

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**MICHELLY KHEIDY BORGES BATTISTI**

**PROTEINOGRAMA SÉRICO EM CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA**

**CURITIBA**

**2012**

**MICHELLY KHEIDY BORGES BATTISTI**

**PROTEINOGRAMA SÉRICO EM CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA E**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de concentração Patologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Domit Guérios

Co-orientadora: Profa. Dra. Rosangela Locatelli Dittrich

Comitê de orientação:

Profa. Dra. Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt

Profa. Dra. Tilde Froes

**CURITIBA**

**2012**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “**PROTEINOGRAMA SÉRICO EM CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA**” apresentada pela Mestranda **MICHELLY KHEIDY BORGES BATTISTI** declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou a candidata apta para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 20 de março de 2012

Professora Dra. Simone Domit Guérios  
Presidente/Orientadora

Professora Dra. Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt

Membro

Professora Dra. Rosângela Locatelli Dittrich  
Membro

Dedico este trabalho Àquele que me trouxe até aqui, que conduz meus passos, que desenha meu caminho, meu Senhor e meu Deus. Dedico à missão de ensinar, de pesquisar, à arte de amar e de doar, de repartir.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço às **minhas famílias amadas**, sim porque tenho mais de uma! Agradeço à família que me gerou, educou, que me amou e ama e que mesmo sem compreender plenamente minhas escolhas e minha missão, reza por mim. Agradeço e dedico este trabalho ao homem que me ensinou a amar gratuitamente e que acolhe meu plano de vida: **Pai!** À mulher que me ensinou a não desistir nunca: **Mãe**, obrigada! À minha mana, **Manuely Battisti de Oliveira** e ao seu marido **Jonas de Oliveira**, que moram no meu coração!

Agradeço especialmente e dedico este trabalho à minha amiga, “irmã-gêmea”, **Paula Cristina dos Reis**, e à minha **segunda família**, especialmente à mama, **Ivete dos Reis**, que me acolheu num momento delicado da minha vida, onde eu saía da vida religiosa pra continuar atendendo O chamado particular de Deus pra mim, finalmente, de volta à Universidade. Vocês entenderam tudo, obrigada!

À minha orientadora, professora **Simone Domit Guerios**, pelas pesquisas, por corrigir e assinar tantos e tantos relatórios! Mas principalmente pela alegria e partilha de vida. Foram dois anos de acréscimos à minha vida profissional e pessoal, muito obrigada. À professora **Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt**, Unesp/Botucatu, por possibilitar a realização deste trabalho e pela disponibilidade em esclarecer dúvidas e partilhar conhecimento.

À professora **Rosângela Locatelli Dittrich**, por aceitar coorientar e pelas contribuições científicas. E aos demais professores da pós-graduação, que não se importam em partilhar conhecimento e vida, obrigada! Ao professor **Jurandir Fagliari**, da Unesp/Jaboticabal. Por me receber tão bem, pela gentileza em partilhar conhecimentos e pela análise e marcação do gráfico da eletroforese.

Ao meu querido professor, **Pedro Ribas Werner**. Não um professor, mas O professor, de aulas ímpares e conselhos cheios de verdade. Professor Pedro, muitos dias aqui, na UFPR, eu busquei inspiração no seu exemplo. Uma conversa na graduação, um conselho de pai, me fez compreender que era preciso optar, decidir um norte, e ter paciência, obrigada!

Agradeço às minhas amigas **Raquel Cantarella, Ana Laura D'Amico Fan** (quase co-orientadora! Valeu amiga!), **Andrea Meirelles, Angela Coraiola, Suelen Baldotto, Ana Carolina Rodarte**, meninas, nós juntas somos demais! Pelos sorrisos, pelas lágrimas, pela vida partilhada. Vocês são incríveis!

Aos residentes **Daniela Mattos, Bruno Castilhos, Nathalia Leite e Diego Roscamp de Oliveira**, e às graduandas **Mhayara Reusing e Aline Franciosi** pelo material coletado, pelas informações partilhadas, pela disponibilidade. Foi muito bom estudar, trocar conhecimento e estar com vocês! Vamos que vamos, o doutorado, mais cedo ou mais tarde, nos espera! Ao funcionário do laboratório de Patologia Clínica, **Olair Beltrame**, pela paciência, por ser sempre tão gentil e prestativo. Ao pessoal da recepção, por pegar todas as mais de 100 fichas clínicas pesquisadas!

Aos amigos do Labea (Laboratório de bem-estar animal), que sempre me acolheram com tanto carinho! Especialmente **Janaína HammerShmidt**, e ao meu amigo e consultor de estatística, **Giorgi Dal Ponte**, que teve importância significativa ( $***P < 0,0001$ ), nos cálculos desta pesquisa!

Aos meus amigos e colegas da Clínica Veterinária São José, especialmente à **Adriana e Soloel Ribeiro**, que apoiaram esta pesquisa e a necessidade da minha ausência, Deus os abençoe!

Aos meus amados amigos e intercessores: **Ir. Maria Marlene Rizzotto, Normanda Araujo Moraes, Ir. Marizele Cassiano Rêgo, Pe. Adalto Chitolina, Ir. Ema Melânia. Ir. Romana Berton**, às hoje, irmãs, e que foram comigo, noviças salvatorianas, **Janice, Jove, Liotânia, Vanúcia e Talita**, e ao meu amado intercessor e irmão de sangue, de fé, de caminhada, **Maycon Battisti**, seminarista diocesano. Eu o amo muito meu irmão! Muito obrigada pelo seu amor! A todos que rezam por mim.

Agradeço o apoio do **Laboratório Biotécnica®**, que fez a doação do Kit para a realização das provas de PCR e também ao Dr. **Cláudio Gusso**, do Laboratório de Análises Químicas São José pelo incentivo à pesquisa científica.

Aos animais que mesmo sem saber, sem ter consciência do significado, participam de tantas pesquisas e colaboram pra que muitas vidas sejam salvas, inclusive e principalmente vidas humanas.

