tubulopapillary carcinoma. It was concluded that there is variation between expression of MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 among the tumor types, and a positive correlation between TIMP-1 and MMP-9 in normal mammary gland and between MMP-9 and TIMP-2 in tubulopapilar carcinoma. The balanced expression of MMP-9, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 is essential for the homeostasis of canine normal mammary gland, while the overexpression of MMP-9 and TIMP-2, and the reduced expression of TIMP-1 in carcinomas represents an appropriate condition to the tumor development.

Keywords: dog, mammary gland, neoplasia, gelatinases.

INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias representam 52% dos tumores diagnosticados nas fêmeas caninas (RUTTEMAN et al., 2001), sendo que mais de 68% desses são malignos (DE NARDI et al. 2002), e como consequências evoluem como as metástases. Entretanto, para que isso ocorra, a célula cancerosa deve atravessar barreiras físicas, ser capaz de chegar a outro órgão e neste proliferar (MORRIS & DOBSON, 2001). Assim, a degradação da matriz extracelular (MEC) e da membrana basal tem sido considerada um dos eventos iniciais do processo metastático (KHASIGOV et al., 2003). Neste sentido, as metaloproteinases de matriz (MMP) são estudadas devido a sua capacidade de degradar diversos componentes do estroma (BOURBOULIA & STETLER-STEVENSON, 2010).

As MMP são enzimas proteolíticas envolvidas em processos fisiológicos e patológicos (CURRAN & MURRAY, 1999; BOURBOULIA & STETLER-STEVENSON, 2010). São secretadas no meio extracelular como pró-enzimas inativas, que são clivadas para produzir a enzima ativa (STAMENKOVIC, 2000). A atividade das MMP é controlada preferencialmente por proteínas chamadas inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz (TIMP) (LAMBERT et al., 2004), que podem ser de quatro tipos (TIMP-1 a TIMP-4) e se ligar a diversas MMP, sendo que TIMP-1 e TIMP-2 inibem MMP-9 e MMP-2, respectivamente (BREW & NAGASE, 2010).

Em condições fisiológicas o equilíbrio entre MMP e TIMP constitui fator determinante para a manutenção da homeostase da MEC (STETLER-STEVENSON, 1996). Já no tecido neoplásico o desequilíbrio na atividade dessas enzimas pode facilitar o processo de invasão tumoral. Em humanos, expressão aumentada de MMP nos tumores mamários, especialmente MMP-2 e 9, está associada ao grau histológico, estágio tumoral e risco de metástase e morte (HIRVONEN et al., 2003; DOYLE & MILLER, 2008). Nos cães as informações são escassas quanto a expressão de MMP e seus inibidores no tecido mamário neoplásico. Contudo, estudos demonstram maior expressão de MMP, principalmente MMP-2 e MMP-9 (HIRAYAMA et al., 2002), e redução de TIMP (KAWAI et al., 2006) no tecido mamário neoplásico em relação ao normal.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 no tecido mamário canino normal e neoplásico e correlacionar a expressão das MMP e TIMP.

MATERIAL E MÉTODOS

Selecionaram-se 48 amostras de tecido mamário canino, sendo 14 de carcinoma complexo (CC), 13 de carcinoma tubulopapilar (CT), seis de adenoma mamário simples (AM) e 15 de mama normal (MN), estas últimas colhidas de cadelas que não apresentavam tumor em qualquer um dos pares de mama.

Os tumores mamários foram avaliados à coloração de hematoxilina e eosina (HE) e classificados de acordo com os critérios de GOLDSCHMIDT et al. (2011), e destes selecionaram-se dois campos representativos de cada para a confecção do bloco de microarranjo tecidual (TMA) e realização do estudo imuno-histoquímico. Para obtenção do grupo controle, o tecido mamário colhido foi fixado em formalina tamponada a 10% durante 48h, recortado, processado e incluído em parafina, para a obtenção de cortes de 5µm, que foram avaliados à coloração de HE para confirmar a histomorfologia mamária normal. Destes também foram selecionados dois campos representativos para compor o bloco de TMA e realizar o estudo imuno-histoquímico.

As áreas de tecido mamário neoplásico e normal selecionadas à avaliação em HE foram identificadas nos blocos doadores, retiradas em cilindros (cores) de 2 mm de diâmetro (Tissue MicroArray builder 20010.2, Histopathology Ltd, Hungary), e transferidas para dois blocos receptores (TMA), conforme técnica descrita por KONONEN et al. (1998) e BUBENDORF et al. (2001).

Dos blocos de TMA foram obtidos cortes de 3µm para a confirmação à coloração de HE das áreas selecionadas nos blocos doadores, bem como para a avaliação da expressão de MMP-9, MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2. Os cortes destinados à imuno-histoquímica foram distendidos sobre lâminas silanizadas (Starfrost White, Sakura, ready to use, Germany – Dako 9545-1), mantidos em estufa a 36°C por duas horas, desparafinizados, hidratados, lavados em água

destilada e solução tampão TRIS pH7,4, e incubados em solução de dodecil sulfato de sódio (SDS), por 10 minutos, esta destinada ao bloqueio de reações de fundo.

Os cortes foram submetidos à recuperação antigênica padronizada para cada anticorpo (Quadro 1), seguida do bloqueio da peroxidase endógena em solução metanólica de H₂O₂ a 3%, por 15 minutos. Para bloquear reações inespecíficas as lâminas foram incubadas no leite em pó desnatado (Molico®) a 30%, por uma hora e trinta minutos, seguindo-se a incubação com os anticorpos anti-MMP-2 (1:25), clone A-Gel VC2 (DBS - Mob 312), anti-MMP-9 (1:200) (Dako A0150), anti-TIMP-1 (1:100) (Spring E3364), e anti-TIMP-2 (1:150) (Spring E4184), todos em câmara úmida, durante 18 horas, a 4°C.

QUADRO 1 - Recuperação antigênica, tampão e tempo utilizados na técnica de imunistoquímica para MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2

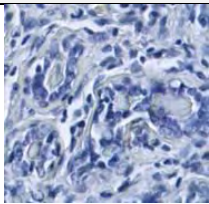
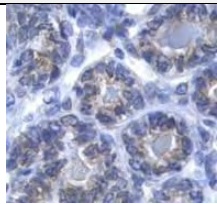
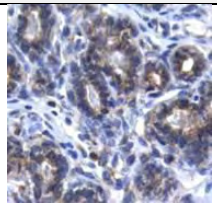
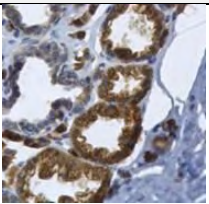
Anticorpo	Recuperação Antigênica	Tampão	Tempo
anti-MMP-2	Banho-maria 96°C	Citrato pH 6,0	30 min
anti-MMP-9	Banho-maria 96°C	TRIS-EDTA pH 9,0	20 min
anti-TIMP-1	Panela de pressão* 121°C	Citrato pH 6,0	30 seg
anti-TIMP-2	Panela de pressão* 121°C	Citrato pH 6,0	30 seg

*(Pascal, Dako Citomation)

Em seguida, as lâminas foram incubadas em sistema de amplificação de sinais (Advance System, Dako K4068), em câmara úmida, à temperatura ambiente, durante trinta minutos e, para a revelação da reação, utilizou-se solução de diaminobenzidina (DAB, Dako K3468-1), por três minutos. A solução tampão TRIS pH7,4 foi utilizada para a lavagem dos cortes entre as etapas. Seguiram-se a contracoloração em hematoxilina de Harris, por 20 segundos, lavagem em água destilada, desidratação, diafanização e montagem das lâminas com lamínula e resina sintética.