*“Todas as coisas da criação são filhos do Pai e irmãos do homem...*

*Deus quer que ajudemos aos animais, se necessitam de ajuda.*

*Toda criatura em desgraça tem o mesmo direito a ser protegida.”*

*São Francisco de Assis*

*“Nunca perca de vista o seu ponto de partida.”*

*Sta. Clara Assis*

## **RESUMO**

As presentes pesquisas buscaram contribuir para a oncologia e para o ensino da técnica cirúrgica em medicina veterinária. Este trabalho foi dividido em três capítulos independentes entre si. O primeiro capítulo faz uma importante revisão bibliográfica sobre as proteínas de fase aguda presentes no soro de cães, trazendo informação a fim de ampliar o conhecimento e auxiliar a entender o papel destas proteínas como parte da resposta orgânica a processos de injúria tecidual e de restabelecimento da homeostase corporal. O segundo capítulo tem como enfoque a mensuração e avaliação das concentrações de proteínas de fase aguda no soro de cadelas com neoplasia mamária. Foram avaliadas 20 cadelas saudáveis no grupo controle e 43 cadelas com neoplasia mamária, sendo 13 neoplasias benignas, oito neoplasias malignas ulceradas e 23 neoplasias malignas não ulceradas. Os resultados demonstraram que a mensuração sérica das proteínas de fase aguda tem forte potencial no auxílio diagnóstico à oncologia veterinária. O terceiro capítulo é uma comunicação breve, e versa sobre a avaliação sérica das imunoglobulinas, IgA e IgG em cadelas com neoplasia mamária, através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida em SDS-PAGE. Percebe-se nitidamente a necessidade de novas pesquisas a fim de esclarecer a função destas imunoglobulinas frente o câncer de mama em cadelas. O objetivo desta pesquisa e dissertação de mestrado está centrado na busca por novas ferramentas que auxiliem o clínico veterinário no entendimento, no diagnóstico e no prognóstico de cadelas acometidas por neoplasia mamária.

**PALAVRAS-CHAVE:** câncer de mama, cão, diagnóstico, imunoglobulina, proteínas de fase aguda.

## **ABSTRACT**

The present research sought to contribute to the oncology and to the teaching surgical technique in veterinary medicine. This work was divided into three chapters. The first chapter makes an important review about acute phase protein in serum of dogs, bringing



information to broaden the knowledge and help us to understand the role of these proteins as part of the process of organic response to tissue injury, and restoration of body homeostasis. The second chapter focuses on the measurement of concentration of acute phase proteins in serum of female dog with breast cancer, and healthy female dogs. The results show that measurement of serum acute phase proteins have great potential in diagnosis to veterinary oncology. The third chapter is a brief communication, and focuses on the evaluation of serum immunoglobulins, IgG and IgA in female dogs with mammary neoplasia, using the technique of polyacrylamide gel electrophoresis in SDS-PAGE. We can clearly perceive the need for further research to clarify the role of these immunoglobulins against breast cancer in female dogs. The objective of this research and dissertation is focused on the search for new tools that assist the veterinary practitioner in understanding, diagnosis and prognosis of dogs affected by breast cancer.

**KEY WORDS:** breast cancer, diagnosis, dog, immunoglobulin, acute phase protein

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Curva eletroforética obtida a partir do escaneamento da amostra de soro de uma cadela do grupo controle.....39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações séricas das proteínas (mg/dL) obtidas em matriz de gel de poliacrilamida de cadelas pertencentes aos grupos controle, neoplasia mamária benigna, neoplasia mamária maligna não ulcerada e neoplasia mamária maligna ulcerada.....40

Tabela 2 - Concentração sérica de igg e iga obtidas pelo metodo de eletroforese em gel de poliacrilamida, em cadelas saudáveis e com neoplasia mamária.....54

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2.	OBJETIVOS.....	14
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14

### CAPÍTULO I – PROTEÍNAS DE FASE AGUDA, APLICAÇÃO PROGNÓSTICA E DIAGNÓSTICA COM ÊNFASE À ONCOLOGIA VETERINÁRIA – ARTIGO DE REVISÃO.....15

1.	INTRODUÇÃO.....	17
2.	DESENVOLVIMENTO.....	18
2.1.	Funções das PFA.....	18
2.2.	Características das PFA.....	19
	a. Proteína C reativa (PCR).....	19
	b. Amilóide Sérico A (SAA).....	20
	c. Haptoglobina (Hp).....	21
	d. Alfa-1-glicoproteína Ácida (AGP).....	23
	e. Alfa-1-antitripsina.....	24
	f. Ceruloplasmina (Cp).....	24
	g. Transferrina.....	25
	h. Albumina.....	26
3.	CONCLUSÃO.....	27
4.	REFERÊNCIAS.....	28

### CAPÍTULO II – PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA.....33

1.	INTRODUÇÃO.....	35
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.	RESULTADOS .....	37
4.	DISCUSSÃO.....	41
5.	CONCLUSÃO.....	43
6.	REFERÊNCIAS.....	44

CAPÍTULO III – IMUNOGLOBULINAS IGA E IGG EM CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA.....	49
1. INTRODUÇÃO.....	51
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
3. RESULTADOS.....	53
4. DISCUSSÃO.....	55
5. CONCLUSÃO.....	57
6. REFERÊNCIAS.....	57

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A resposta inflamatória é desencadeada imediatamente após a instalação da lesão celular. Tem como propósito a homeostasia corporal. Está intimamente envolvido à resposta de fase aguda a síntese e liberação de proteínas na corrente sanguínea, chamadas proteínas de fase aguda. (TECLES et al, 2009).

As proteínas séricas de fase aguda são moléculas presentes no soro, cuja concentração é alterada na ocorrência de processos infecciosos, inflamatórios e/ou neoplásicos (KURIBAYASHI, et al., 2011; MYLONAKIS et al., 2011; CALAZANS et al., 2009; CÉRON, et al., 2005; YAMAMOTO et al., 1993). As PFA podem ser consideradas marcadores da inflamação, fornecendo informações úteis para o diagnóstico clínico e monitoramento de diversas doenças, incluindo neoplasias (Crossley et al, 2010). As imunoglobulinas são glicoproteínas presentes no soro sanguíneo e em secreções corporais como saliva, leite, muco traqueo-bronquial, lágrima, plasma seminal, e que podem sofrer alterações diante de processos inflamatórios, uma vez que atuam na mediação da inflamação (ROIT, BROSTOFF e MALE, 2003). A IgG e a IgA são constituintes do soro e atuam como anticorpos mediante processos invasivos e/ou inflamatórios do organismo, atuando fortemente no sistema de defesa e auxiliando na recuperação da homeostase corporal (TIZARD, 2002).

O câncer é um dos distúrbios orgânicos com capacidade de causar variações nos valores séricos das proteínas de fase aguda em função da ação inflamatória, do tamanho da massa tumoral e da presença ou não de ulcerações cutâneas (TECLES *et al.*, 2009). Alterações nas concentrações séricas de PFA foram encontradas em cães com linfoma (CALAZANS et al., 2009; ECKERSSAL, 2008), em cadelas com neoplasias mamárias (CROSSLEY et al., 2010; PLANELLAS et al., 2009) e em estudos com pessoas, observou-se a presença de imunoglobulinas em células cancerígenas (HU et al., 2008).

As PFA vêm sendo amplamente investigadas como marcadores biológicos em pacientes neoplásicos. O câncer de mama pode causar variações nos valores séricas das PFA (CROSSLEY et al., 2010; VIEIRA, 2009) em função do estímulo inflamatório, do tamanho do tumor primário, da presença de metástases e principalmente quando há presença de ulceração (TECLES *et al.*, 2009).

## 2. OBJETIVOS

### a. Objetivo Geral

Avaliar alterações nas concentrações de proteínas de fase aguda e das imunoglobulinas G e A em cadelas com neoplasia mamária

### b. Objetivos Específicos

Avaliar as concentrações séricas de proteínas de fase aguda pela técnica de eletroforese em gel de agarose em cadelas adultas, saudáveis;

Avaliar as concentrações séricas de IgG e IgA pela técnica de eletroforese em gel de agarose em cadelas adultas, saudáveis;

Avaliar as concentrações séricas da proteína C reativa pelo método ultra-sensível turbidimétrico em cadelas adultas, saudáveis;

Avaliar as concentrações séricas de proteínas de fase aguda pela técnica de eletroforese em gel de agarose em cadelas com neoplasia;

Avaliar as concentrações séricas de proteínas de IgG e IgA pela técnica de eletroforese em gel de agarose em cadelas com neoplasia;

Avaliar as concentrações séricas da proteína C reativa pelo método ultra-sensível turbidimétrico em cadelas com neoplasia mamária.

Avaliar se existe correlação entre as concentrações séricas de proteínas de fase aguda, diagnóstico e prognóstico de neoplasia mamária em cadelas.

Avaliar se existe correlação entre as concentrações séricas de IgG e IgA, diagnóstico e prognóstico de neoplasia mamária em cadelas.

Comparar os resultados das concentrações proteicas e de IgG e IgA com a taxa total de leucócitos circulantes a fim de avaliar a presença concomitante de inflamação aguda.

## **CAPÍTULO I**

### **PROTEÍNAS DE FASE AGUDA, APLICAÇÃO PROGNÓSTICA E DIAGNÓSTICA COM ÊNFASE À ONCOLOGIA VETERINÁRIA – ARTIGO DE REVISÃO**

#### **ACUTE PHASE PROTEIN, PROGNOSIS AND DIAGNOSIS IN VETERINARY ONCOLOGY - REVIEW ARTICLE**

#### **RESUMO**

As proteínas de fase aguda (PFA) são parte de um complexo sistema do organismo que respondem rapidamente ao dano celular ou tecidual, denominado resposta de fase aguda (RFA). Os processos de lesão celular ou tecidual, como as neoplasias, são capazes de alterar a concentração sérica de determinadas PFA. Desta forma, as PFA expressam potencial como marcadores biológicos, podendo ser usadas como ferramentas auxiliares no diagnóstico, monitoramento e prognóstico de diversas doenças, incluindo as neoplasias. As principais PFA estudadas na medicina veterinária são a proteína C reativa, amilóide sérico A, haptoglobina, ceruloplasmina, transferrina, albumina,  $\alpha$ -1-glicoproteína ácida e  $\alpha$ -1-antitripsina. O presente trabalho teve por objetivo trazer uma revisão bibliográfica sobre as alterações nas concentrações séricas das PFA em animais com neoplasias e suas utilizações como biomarcadores.

**PALAVRAS-CHAVE:** diagnóstico, proteínas de fase aguda, oncologia veterinária, neoplasia, cão.



## ABSTRACT

The acute phase proteins (APP) are a class of proteins whose plasma concentrations change soon after cell or tissue damage. This response is called the acute phase response (APR). Cancer may increase or decrease APP plasma concentration. The APP has been shown to aid in diagnosis and prognosis of many diseases, including cancer. Therefore, they might be used as biomarkers. The most APP studied in veterinary medicine are C-reactive protein, serum amyloid A, haptoglobina, ceruloplasmina, transferrin,  $\alpha$ -1-acid glycoprotein and  $\alpha$ -1-antitrypsin. This article aims to review insights gained into APP plasma concentration changes in animals with cancer, and how they can be useful as a cancer biomarkers.

**KEY-WORDS:** diagnosis, acute phase protein, veterinary oncology, neoplasm, dog.

## 1. INTRODUÇÃO

As proteínas de fase aguda (PFA) são parte de um complexo sistema do organismo que responde rapidamente ao dano celular ou tecidual. Este sistema é denominado resposta de fase aguda (RFA), podendo ser desencadeado por infecções bacterianas ou virais, inflamações, neoplasias, traumas cirúrgicos, endotoxemias, queimaduras, infecções neonatais, gestação e estresse (MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2001). O principal objetivo da RFA é restabelecer a homeostase corporal, atuando ativamente no processo de cura. (CERÓN, ECKERSALL e MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005).

A RFA é caracterizada por alterações orgânicas variadas como febre, leucocitose, aumento da concentração sérica de cortisol, diminuição de tiroxina, ativação de trocas metabólicas – como lipólise e gliconeogênese -, e diminuições séricas de zinco e ferro (CERÓN, ECKERSALL e MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005). A RFA inclui a mobilização das PFA de forma que a síntese e a liberação destas proteínas podem sofrer alterações dependendo da doença em questão. As alterações na concentração das PFA acontecem mediante estímulo de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas (IL-1, IL-6 e o fator de necrose tumoral alfa – TNF- $\alpha$ ). O fígado é o principal órgão responsável pela síntese e liberação das PFA, contudo, outros órgãos e tecidos como rins, intestino, glândula mamária, adipócitos e pulmões também podem exercer esse papel (CERÓN, ECKERSALL e MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005).