A intensidade da imunomarcagem dos anticorpos foi avaliada de forma semiquantitativa, utilizando-se os escores de zero a três, em que zero indicava ausência de imunomarcagem e um, dois e três referiam-se a marcação discreta, moderada e acentuada, respectivamente (Quadro 2).

QUADRO 2 - Escores aplicados à análise da marcação dos anticorpos anti-MMP-2, anti-MMP-9, anti-TIMP-1 e anti-TIMP-2

ESCORE	Ausente (0)	Discreta (1)	Moderada (2)	Acentuada (3)
Intensidade de marcação				

Para a quantificação das células marcadas empregou-se o escore zero quando negativo e um, dois e três quando a marcação compreendia 1 a 33%, 34 a 66%, 67 a 100% do tecido, respectivamente. Tanto as células epiteliais quanto as estromais foram avaliadas.

Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis para a análise das variáveis, intensidade de marcação e número de células marcadas em relação à histomorfologia mamária, considerando-se a diferença como significativa quando $p < 0,05$. A Correlação de Spearman foi utilizada para correlacionar a expressão dos anticorpos nas mamas normais e neoplásicas. Os dados foram tabulados no programa Excel 2010 e processados no software Graphpad Instat, versão 3.0.

RESULTADOS

MMP-9

Foi obtida marcação citoplasmática para o anticorpo anti-MMP-9 tanto nas células estromais periacinares quanto nas epiteliais acinares, com escores de intensidade de marcação e número de células marcadas variando de discreto a acentuado (Figura 1).

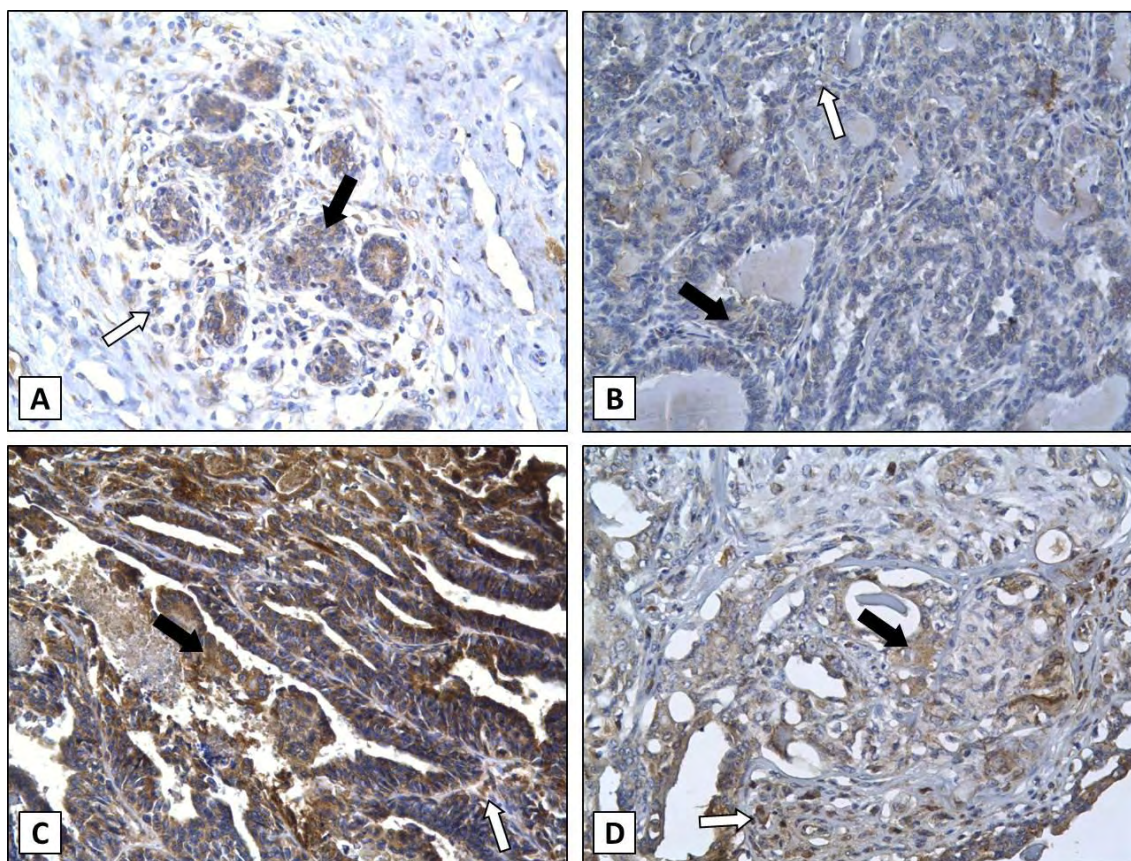


FIGURA 1 - Fotomicrografias de glândula mamária canina. IHQ, anti-MMP-9, objetiva 20x. A) Mama normal. Células epiteliais (seta cheia) e estromais (seta vazada) com escores de marcação um e dois, respectivamente. B) Adenoma mamário simples. Escore um para células epiteliais (seta cheia) e estromais (seta vazada). C) Carcinoma tubulopapilar. Células epiteliais neoplásicas (seta cheia) e estromais (seta vazada) marcadas em escore três. D) Carcinoma complexo de mama. Marcação em escore dois nas células epiteliais neoplásicas (seta cheia) e três em células estromais (seta vazada).

Comparando-se a intensidade de marcação do anticorpo anti-MMP-9 nas células epiteliais acinares e estromais periacinares dos carcinomas tubulopapilar e complexo com a mama normal, observou-se diferença ($p < 0,05$), com maior intensidade de marcação nas células tumorais. Não foi observada diferença entre os diagnósticos quando comparados o número de células epiteliais e estromais marcadas, observando-se em todos os grupos e tipos celulares marcação predominantemente moderada (Tabela 1).

TABELA 1 - Distribuição dos casos de acordo com os escores aplicados à intensidade de marcação e número de células marcadas com o anticorpo anti-MMP-9 em células epiteliais acinares e estromais periacinares em relação ao diagnóstico

Intensidade de marcação nas células epiteliais acinares					
	Diagnóstico	Normal ^A % (n=24)	Adenoma simples ^B % (n=7)	Carcinoma tubulopapilar ^{C,A} % (n=17)	Carcinoma complexo ^{D,A} % (n=12)
Escore	Ausente	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Discreto	75 (18)	14,3 (1)	17,6 (3)	16,7 (2)
	Moderado	16,6 (4)	71,4 (5)	47,1 (8)	50 (6)
	Acentuado	8,4 (2)	14,3 (1)	35,3 (6)	33,3 (4)
Intensidade de marcação nas células estromais periacinares					
	Diagnóstico	Normal ^A % (n=24)	Adenoma simples ^B % (n=7)	Carcinoma tubulopapilar ^{C,A} % (n=17)	Carcinoma complexo ^{D,A} % (n=12)
Escore	Ausente	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Discreto	79,1 (19)	71,4 (5)	35,2 (6)	33,3 (4)
	Moderado	20,2 (5)	14,3 (1)	47,2 (8)	25 (3)
	Acentuado	0,0 (0)	14,3 (1)	17,6 (3)	41,7 (5)
Número de células epiteliais acinares marcadas					
	Diagnóstico	Normal ^A % (n=24)	Adenoma simples ^B % (n=7)	Carcinoma tubulopapilar ^C % (n=17)	Carcinoma complexo ^D % (n=12)
Escore	Ausente	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Discreto	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Moderado	12,5 (3)	43 (3)	6 (1)	16,7 (2)
	Acentuado	87,5 (21)	57 (4)	94 (16)	83,3 (10)
Número de células estromais periacinares marcadas					
	Diagnóstico	Normal ^A % (n=24)	Adenoma simples ^B % (n=7)	Carcinoma tubulopapilar ^C % (n=17)	Carcinoma complexo ^D % (n=12)
Escore	Ausente	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Discreto	16,6(4)	28,5 (2)	17,6 (3)	8,3 (1)
	Moderado	41,7 (10)	57 (4)	41,2 (7)	25 (3)
	Acentuado	41,7 (10)	14,5 (1)	41,2 (7)	66,7 (8)

Teste: Kruskal Wallis. No campo diagnóstico, mais de uma letra significa diferença estatística ($p < 0,05$) entre as letras que o grupo representa.

Em relação à intensidade de marcação para MMP9 observou-se maior número de casos com escores dois e três nas mamas neoplásicas do que nas normais (Figura 2).

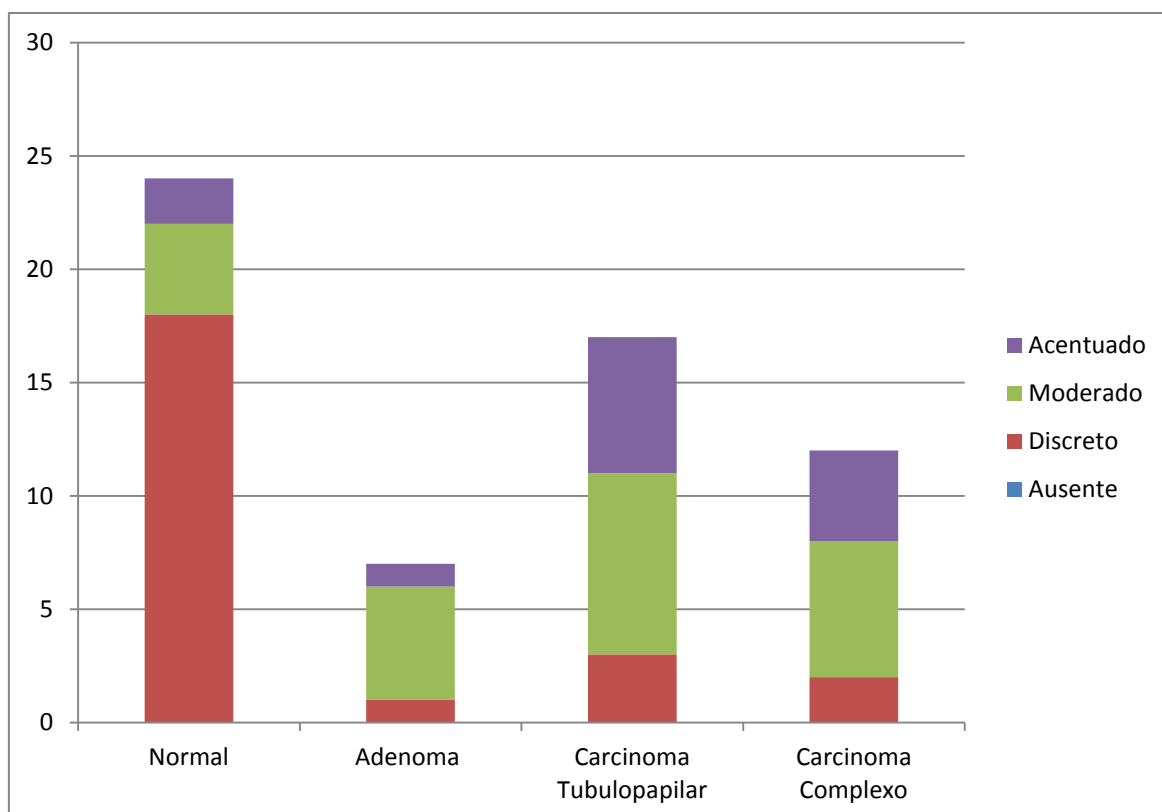


FIGURA 2 - Distribuição dos casos de acordo com a intensidade de marcação das células epiteliais acinares para o anticorpo anti-MMP-9 em mamas normais e neoplásicas.

MMP-2

Obteve-se marcação citoplasmática para MMP-2 nas células estromais periacinares e epiteliais acinares, com a expressão variando entre os escores zero a três para o número de células marcadas e intensidade de marcação, a depender do tipo histomorfológico (Figura 3).