As PFA são classificadas em positivas e negativas. As PFA positivas são aquelas cuja concentração sérica aumenta diante de injúrias teciduais, processos infecciosos, inflamatórios e neoplásicos. Por sua vez, as PFA negativas são aquelas cuja concentração sérica reduz em resposta a estes processos. As PFA positivas podem ainda ser subdivididas em PFA positivas maiores (cuja concentração sérica sofre elevação rápida, mas não se mantém elevada por muito tempo, retornando também de forma rápida aos valores basais), e as PFA positivas moderadas (que aumentam mais lentamente e permanecem elevadas por mais tempo). No cão, as principais PFA positivas maiores são a proteína C reativa (PCR) e o amiloide sérico A (ASA), a principal PFA positiva moderada é a Haptoglobina (Hp) e as principais PFA negativas são a albumina e a transferrina (CERÓN, ECKERSALL e MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005).

A RFA, como o próprio nome diz, acontece rapidamente e tem curta duração. Porém, em doenças crônicas como neoplasias pode ocorrer a manutenção nas alterações de PFA (CERÓN, ECKERSALL e MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005). Acredita-se que a quantificação da concentração das PFA é capaz de fornecer informações importantes a respeito do estado de saúde do paciente, com potencial de avaliação diagnóstica e prognóstica diante de diversos distúrbios orgânicos (MURATA, SHIMADA e YOSHIOKA, 2004). Esta avaliação seroproteica vem sendo utilizadas na veterinária como marcador biológico em animais com câncer (MADEWELL, 1997). Nas neoplasias em geral, alterações nas concentrações séricas de PFA estão associadas ao grau de malignidade tumoral e à sua capacidade de produzir metástase (MARTÍNEZ-SUBIELA, PARRA e CERÓN, 2004).

## **2. DESENVOLVIMENTO**

### **2.1. Função das PFA**

As funções das PFA ainda não estão completamente esclarecidas. De maneira geral, elas atuam no restabelecimento da homeostase corporal através do transporte de substâncias tanto endógenas quanto exógenas (como heparina, histamina, e esteróides, , transporte de fármacos, sequestro e transporte de ferro (MURATA, SHIMADA e YOSHIOKA, 2004). Atuam no controle do crescimento bacteriano, da manutenção da pressão oncótica (CERÓN, ECKERSALL e MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005). E Estão envolvidas na regulação da resposta imune e na proteção contra infecções. Tem papel importante na distribuição de fármacos no organismo, inclusive com implicações na resposta terapêutica, uma vez que algumas PFA como a albumina são importantes transportadores de drogas (CERÓN, ECKERSALL e MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005).

## 2.2. Características das PFA

### a) Proteína C reativa (PCR)

A PCR tem peso de aproximadamente 100 kDa, é sintetizada principalmente pelo fígado e sua regulação se dá por meio de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e o FNT- $\alpha$ . Tem como principais funções a opsonização bacteriana, facilitando a fagocitose das bactérias, modulação de monócitos, macrófagos e produção de citocinas, união à cromatina bacteriana e controle da migração de neutrófilos nos tecidos (PETERSEN, NIELSEN e REEGAARD, 2004). Segundo Petersen, Nielsen e Reegaard (2004), o aumento da concentração sérica de PCR nos estágios iniciais da infecção precede a elevação da temperatura retal, sinal clínico característico da inflamação, caracterizando a PCR como importante PFA para monitoramento clínico do paciente. Trata-se da principal FPA em cães e vem sendo amplamente estudada como marcador biológico de diversos distúrbios inflamatórios e infecciosos como na piometra (CARVALHO et al., 2008), síndrome do abdômen agudo (GALEZOWSKI, et al., 2010), anemia hemolítica imunomediada (GRIEBSCH et al., 2009), erliquiose (MYLONAKIS et al., 2011), e em pacientes cancerígenos, como cadelas com neoplasia mamária (PLANELLAS, et al., 2009; TECLES et al., 2009; CROSSLEY et al., 2010).

Na medicina, Stark et al (2009) sugerem que níveis elevados de PCR, associados à elevação da interleucina IL-6 podem auxiliar na avaliação prognóstica de homens com câncer de próstata. Na veterinária, níveis elevados de PCR foram encontrados em cães com linfoma (CALAZANS et al., 2009) e com leucemia. Além disso, a PCR pode ser utilizada para monitorar a resposta ao tratamento de neoplasias hematológicas em cães (TECLES et al., 2005). Concentrações elevadas de PCR sérica foram observadas em cadelas acometidas por neoplasias mamárias em estágio avançado, especialmente naquelas pacientes com metástase tumoral, onde a média da concentração sérica da PCR apresentou-se 88 vezes mais alta que a média de cães saudáveis (TECLES et al., 2009).

Pesquisas recentes sugerem que elevações nas concentrações de PCR podem estar associadas à presença de neoplasias malignas sem a ocorrência de doença concomitante. Um fator que colabora para que isto aconteça é o processo de antigenicidade neoplásica. A antigenicidade neoplásica se dá somente em neoplasias malignas. Este processo ocorre devido a mudanças moleculares na membrana celular,

induzindo à resposta antigênica, que é responsável inclusive, pela estimulação de macrófagos, de interleucinas e do FNT- $\alpha$  (DUHARTE, 2003), substâncias responsáveis pela síntese e liberação das PFA (CERÓN, ECKERSALL e MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005).

Cadelas com carcinoma mamário apresentaram concentrações elevadas de PCR sérica em relação às cadelas com adenomas e tumores mistos benignos em mama, sugerindo que os carcinomas promovem maior estímulo inflamatório que outras neoplasias mamárias (PLANELLAS et al., 2009). Um estudo realizado no Chile demonstrou que cadelas acometidas por tumor de mama com concentrações séricas da PCR  $\geq 8$ mg/L tem 61% de probabilidade de malignidade tumoral (CROSSLEY et al., 2010). O mesmo foi observado por Tecles et al. (2009), e Planellas et al. (2009), ao estudar a PCR em cadelas com tumores mamários.

#### b) Amilóide Sérico A (SAA)

A SAA é uma proteína pequena com peso molecular de 15 kDa (CÉRON, TECLES e MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005). É a principal PFA em bovinos e em equinos (MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2001), e vem sendo estudada em cães como marcador biológico da inflamação. Juntamente com a PCR e o fibrinogênio, faz parte do grupo de proteínas que intervém na resposta imune do organismo frente a agentes patogênicos, como por exemplo, na parvovirose (YULE et al., 1997). A estrutura da SAA em cães e em humanos se assemelha, porém em cães a estrutura primária da SAA apresenta um peptídeo adicional, composto por oito aminoácidos, inexistente na SAA humana. Esta diferença explica a dificuldade para dosar esta proteína em cachorros, uma vez que são utilizados reagentes humanos. Contudo, testes com antígeno monoclonal contra o antígeno humano tem sido usados com sucesso para dosar SAA de cães e um antígeno policlonal tem sido usado para dosar a SAA de gatos (CÉRON, TECLES e MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005).

As funções orgânicas da SAA ainda não estão completamente esclarecidas. Pesquisas apontam para a atuação da SAA como reguladora de citocinas pró-inflamatórias, na detoxificação de endotoxinas, no transporte do colesterol advindo de células mortas para os hepatócitos, na inibição da febre, da oxidase dos neutrófilos e da

agregação plaquetária e na indução e mobilização do cálcio pelos monócitos (PETERSEN, NIELSEN e REEGAARD, 2004).

Em pesquisa realizada com cadelas portadoras de neoplasia mamária, observou-se aumento da concentração sérica de SAA nas pacientes com estágio mais avançado da doença. Cadelas em estágio IV e V apresentaram níveis séricos médios de 138,3 mg/l e 61,05 mg/l respectivamente, enquanto que pacientes em estágios I, II e III não apresentaram valores maiores que 11,73 mg/l (TECLES et al., 2009). O mesmo estudo demonstrou que a SAA esteve significativamente alta nas pacientes com metástases, com neoplasias ulceradas e com tumores maiores que 5 cm de diâmetro em comparação aos valores séricos de pacientes saudáveis, sugerindo a utilização desta proteína como ferramenta de auxílio prognóstico em cadelas com câncer de mama.

Nas cadelas com neoplasia mamária e presença de metástase o aumento da concentração sérica de SAA e PCR pode ser explicado em parte devido à invasão e ao dano tecidual causados pelas células neoplásicas ou, pela intensa reação inflamatória desencadeada pela metástase. Outra hipótese é de que pacientes com metástases estejam imunossuprimidos, o que abre portas para infecções secundárias que estimulam a síntese e liberação de PFA através da RFA (TECLES et al., 2009).

O comportamento da SAA foi avaliado em cães com linfoma e com leucemia e em ambos os casos a SAA não apresentou alterações significativas na sua concentração sérica em relação aos cães saudáveis. O resultado sugere que a SAA pode não ser uma ferramenta eficaz como marcador biológico em cães com linfoma ou com leucemia (TECLES et al., 2005).

#### c) Haptoglobina (Hp)

A Hp é uma alfa-2-globulina sintetizada pelos hepatócitos. Seu peso molecular é de aproximadamente 125 kDa. Tem como funções principais, atividade anti-inflamatória, agente bacteriostático, antioxidante celular (através de ligação à hemoglobina livre) e facilitadora da atividade dos macrófagos. A Hp é capaz de reduzir o dano tecidual e o crescimento bacteriano nos sítios de inflamação como resultado de sua atividade anti-inflamatória e da ligação com a hemoglobina (Hb) (THEILGAARD-MÖNCH et al., 2006).

A redução do dano tecidual se dá pela formação do complexo Hp-Hb, que evita a perda de ferro durante processos inflamatórios e/ou infecciosos. A formação do complexo Hp-Hb faz uma ponte de alta especificidade com o receptor de macrófagos, CD 136, que por sua vez promove endocitose, resultando em degradação celular. O complexo Hp-Hb reduz a perda de hemoglobina livre através da filtração glomerular e otimiza a utilização do ferro (THEILGAARD-MÖNCH et al., 2006). É exatamente a privação do ferro necessária ao crescimento bacteriano que confere à Hp sua função bacteriostática (PETERSEN, NIELSEN e REGAARD, 2004). Isto explica porque a concentração sérica de Hp diminui consideravelmente quando há hemoglobina livre no plasma, uma vez que o complexo Hp-Hb é removido rapidamente para o fígado. Como a concentração sérica da Hp aumenta rapidamente nos processos inflamatórios, pesquisadores sugerem a utilização da Hp como marcador da inflamação (SMITH, CHAVEYS e ANDREWS, 1998).

Pesquisas realizadas em cadelas com adenocarcinoma mamário não apontaram a Hp como marcador da inflamação para este tipo de neoplasia. Planellas et al. (2009) não observaram diferença nas concentrações séricas de Hp em cadelas com adenocarcinoma mamário quando comparadas às cadelas saudáveis e concluíram que a Hp não expressa potencial diagnóstico e prognóstico no câncer mamário em cadelas.

Por sua vez, o linfoma e a leucemia são neoplasias hematológicas capazes de provocar aumento nas concentrações séricas de Hp. Valores elevados de Hp foram encontrados em cães com linfoma e com leucemia quando comparados a cães saudáveis (TECLES et al., 2005). Elevação na concentração sérica de Hp associada à elevação de ceruloplasmina e redução de albumina podem estar associadas à ocorrência de linfoma em cães. A avaliação destas três proteínas em conjunto pode ser usada como ferramenta diagnóstica em cães com suspeita de linfoma, os quais apresentam concentração sérica de ceruloplasmina doze vezes maior em cães doentes que cães saudáveis, e de Hp cinco vezes mais alta nos cães doentes. Já a albumina apresentou diminuição de 1,4 vezes na sua concentração sérica (CALAZANS et al., 2009). Estes estudos demonstram que estas PFA expressam potencial prognóstico e diagnóstico para linfoma e leucemia em cães.