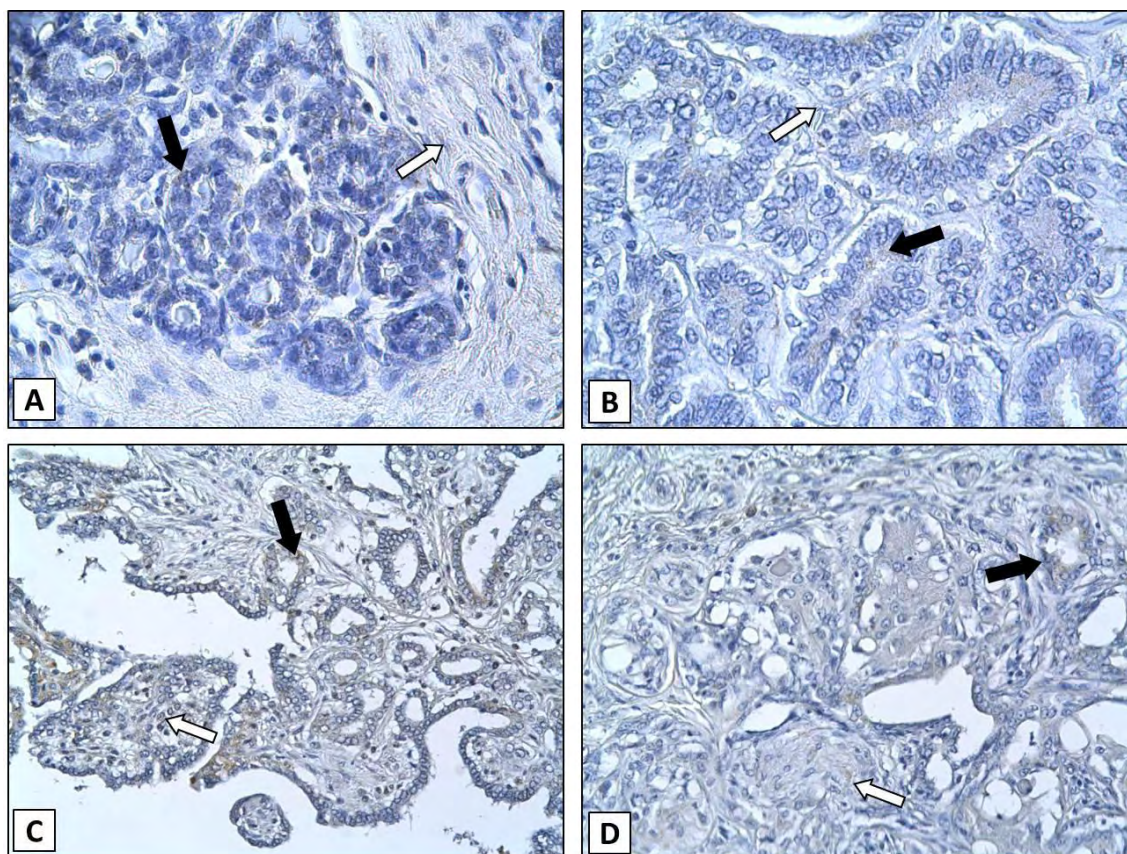


FIGURA 3 - Fotomicrografias de glândula mamária canina. IHQ, anti-MMP2. A) Mama normal, objetiva 20x. Raras células epiteliais (seta cheia) e estromais (seta vazada) com escore de marcação um. B) Adenoma mamário simples, objetiva 40x. Escores um para células epiteliais (seta cheia) e ausência de marcação em células mesenquimais (seta vazada). C) Carcinoma tubulopapilar, objetiva 10x. Células epiteliais neoplásicas (seta cheia) e estromais (seta vazada) marcadas em escore um. D) Carcinoma complexo de mama, objetiva 20x. Escore de marcação um nas células estromais (seta vazada) e células epiteliais neoplásicas (seta cheia).

Com frequência e independente do diagnóstico foram observadas poucas ou nenhuma células marcadas e intensidade de marcação predominantemente discreta na imunoexpressão da MMP-2. À análise comparativa não houve associação significativa entre a intensidade de marcação e número de células marcadas nos diferentes tipos morfológicos analisados (Tabela 2).

TABELA 2 - Distribuição dos casos de acordo com os escores aplicados à marcação e número de células marcadas do anticorpo anti-MMP-2 em células epiteliais acinares e estromais periacinares em relação ao diagnóstico

Intensidade de marcação nas células epiteliais acinares					
	Diagnóstico	Normal ^A % (n=23)	Adenoma simples ^B % (n=6)	Carcinoma tubulopapilar ^C % (n=13)	Carcinoma complexo ^D % (n=20)
Escore	Ausente	8,6 (2)	50 (3)	15,4 (2)	20 (4)
	Discreto	56,5 (13)	50 (3)	69,2 (9)	60 (12)
	Moderado	30,4 (7)	0,0 (0)	15,4 (2)	5 (1)
	Acentuado	4,3 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	15 (3)
Intensidade de marcação nas células estromais periacinares					
	Diagnóstico	Normal ^A % (n=23)	Adenoma simples ^B % (n=6)	Carcinoma tubulopapilar ^C % (n=13)	Carcinoma complexo ^D % (n=20)
Escore	Ausente	13 (3)	16,6 (1)	30,7 (4)	25 (5)
	Discreto	47,9 (11)	83,4 (5)	69,3 (9)	55 (11)
	Moderado	34,8 (8)	0,0 (0)	0,0 (0)	20 (4)
	Acentuado	4,3 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
Número de células epiteliais acinares marcadas					
	Diagnóstico	Normal ^A % (n=23)	Adenoma simples ^B % (n=6)	Carcinoma tubulopapilar ^C % (n=13)	Carcinoma complexo ^D % (n=20)
Escore	Ausente	8,7 (2)	16,6 (1)	15,4 (2)	20 (4)
	Discreto	34,8 (8)	83,4 (5)	46,2 (6)	45 (9)
	Moderado	26 (6)	(0)	23 (3)	20 (4)
	Acentuado	30,5 (7)	(0)	15,4 (2)	15 (3)
Número de células estromais periacinares marcadas					
	Diagnóstico	Normal ^A % (n=23)	Adenoma simples ^B % (n=6)	Carcinoma tubulopapilar ^C % (n=13)	Carcinoma complexo ^D % (n=20)
Escore	Ausente	13 (3)	33,4 (2)	30,8 (4)	25 (5)
	Discreto	43,4 (10)	66,6 (4)	38,4 (5)	45 (9)
	Moderado	21,8 (5)	0,0 (0)	23,1 (3)	25 (5)
	Acentuado	21,8 (5)	0,0 (0)	7,7 (1)	5 (1)

Teste: Kruskal Wallis.

TIMP-1

A expressão do anticorpo anti-TIMP-1 ocorreu nas células epiteliais acinares normais, neoplásicas, nos fibroblastos periacinares e em células inflamatórias (linfócitos) dos quatro grupos avaliados (Figura 4).

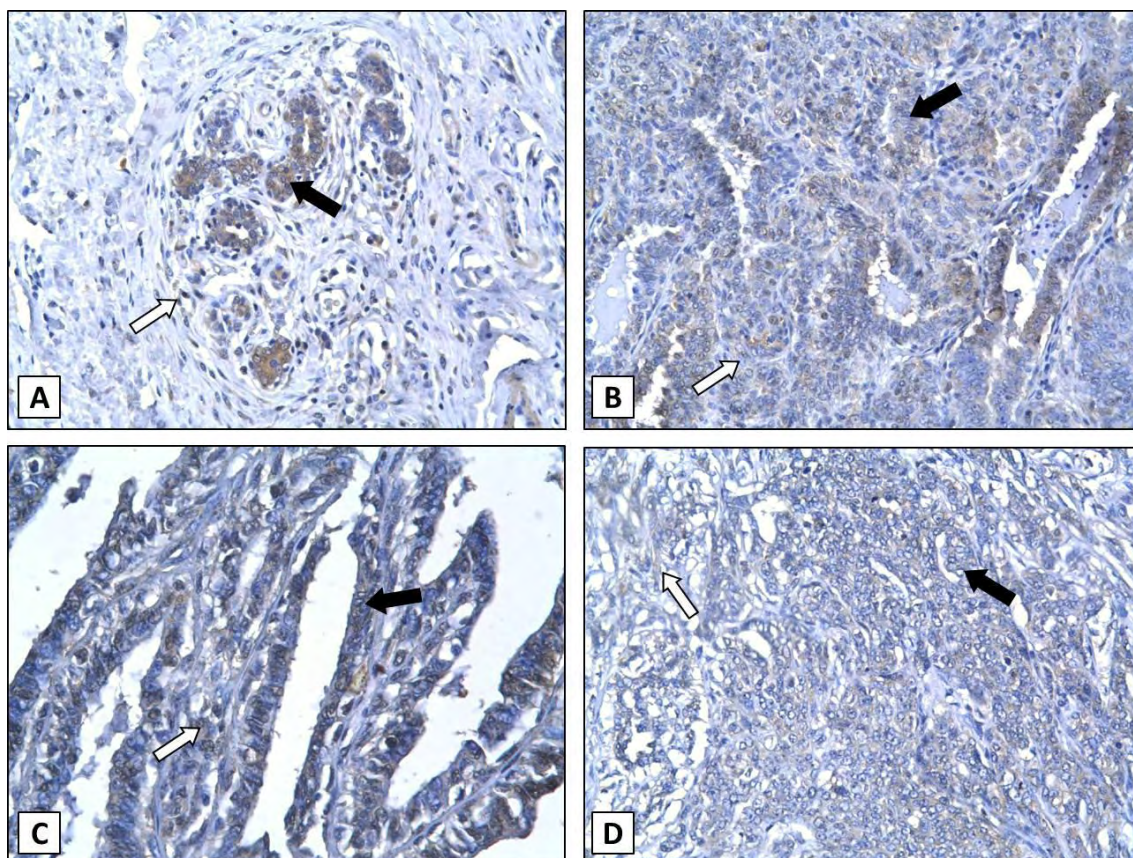


FIGURA 4 - Fotomicrografias de glândula mamária canina. IHQ, anti-TIMP1. A) Mama normal, objetiva 20x. Células epiteliais (seta cheia) e estromais (seta vazada) com escore de marcação dois. B) Adenoma mamário simples, objetiva 20x. Escores um para células epiteliais (seta cheia) e estromais (seta vazada). C) Carcinoma tubulopapilar, objetiva 40x. Poucas células epiteliais neoplásicas (seta cheia) e estromais (seta vazada) marcadas em escore um. D) Carcinoma complexo de mama, objetiva 20x. Marcação em escore um e células estromais (seta vazada) e células epiteliais neoplásicas (seta cheia).

Quando comparados os grupos quanto as variáveis intensidade de marcação e número de células marcadas houve diferença na intensidade de marcação das células estromais da glândula mamária normal em relação ao carcinoma complexo, com menor intensidade e ausência de marcação neste último. Verificou-se maior número de células epiteliais acentuadamente marcadas na mama normal em relação aos demais diagnósticos, porém sem diferença estatística (Tabela 3).

TABELA 3 - Distribuição dos casos de acordo com os escores aplicados à intensidade de marcação e número de células marcadas com o anticorpo anti-TIMP-1 em células epiteliais acinares e estromais periacinares em relação ao diagnóstico

Intensidade de marcação nas células epiteliais acinares					
	Diagnóstico	Normal ^A % (n=21)	Adenoma simples ^B % (n=6)	Carcinoma tubulopapilar ^C % (n=17)	Carcinoma complexo ^D % (n=16)
Escore	Ausente	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Discreto	71,4 (15)	83,3(5)	70,6 (12)	75 (12)
	Moderado	28,6 (6)	0,0 (0)	23,5 (4)	19 (3)
	Acentuado	0,0 (0)	16,7 (1)	5,9 (1)	6 (1)
Intensidade de marcação nas células estromais periacinares					
	Diagnóstico	Normal ^A % (n=21)	Adenoma simples ^B % (n=6)	Carcinoma tubulopapilar ^C % (n=17)	Carcinoma complexo ^{D,A} % (n=16)
Escore	Ausente	0,0 (0)	0,0 (0)	5,9 (1)	12,5 (2)
	Discreto	66,6 (14)	100 (6)	70,6 (12)	87,5 (14)
	Moderado	33,4 (7)	0,0 (0)	23,5 (4)	0,0 (0)
	Acentuado	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
Número de células epiteliais acinares marcadas					
	Diagnóstico	Normal ^A % (n=21)	Adenoma simples ^B % (n=6)	Carcinoma tubulopapilar ^C % (n=17)	Carcinoma complexo ^D % (n=16)
Escore	Ausente	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Discreto	23,8 (5)	16,6 (1)	41 (7)	37,5 (6)
	Moderado	33,3 (7)	50 (3)	35,2 (6)	37,5 (6)
	Acentuado	42,8 (9)	33,4 (2)	23,8 (4)	25 (4)
Número de células estromais periacinares marcadas					
	Diagnóstico	Normal ^A % (n=21)	Adenoma simples ^B % (n=6)	Carcinoma tubulopapilar ^C % (n=17)	Carcinoma complexo ^D % (n=16)
Escore	Ausente	0,0 (0)	0,0 (0)	5,9 (1)	12,6 (2)
	Discreto	47,6 (10)	50 (3)	70,6 (12)	56,2 (9)
	Moderado	23,8 (5)	50 (3)	23,5(4)	25 (4)
	Acentuado	28,6 (6)	0,0 (0)	0,0 (0)	6,2 (1)

Teste: Kruskal Wallis. No campo diagnóstico, mais de uma letra significa diferença estatística ($p < 0,05$) entre a letras que o grupo representa.

TIMP-2

As células epiteliais acinares da glândula mamária normal e neoplásica, assim como o tecido estromal em todos diagnósticos apresentaram marcação citoplasmática com o anticorpo anti-TIMP2, variando de discreta a acentuada a depender do diagnóstico (Figura 5).

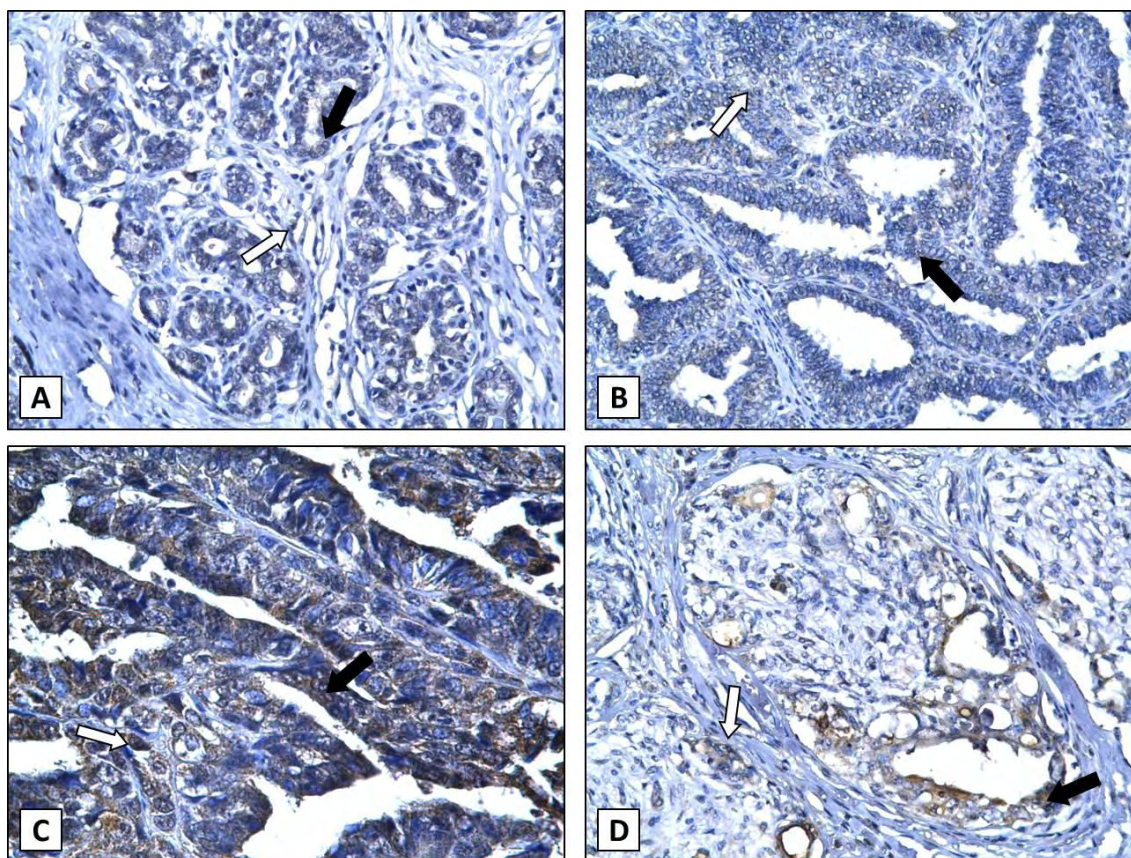


FIGURA 5 - Fotomicrografias de glândula mamária canina. IHQ, anti-TIMP2. A) Mama normal, objetiva 20x. Células epiteliais (seta cheia) e estromais (seta vazada) com escores de marcação um. B) Adenoma mamário simples, objetiva 10x. Células epiteliais (seta cheia) e estromais (seta vazada) com escore de marcação um. C) Carcinoma tubulopapilar, objetiva 20x. Células epiteliais neoplásicas (seta cheia) e estromais (seta vazada) marcadas em escore três. D) Carcinoma complexo de mama, objetiva 10x. Marcação em escore dois nas células epiteliais neoplásicas (seta cheia) e um em células estromais (seta vazada).