#### d) Alfa-1-glicoprotína Ácida (AGP)

A AGP é uma glicoproteína que responde positivamente ao estímulo inflamatório. Em cães, apresenta peso molecular de aproximadamente 42 kDa, sendo composta principalmente por carboidratos (em torno de 40,9%). É sintetizada e metabolizada no fígado e está envolvida no processo de defesa do organismo e na supressão do sistema imune através da modulação da Il-1, Il-6 e do FNT- $\alpha$  (YUKI, ITOH e TAKASE, 2009).

Trata-se de uma das principais glicoproteínas séricas cuja função ainda não é bem conhecida, porém, sabe-se que apresenta capacidade de se ligar a metabólitos endógenos como a heparina, histamina, serotonina, esteróides e catecolaminas. Pode ainda ligar-se a fármacos, o que lhe confere importância terapêutica uma vez que diferenças na concentração sérica da AGP podem resultar em diferenças nas concentrações plasmáticas de drogas (IKENOUE et al., 2000). A AGP também exerce papel importante na defesa inata do organismo, atuando contra infecções, inibindo a fagocitose e a ativação de neutrófilos. É capaz de inibir a agregação plaquetária e diminuir a blastogênese de linfócitos. Como se trata de uma PFA moderada, ou seja, sua concentração plasmática se eleva lentamente durante o processo inflamatório. Os níveis séricos desta proteína são influenciados pela presença de glicocorticóides, de modo a apresentar concentração bastante elevada após o tratamento com estas drogas e ainda, nos casos de hiperadrenocorticismos (HARVEY e WEST, 1987).

A avaliação dos valores séricos da AGP em cães de diferentes idades, raças, sexo e distúrbios orgânicos permitiram concluir que a AGP apresenta valores menores em filhotes, os quais vão aumentando até a idade adulta. Em função desta variação nos valores das concentrações séricas dos filhotes, a idade dos cães deve ser considerada ao utilizar a AGP como marcador biológico (YUKI, ITOH & TAKASE, 2009). Além disso, pôde-se verificar que a AGP é uma boa ferramenta de avaliação da inflamação, auxiliando na diferenciação dos estágios agudo e crônico em diversos distúrbios orgânicos, como por exemplo, em cães com gastrinterite hemorrágica em fase leucopênica (KOGIKA et al., 2003), e em cadelas com piometra, onde as concentrações de AGP apresentaram-se significativamente elevadas em comparação às pacientes saudáveis. Nas cadelas com piometra submetidas ao tratamento cirúrgico observou-se diminuição da concentração da AGP à medida que diminuiu o processo infeccioso



causado pela doença. A concentração basal foi observada no décimo dia após a realização da cirurgia (YUKI, ITOH e TAKASE, 2009).

e) Alfa-1-antitripsina

A alfa-1-antitripsina apresenta peso molecular igual a 37 kDa em cães (VIEIRA et al., 2010), e tem como função limitar a atividade das enzimas liberadas pelas células fagocíticas, participando na proteção tecidual do organismo (MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2001). Apresenta ainda a capacidade de inibir a atividade das células *natural killer*. (MURATA, SHIMADA e YOSHIOKA, 2004). Apesar da alfa-1-antitripsina ser uma PFA positiva, em cães acometidos por linfoma, observou-se diminuição da concentração sérica de alfa-1-antitripsina em cães doentes, ou seja, em cães com linfoma a alfa-1-antitripsina comporta-se como PFA negativa (VIEIRA et al., 2010). O motivo da redução da concentração da alfa-1-antitripsina nestes casos não está bem esclarecido. Em outro estudo realizado em cães com linfoma não foi observada a presença da alfa-1-antitripsina dentre as PFA significativamente relevantes para estes pacientes (CALAZANS et al., 2009).

f) Ceruloplasmina (Cp)

A Cp é uma glicoproteína de fase aguda positiva moderada que tem como funções o transporte do cobre para a eritropoiese e a ação antioxidante nos tecidos, protegendo-os de compostos gerados pela fagocitose de microorganismos (GRUYS, OBWOLO e TOUSSAINT, 1994). É a principal responsável pelo transporte de cobre sérico e cada molécula transporta de 6 a 8 átomos de cobre, dependendo da espécie em questão (JAIN, 1993).

A Cp é uma alpha-2-globulina (PAULA E SILVA, LOPES e FARIA, 2008), caracterizada como PFA positiva moderada, cuja concentração sérica aumenta seis vezes mais rapidamente que o fibrinogênio, leucócitos totais, neutrófilos segmentados e bastonetes (SOLTER et al., 1991). Tem sido reportada como PFA positiva moderada nos processos inflamatórios de ruminantes, suínos e equinos (MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2001).

As elevações séricas da Cp em cães são maiores e mais rápidas que em pessoas, atingindo o dobro dos valores basais após cirurgias (CONNER et al., 1988), e na ocorrência de processos infecciosos como traumas e piometras (SOLTER et al., 1991; MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2001).

No trabalho realizado por Calazans et al. (2009), foi observado elevação na concentração sérica de Cp em cães com linfoma. Para os autores, a elevação sérica da Cp sugere reação inflamatória causada pela neoplasia e pela presença do linfoma. Lucas et al. (2010) avaliaram a concentração sérica de Cp em cães com linfoma multicêntrico e os valores em cães saudáveis foram semelhantes aos valores em cães com linfoma multicêntrico no momento do diagnóstico. Porém, quando avaliada durante o tratamento quimioterápico, Lucas et al (2010), observaram redução da Cp na quarta semana de tratamento, o qual utilizou os protocolos CVP (ciclofosfamida, vincristina e prednisona) ou VCMA (vincristina, ciclofosfamida, metrotexato e l-asparaginase). Os cães foram acompanhados até o momento da recidiva tumoral e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no momento da recidiva em comparação ao momento do diagnóstico. Os resultados concluíram que a Cp não é uma PFA adequada para o monitoramento de cães com linfoma multicêntrico (LUCAS et al., 2010).

#### g) Transferrina

A transferrina é uma glicoproteína betaglobulina, considerada como proteína de fase aguda negativa, responsável pelo transporte sanguíneo de ferro com atuação na sua absorção intestinal e distribuição orgânica (CÉRON, et al., 2005). A capacidade da transferrina se ligar ao ferro pode ser avaliada por meio da mensuração de sua concentração sérica. Esta proteína é composta pela ligação de dois átomos de  $Fe^{+3}$  e libera para o organismo apenas um dos átomos de  $Fe^{+3}$  que então se reduz a  $Fe^{+2}$ . O ferro é estocado sob a forma de ferritina (absorvível) ou hemossiderrina (não absorvível). Desta forma, a transferrina assume importante função bactericida ao indisponibilizar o  $Fe^{+3}$  para as bactérias durante o processo inflamatório (PEREIRA et al., 2010).