Houve diferença quanto à intensidade de marcação nas células epiteliais entre mamas normais e com carcinoma tubulopapilar, com maior intensidade nas neoplásicas ($p < 0,05$). Entretanto, quando considerados o número de células epiteliais e estromais marcadas e a intensidade de marcação nas células estromais, não houve diferença entre os diagnósticos (Tabela 4).

TABELA 4 - Distribuição dos casos de acordo com os escores aplicados à imunomarcção e número de células marcadas do anticorpo TIMP-2 em células epiteliais acinares e estromais periacinares em relação ao diagnóstico

Intensidade de marcação nas células epiteliais acinares					
	Diagnóstico	Normal ^A % (n=20)	Adenoma simples ^B % (n=6)	Carcinoma tubulopapilar ^{C,A} % (n=18)	Carcinoma complexo ^D % (n=14)
Escore	Ausente	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Discreto	95 (19)	83,3 (5)	66,7 (12)	57,2 (8)
	Moderado	5 (1)	16,7 (1)	22,2 (4)	35,7 (5)
	Acentuado	0,0 (0)	0,0 (0)	11,1 (2)	7,1 (1)
Intensidade de marcação nas células estromais periacinares					
	Diagnóstico	Normal ^A % (n=20)	Adenoma simples ^B % (n=6)	Carcinoma tubulopapilar ^C % (n=18)	Carcinoma complexo ^D % (n=14)
Escore	Ausente	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Discreto	95 (19)	66,6 (4)	61,1 (11)	64,3 (9)
	Moderado	5 (1)	33,3 (2)	27,8 (5)	28,6 (4)
	Acentuado	0,0 (0)	0,0 (0)	11,1 (2)	7,1 (1)
Número de células epiteliais acinares marcadas					
	Diagnóstico	Normal ^A % (n=20)	Adenoma simples ^B % (n=6)	Carcinoma tubulopapilar ^C % (n=18)	Carcinoma complexo ^D % (n=14)
Escore	Ausente	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Discreto	25 (5)	16,7 (1)	16,7 (3)	21,4 (3)
	Moderado	60 (12)	66,6 (4)	50 (9)	42,9 (6)
	Acentuado	15 (3)	16,7 (1)	33,3 (6)	35,7 (5)
Número de células estromais periacinares marcadas					
	Diagnóstico	Normal ^A % (n=20)	Adenoma simples ^B % (n=6)	Carcinoma tubulopapilar ^C % (n=18)	Carcinoma complexo ^D % (n=14)
Escore	Ausente	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Discreto	60 (12)	83,3 (5)	61,1 (11)	64,3 (9)
	Moderado	35 (7)	16,7 (1)	38,9 (7)	28,6 (4)
	Acentuado	5 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	7,1 (1)

Teste: Kruskal Wallis. No campo diagnóstico, mais de uma letra significa diferença estatística ($p < 0,05$) entre as letras que o grupo representa.

Correlação entre MMP-9, MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2

Observou-se correlação positiva entre os anticorpos anti-TIMP-1 e anti-MMP-9 nas glândulas mamárias normais quanto à intensidade de marcação nas células epiteliais ($r = 0.5552$ / $p = 0.0136$), mesenquimais ($r = 0.4708$ / $p = 0.0362$), além do número de células epiteliais ($r = 0.4720$ / $p = 0.0356$) e estromais ($r = 0.5259$ / $p = 0.0207$) marcadas. Houve ainda forte correlação positiva entre anti-MMP-9 e anti-TIMP-2 quanto à intensidade de

marcação nas células epiteliais do carcinoma tubulopapilar ($r = 0.7531$ / $p = 0.0098$).

DISCUSSÃO

Estudos sobre comportamento biológico tumoral têm focado a atenção no tecido estromal, considerando a descoberta de sua participação na tumorigênese, invasão tumoral e formação de metástases (NAKOPOULOU et al., 2003; BERGAMASCHI et al., 2008; ZHANG et al., 2009). As MMP e TIMP desempenham papel importante neste mecanismo por participar do processo de degradação estromal e dos componentes da membrana basal, facilitando a disseminação das células neoplásicas (KESSENBROCK et al., 2010).

Nos tumores mamários caninos a atividade das MMP é associada principalmente à malignidade das lesões (PAPPARELLA et al., 2002; ARESU et al., 2011). Os resultados deste estudo corroboram esta hipótese, já que a expressão de MMP-9 foi mais intensa nas células epiteliais e estromais dos carcinomas complexo e tubulopapilar em relação à glândula mamária normal. De forma semelhante, YOKOTA et al. (2001) demonstraram pelo método de zimografia que carcinomas mamários caninos exibem cerca de 4-26 vezes mais MMP-9 do que a glândula mamária normal. Ressalte-se que, em mulheres, o aumento tissular desta enzima é associado ao grau histológico e a metástases em linfonodos no momento do diagnóstico (KIM et al., 2006; HAO et al., 2007).

A intensidade de marcação para anti-MMP-9 também foi maior nos carcinomas em relação ao adenoma, embora sem diferença estatística. Apesar disso, HIRAYAMA et al. (2002) e KAWAI et al. (2006) igualmente demonstraram maior expressão de MMP-9 nos carcinomas em relação ao adenoma, e LOUKOPOULOS et al. (2003) descreveram maior expressão desta enzima em sarcomas quando comparados aos carcinomas, o que remete a importância do seu aumento no tecido mamário canino com proliferações malignas, possivelmente facilitando o processo de invasão tecidual pelas células neoplásicas.

De outra parte, na avaliação do número de células epiteliais e estromais marcadas com MMP-9 não foi constatada diferença entre os grupos, o que está de acordo com os achados de PELLIKAINEN et al. (2004) e ARESU et al. (2011), os quais descrevem certo grau de marcação citoplasmática desta enzima nas células epiteliais e estromais normais, bem como nas epiteliais neoplásicas. Com isso, é imediato inferir que a intensidade de marcação compreende valiosa ferramenta de avaliação para MMP-9 em relação ao número de células marcadas, especialmente quando se consideram células neoplásicas malignas, já que estas comumente possuem heterogeneidade gênica e capacidade de expansão clonal (FILHO, 2011), o que possibilita a proliferação de células com grande capacidade de síntese de MMP-9, permitindo maior degradação da membrana basal (MB) e MEC e facilitando a invasão tumoral.

Na avaliação da expressão da MMP-2 não foi observada diferença entre os grupos avaliados com relação à intensidade e número de células epiteliais e estromais marcadas. Ao contrário, ARESU et al. (2011) demonstraram elevados níveis de pró-MMP-2 e MMP-2 pelos métodos de zimografia e imuno-histoquímica, respectivamente, nos carcinomas em comparação aos adenomas mamários de cadelas. Contudo, os autores do referido estudo não fazem distinção quanto ao tipo histomorfológico, avaliando em conjunto as diferentes amostras com diagnóstico de carcinoma. Desta forma, a ausência de diferença estatística no presente estudo pode ser atribuída aos tipos tumorais avaliados, que podem sofrer menor influência da MMP-2 em comparação a MMP-9, que exibiu maior intensidade de marcação nos carcinomas avaliados. De acordo com PELLIKAINEN et al. (2004), a expressão de MT-MMP-1 e TIMP-2 nos tecidos contribui para a ativação e regulação da MMP-2 e podem alterar sua participação nos diferentes processos neoplásicos. PAPPARELLA et al. (2002) descrevem a marcação do MMP-2 nas células epiteliais normais e neoplásicas, assim como nas estromais, conforme observado neste estudo.

Menor intensidade de marcação de TIMP-1 foi observada nas células estromais periacinares do carcinoma complexo em relação à mama normal. Em contrapartida, ARESU et al. (2011) não referem diferença na expressão de TIMP-1 no tecido mamário canino normal e neoplásico. Já

KAWAI et al. (2006) demonstram maior expressão desta proteína nos carcinomas, seguidos pelos adenomas e mama normal. Em humanos, a TIMP-1 é descrita como um inibidor da invasão de células tumorais e de metástases. A exemplo, NAKOPOULOU et al. (2003), avaliando a expressão imuno-histoquímica de TIMP-1 em 133 carcinomas infiltrativos de mama de mulheres, observaram o aumento da expressão em células cancerosas em 60,15% dos casos, sendo inversamente relacionado ao grau histológico e nuclear, inversamente proporcional a proliferação celular, e sua superexpressão nas células neoplásicas um fator determinante para o prognóstico favorável em mulheres. Com isso, neste estudo, a redução da expressão de TIMP-1 e a ausência de diferença de TIMP-2 no carcinoma complexo podem indicar maior degradação da MEC e progressão tumoral neste tipo histomorfológico.

Ao avaliar a intensidade de marcação da TIMP-2 em relação aos diagnósticos foi observada maior marcação nas células epiteliais neoplásicas do carcinoma tubulopapilar em relação àquelas da mama normal. O aumento da expressão das TIMP ainda é controverso. Uma vez que sabidamente a TIMP-2 inibe a atividade das MMP, espera-se que frente a níveis elevados desse inibidor não ocorra a progressão tumoral o que, portanto, implica em melhor prognóstico para pacientes com neoplasias (BOURBOULIA & STETLER-STEVENSON, 2010). Contudo, evidências sugerem que as TIMP são proteínas multifuncionais que, em adição ao seu efeito inibitório das MMP, também promovem a proliferação de alguns tipos celulares, e os seus efeitos antiapoptóticos podem favorecer o crescimento inicial do tumor primário (WURTZ et al., 2005).

Em mulheres, o aumento da expressão do TIMP-2 também é correlacionado a maior agressividade tumoral e pior prognóstico (VIZOSO et al., 2007; BREW & NAGASE, 2010). Neste contexto, sugere-se que a maior intensidade de TIMP-2 no carcinoma tubulopapilar possa estar relacionada tanto à inibição da atividade das MMP, como à promoção do crescimento tumoral e degradação da MEC. Entretanto, a ação proliferativa da TIMP-2 juntamente a ação proteolítica da MMP-9 pode sobrepor-se à ação inibitória da TIMP-2 e, com isso, representar evolução e invasão tumoral, já que houve correlação positiva entre estas proteínas. Ainda, a marcação significativa restrita ao carcinoma tubulopapilar sugere a relação da TIMP-2 a este tipo

histomorfológico, assim como ocorre em humanos, nos quais o aumento desta proteína tem sido associado ao tipo histológico ductal (TÊTU et al., 2006; JOBIM et al., 2009).

Diante dos resultados é possível inferir que o equilíbrio entre as metaloproteinases e seus inibidores na mama canina normal pode compreender condição fundamental para a manutenção da homeostase neste tecido, já que somente correlação positiva entre MMP-9 e TIMP-1 foi observada neste grupo. Ainda, alterações quantitativas em excesso de TIMP e MMP, em especial de MMP-9 e TIMP-2, parecem compor fator importante na evolução tumoral e ocorrência de metástases em relação aos carcinomas tubulopapilar e complexo nas cadelas.

CONCLUSÕES

Há variação na expressão da MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 em função dos tipos histomorfológicos, além de correlação positiva entre TIMP-1 e MMP-9 nas mamas normais e entre MMP-9 e TIMP-2 no carcinoma tubulopapilar. A atividade equilibrada entre MMP-9, MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 pode ser fundamental à homeostase do tecido mamário canino normal enquanto o aumento da expressão de MMP-9 e TIMP-2, e a expressão reduzida de TIMP-1 nos carcinomas pode representar condição adequada à evolução tumoral.

REFERÊNCIAS

1. ARESU, L.; GIANTIN, M.; MORELLO, E.; VASCELLARI, M.; CASTAGNARO, M.; LOPPARELLI, R.; ZANCANELLA, V.; GRANATO, A.; GARBISA, S.; ARICÒ, A.; BRADASCHIA, A.; MUTINELLI, F.; DACASTO, M. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in canine mammary tumors, **BMC Veterinary Research**, London, v. 7, n. 33, 2011.
2. BERGAMASCHI, A.; TAGLIABUE, E.; SORLIE, T.; NAUME, B.; TRIULZI, T.; ORLANDI, R.; RUSSNES, H. G.; NESLAND, J.M.; TAMMI, R.; AUVINEN, P.; KOSMA, V. M.; MENARD, S.; BORRESEN-DALE, A. L. Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with

different clinical outcome. **Journal of Pathology**, Sussex, v. 214, n. 3, p. 357-367, 2008.

3. BOURBOULIA, D.; STETLER-STEVENSON, W. G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. **Seminars in Cancer Biology**, Amsterdam, v. 20, n. 3, p. 161-168, 2010.
4. BREW, K.; NAGASE, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1803, p. 55-71, 2010.
5. BUBENDORF, L.; NOCITO, A.; MOCH, H.; SAUTER, G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. **Journal of Pathology**, Sussex, v. 195, n. 1, p. 72-79, 2001.
6. CURRAN, S.; MURRAY, G. I. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. **Journal of Pathology**, Sussex, v. 189, p. 300-308, 1999.
7. DE NARDI A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; COSTA, T. A.; MACEDO, T. R.; RODIGHIERI, S. M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C. H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v.7, n. 2, p. 15-26, 2002.
8. DOYLE, D. M.; MILLER, K. D. Development of new targeted therapies for breast cancer, **Breast Cancer**, Tokyo, v. 15, p. 49-56, 2008.
9. FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 1, 2011, 1524p.
10. GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 48, n. 1, p. 117-131, 2011.
11. HAO, L.; ZHANG, C.; QIU, Y.; WANG, L.; LUO, Y.; JIN, M.; ZHANG, Y.; GUO, T. B.; MATSUSHIMA, K.; ZHANG, Y. Recombination of CXCR4, VEGF, and MMP-9 predicting lymph node metastasis in human breast cancer. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 253, p. 34-42, 2007.
12. HIRAYAMA, K.; YOKOTAY, H.; ONAI, R.; KOBAYASHIY, T.; KUMATAY, T.; KIHARA, K.; OKAMOTO, M.; SAKO, T.; NAKADEZ, T.; IZUMISAWAZ, Y.; TANIYAMA, H. Detection of matrix metalloproteinases in canine mammary tumours: analysis by immunohistochemistry and zymography. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 127, p. 249-256, 2002.