Por se tratar de uma PFA negativa, seus valores diminuem, dependendo da magnitude do processo infeccioso. Possui meia-vida de oito a dez dias e responde

rapidamente a mudanças no estado nutricional dos pacientes. Na medicina, a concentração sérica da transferrina é alterada na ocorrência de distúrbios hepáticos, inflamação, insuficiência cardíaca e mudanças no metabolismo do ferro (FUHRMAN, CHARNEY e MUELLER, 2004).

Um estudo realizado em 2010 avaliando a concentração sérica de cães com anemia hemolítica imunomediada demonstrou que os níveis de transferrina se encontravam significativamente baixos nos pacientes doentes quando comparados aos pacientes saudáveis (PEREIRA, et al., 2010). Em cães com linfoma, a concentração sérica da Cp chega a ser 12,9 vezes mais alta que em cães saudáveis. Os resultados da pesquisa sugerem a utilização da Cp como ferramenta de auxílio diagnóstico de linfoma em cães (CALAZANS et al., 2009). Não foram encontradas mais pesquisas avaliando as concentrações da Cp em animais neoplásicos e os dados de Calazans et al (2009) sugerem que novas pesquisas podem trazer resultados importantes para a oncologia veterinária.

#### h) Albumina

É a proteína mais abundante no soro sanguíneo (MURATA, SHIMADA e YOSHIOKA, 2004) chegando a 60% da concentração total de proteínas em humanos (PAULA e SILVA, LOPES e FARIA, 2008) e de 35 a 50% das proteínas plasmáticas em cães e gatos (CÉRON et al., 2005; PEREIRA et al., 2010). A albumina é sintetizada pelo fígado e sua metabolização ocorre na maior parte dos tecidos. Sua principal função é a manutenção da pressão osmótica (responde por até 80% da pressão osmótica do sangue), atuando significativamente no transporte sanguíneo de diversas substâncias como ácidos graxos livres, ácidos biliares, bilirrubina, cálcio, hormônios e medicamentos (CÉRON et al., 2005; THRALL, 2006).

Por ser uma molécula muito pequena, sempre que há dano renal ocorre perda da albumina através da urina. Doenças hepáticas degenerativas como cirrose e viroses podem prejudicar a síntese da albumina resultando em hipoalbuminemia. O mesmo acontece quando ocorrem infecções bacterianas graves, neoplasias malignas, doença cardíaca congestiva, distúrbios inflamatórios crônicos e dieta hipoproteica (PAULA e SILVA, LOPES e FARIA, 2008). Isso ocorre devido ao catabolismo da albumina que está aumentado como consequência da deficiência energética do indivíduo, o que

estimula a utilização de reservas de aminoácidos para atuarem na gliconeogênese, a fim de recuperar a homeostase do organismo (THRALL, 2006). A redução na concentração sérica da albumina tem relação direta com o aumento na concentração sérica de outras PFA, de acordo com o processo inflamatório em questão, ou seja, para que uma proteína aumente, é necessário que outra diminua, e dentre as PFA a albumina exerce este papel de contrabalanço proteico.

É classificada como PFA negativa uma vez que sua concentração sérica diminui durante RFA (PETERSEN, NIELSEN e REEGAARD, 2004). Níveis baixos de albumina foram observados no soro de cães acometidos por linfoma, indicando pior prognóstico quando associado a aumentos séricos nas concentrações de ceruloplasmina e haptoglobina (CALAZANS et al., 2009). Este resultado não foi observado por Vieira et al. (2010), ao analisar o proteinograma sérico de cães com linfoma, onde observou-se que a concentração sérica da albumina apresentou valores semelhantes em cães doentes e em cães saudáveis.

Em cadelas com neoplasia mamária foi observada redução na concentração sérica de albumina nas pacientes com estágios mais avançados da doença (estágios IV e V), quando comparadas às pacientes em estágios iniciais (estágios I e II) e com pacientes saudáveis. Os resultados sugerem que reduções significativas na concentração sérica de albumina indica pior prognóstico em cadelas com neoplasia mamária (TECLES et al., 2009).

### **3. CONCLUSÃO**

As proteínas de fase aguda são importante fonte de informações a respeito do estado de saúde dos pacientes. Principalmente em cães, a PCR, o SAA e a haptoglobina exercem papel de marcadores inflamatórios em resposta a processos neoplásicos, contudo, diferenças encontradas entre os resultados de diferentes grupos de pesquisa demonstram a necessidade da continuidade das pesquisas a fim de confirmar ou refutar sua utilização como ferramenta de auxílio diagnóstico e prognóstico à Oncologia Veterinária.

#### 4. REFERÊNCIAS

CALAZANS, S.G; DALECK, C.R; FAGLIARI, J.J; REPETTI, C.F; DE NARDI, A.B; CASTRO, J.H.T; FERNANDES, S.C; CÉSAR, J.R.F; RODIGHIERI, S.M. Proteinograma sérico de cães sadios e com linfoma obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.5, p.1044-1048, 2009.

CARVALHO, C.D.D; RÊGO, E.W; QUEQUE, M; SOARES, P.C. Avaliação da proteína C reativa, fibrinogênio e leucograma em cadelas com e sem piometra. **Medicina Veterinária**, v.2, n.2, p.1-8, 2008.

CERÓN, J.J; ECKERSALL, P.D; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, n.2, p.85-99, 2005.

CONNER, J.G; ECKERSALL, P.D; FERGUSON, J; DOUGLAS T. A.The acute phase response in the dog following surgical trauma. **Research of Veterinary Science**, v.45, p.107-110, 1988.

CROSSLEY R; COLOMA, A; RÍOS, C; GONZÁLEZ, C. Determinación de proteína C-reactiva en embrias caninas con tumores mamarios benignos y malignos. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.42, p.101-105, 2010.

DUHARTE, A.B. Función del sistema inmune em la defensa contra tumores malignos. **Medisan**, v.7, n.2, p.75-88, 2003.