13. HIRVONEN, R.; TALVENSAARI-MATTILA, A.; PAAKKO, P.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in T(1-2) NO breast carcinoma. **Breast Cancer Research**, The Hage, v. 77, p. 85-91, 2003.
14. JOBIM, F. C.; XAVIER, N. L.; UCHOA, D. M.; CRUZ, D. B.; SACIOTO, M.; CHEMELLO, N.; SCHWARTSMANN, G. Prevalence of vascular-endothelial growth factor, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in primary breast cancer. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 42, n. 10, p. 979-987, 2009.
15. KAWAI, K.; UETSUKA, K.; DOI, K.; NAKAYAMA, H. The activity of matrix metalloproteinase (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in mammary tumors of dogs and rats. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 68, n. 2, p. 105-111, 2006.
16. KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment, **Cell**, Cambridge, v. 141, n. 1, p. 52-67, 2010.
17. KHASIGOV, P. Z.; PODOBED, O. V.; GRACHEVA, T. S.; SALBIEV, K. D.; GRACHEV S. V.; BEREZOV, T. T. Role of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Tumor Invasion and Metastasis. **Biochemistry**, Moscow, v. 68, n. 7, p. 711-717, 2003.
18. KIM, H. J.; PARK, C. I.; PARK, B. W.; LEE, H. D.; JUNG, W. H. Expression of MT-1 MMP, MMP2, MMP9 and TIMP2 mRNAs in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. **Yonsei Medical Journal**, Seoul, v. 47, p. 333-342, 2006.
19. KONONEN, J.; BUBENDORF, L.; KALLIONIEMI, A.; BARLUND, M.; SCHRAML, P.; LEIGHTON, S.; TORHORST, J.; MIHATSCH, M. J.; SAUTER, G.; KALLIONIMENI, O. P. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling tumor of specimens. **Nature Medicine**, New York, v. 4, n. 7, p. 844-847, 1998.
20. LAMBERT, E.; DASSE, E.; HAYE, B.; PETITFRERE, E. TIMPs as multifacial proteins. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Boca Raton, v. 49, p. 187-198, 2004.
21. LOUKOPOULOS, P.; MUNGALL, B. A.; STRAW, R. C.; THORNTON, J. R.; ROBINSON, W. F. Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Involvement in Canine Tumors. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 40, n. 4, p. 382-94, 2003.
22. MORRIS, J.; DOBSON, J. **Small Animal Oncology**. Oxford: Blackwell Science, 2001, 315p.

23. NAKOPOULOU, L.; GIANNOPOULOU, I.; LAZARIS, A.; ALEXANDROU, P.; TSIRMPA, I.; MARKAKI, S.; PANAYOTOPOULOU, E.; KERAMOPOULOS, A. The favorable prognostic impact of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 protein overexpression in breast cancer cells. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Kobenhavn, v. 111, p. 1027-1036, 2003.
24. PAPPARELLA, S.; RESTUCCI, B.; PACIELLO, O.; MAIOLINO, P. Expression of matrix metalloprotease-2 (MMP-2) and the activator membrane type 1 (MT1- MMP) in canine mammary carcinomas. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 126, n. 4, p. 271-276, 2002.
25. PELLIKAINEN, J. M.; ROPPONEN, K. M.; KATAJA, V. V.; KELLOKOSKI, J. K.; ESKELINEN, M. J.; KOSMA, V. M. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. **Clinical Cancer Research**, Atlanta, v. 10, p. 7621-7628, 2004.
26. RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J.; MACEWEN E. G. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW S. J.; MACEWEN E. G. **Small Animal Clinical Oncology**. 3.ed.: Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. p. 455-477.
27. STAMENKOVIC, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Seminars in cancer biology**, Amsterdam, v. 10, n. 6, p. 415-433, 2000.
28. STETLER-STEVENSON, W. G. Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. **American Journal of Pathology**, New York, v. 148, p. 1345-1350, 1996.
29. TÊTU, B.; BRISSON, J.; WANG, G. S.; LAPOINTE, H.; BEAUDRY, G.; BLANCHETTE, C. The influence of MMP-14, TIMP-2 and MMP-2 expression on breast cancer prognosis. **Breast Cancer Research**, The Hage, v. 8, 28p, 2006.
30. VIZOSO, F. J.; GONZALEZ, L. O.; CORTE, M. D.; RODRIGUEZ, J. C.; VAZQUEZ, J.; LAMELAS, M. L.; JUNQUERA, S.; MERINO, A. M.; GARCIA-MUNIZ, J. L. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. **British Journal of Cancer**, Edinburg, v. 96, n. 6, p. 903-911, 2007.
31. WURTZ, S. O.; SCHROHL, A.; MOLLER, N.; SORENSEN, N.; LADEMANN, U.; CHRISTENSEN, I. J.; MOURIDSEN, H.; BRUNNER, N. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, Woodlands, v. 12, n. 215-227, 2005.

32. YOKOTA, H.; KUMATA, T.; TAKETABA, S.; KOBAYASHI, T.; MOUE, H.; TANIYAMA, H.; HIRAYAMA, K.; KAGAWA, Y.; ITOH, N.; FUJITA, O.; NAKADE, T.; YUASA, A. High expression of 92 kDa type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) in canine mammary adenocarcinoma. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1568, n. 1, p. 7-12, 2001.
33. ZHANG, X.; WANG, Y.; YAMAMOTO, G.; TACHIKAWA, T. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in the epithelium and stroma of salivary gland pleomorphic adenomas. **Histopathology**, Oxford, v. 55, n. 3, p. 250-260, 2009.

CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho possibilitou verificar diferenças de expressão das proteínas MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 na glândula mamária canina em função do tipo histomorfológico. A MMP-9 foi mais expressa nas células mesenquimais e epiteliais dos carcinomas complexos e tubulopapilares quando comparados à mama normal, enquanto a TIMP-2 foi mais expressa neste último em relação à mama normal. A TIMP-1 esteve menos expressa nas células estromais do carcinoma complexo em relação à mama normal.

A correlação observada entre TIMP-1 e MMP-9 na mama normal sugere que o aumento concomitante destas proteínas desempenha papel fundamental na manutenção da homeostase neste tecido, e o desbalanço entre as mesmas, seja por aumento ou redução, pode facilitar a progressão tumoral. Ainda, o aumento da expressão da MMP-9 pode estar relacionada ao carcinoma tubulopapilar, assim como ocorre em humanos.

A graduação dos tumores mamários mostrou-se um método prático, relativamente rápido e que, uma vez aplicado, pode fornecer informações relevantes sobre o comportamento biológico do tumor, assim como auxiliar o clínico na definição terapêutica e prognóstica.

Ressalta-se a importância do preenchimento completo da anamnese no formulário de requisição de exames histopatológicos, em especial o tamanho da neoplasia, característica pouco mencionada, cuja ausência, na maioria dos casos, inviabilizou sua correlação com outros parâmetros clínico-patológicos no presente estudo.