FUHRMAN, M. P.; CHARNEY, P.; MUELLER, C. M. Hepatic proteins and nutrition assessment. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 104, n. 8, p.1258-1264, 2004.

GALEZOWSKI, A.M; SNEAD, E.C.R; KIDNEY, B.A; JACKON, M.L. C-reactive protein as a prognostic indicator in dogs with acute abdomen syndrome. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.22, p.395-401, 2010.

GRIEBSCHE, C; ARNDT G; RAILA, J; SCHWEIGERT, F.J; KOHN, B. C-reactive protein concentration in dogs with primary immunemediated hemolitic anemia. **Veterinary Clinical Pathology**, v.38, n.4, p.421-425, 2009.

GRUYS, E.; OBWOLO, M. J.; TOUSSAINT, M. J. M. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. **Veterinary Bulletin**, v. 64, p. 1009-1018, 1994.

HARVEY, J. W.; WEST, C. L. Prednisone-induced increases in serum alpha-2-globulin and haptoglobin concentration in dogs. **Veterinary Pathology**, v. 24, n. 1, p. 90-92, 1987.

IKENOUE, N;SAITSU, Y;SHIMODA, M; KOKUE, E. Disease-induced alterations in plasma drug-binding proteins and their influence on drug binding percentages in dogs. **Veterinary Quarterly**, v.22, n.1, p.43-49, 2000.

JAIN, N. C. The plasma proteins, dysproteinemias, and immune deficiency disorders. In: **Essentials of Veterinary Hematology**, p.347-379 Lea & Febiger, Philadelphia. 1993.

KOGIKA, M.M; PEREIRA, D.A; ELIAS, F; NOTOMI, N.K; DELAYTE, E.H; KAWAHARA, R; HAGIWARA, M.K. Determinação sérica de haptoglobina,

ceruloplasmina e  $\alpha$ -1-glicoproteína ácida em cães com gastrenterite hemorrágica. **Ciência Rural**, v.33, n.3, p.513-517, 2003.

LUCAS, S.R.R; MERLO, A; MIRANDOLA, R.M.S; GASPARIN, T.P. Ceruloplasmin concentration in dogs with multicentric lymphoma undergoing chemotherapy. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.47, n.6, p.477-482, 2010.

MADEWELL, B. Tumor Markers **In** KANEKO, J; HARVEY J; BRUSS M. **Clinical Biochemistry of domestic animals**. 5<sup>th</sup> ed. Academic Press, California, EUA, p.761-784, 1997.

MARTÍNEZ-SUBIELA, S; TECLES, F; PARRA, N.D; CERÓN, J.J. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinaria. **Anales Veterinaria**, v.17, p.97-114, 2001.

MARTÍNEZ-SUBIELA, S; PARRA, N.D; CERÓN, J.J. Principales aplicaciones de las proteínas de fase aguda en la clínica canina. **Anales Veterinaria**, v.20, p.75-86, 2004.

MURATA, H; SHIMADA, N; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, n.168, p. 28-40, 2004.

PAULA E SILVA, R.O; LOPES, A.F; FARIA, R.M.D. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. *Seric proteins electrophoresis: clinical interpretation and correlation*. **Revista Médica de Minas Gerais**, n.18, v.2, p.116-122, 2008.

PEREIRA, P.M; ABREU, D.K; PINCELLI, V.A; BOCHIO, M.M; SANTANA, A.E. Quadro seroproteico como auxílio diagnóstico na anemia hemolítica imunomediada em cães. **Ciência Rural**, v.40, n.4, p. 880-887, 2010.

PETERSEN, H.H; NIELSEN, J.P; HEEGAARD, P.M.H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v.35, p.163-187, 2004.

PLANELLAS, M; BASSOLS, A; SIRACUSA, C; SACO, Y; GIMÉNEZ, M; PATO, R. Evaluation of serum haptoglobin and C-reactive protein in dogs with mammary tumors. **Veterinary Clinical Pathology**, v.38, n.3, p.348-352, 2009.

SMITH, J.E; CHAVEY, P.S; ANDREWS, G.A. Semiautomatic and Robotic Methods for Determining Serum Haptoglobin Levels. **Veterinary Clinical Pathology** v.27, n.1, 1998.

STARK, J.R; LI, H; KRAFT, P; KURTH, T; GIOVANNUCCI, E.L; STAMPFER, M.J; MA, J; MUCCI, L.A. Circulating prediagnostic interleukin-6 and C-reactive protein and prostate cancer incidence and mortality. **International Journal of Cancer.**, n.124, p.2683-2689, 2009.

SOLTER, P.F; HOFFMANN, W.E; HUNGERFORD, L.L; SIEGEL, J.P; DENIS, S.H.St; DORNER, J.L. Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.52, n.10, p.1738-1742, 1991.

TECLES, F; SPIRANELLI, E; BONFANTI, U; CERÓN, J.J; PALTRINIERI, S. Preliminary studies of serum acute-phase protein concentrations in hematologic and neoplastic diseases of the dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, n.19, p.865-870, 2005.



TECLES, F; CALDÍN, M; ZANELLA, A; MEMBIELA, F; TVARIJONAVICIUTE A; MARTÍNEZ SUBIELA, S; CERÓN, J.J. Serum acute phase protein in female dogs with mammary tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, n. 21, p.214-219. 2009.

THEILGAARD-MÖNCH, K; JACOBSEB, L.C; NIELSEN, M.J; RASMUSSEN, T; UDBY, L; GHARIB, M; ARKWRIGHT, P.D; GOMBART, A.F; CALAFAT, J; MOESTRUP, S.K; PORSE, B.O; BORREGAARD, N. Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and realized by neutrophils in response to activation. **Blood**, v.108, p.353-361, 2006.

THRALL, M.A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. Editora Roca: São Paulo. 1ª Edição, p.376-381, 2006.

VIEIRA, C.M; COLETA, F.E.D; GODOY, A.V; SOBREIRA, M.F.R; GALVÃO, A.L.B; BORIN, S; CRIVELENTI, L.Z; ANAI, L.A; NOGUEIRA, A.F.S; SANTANA, A.E. Acute phase protein in canine lymphoma during antineoplastic chemotherapy. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, n.3, v.2, p.86-92, 2010.

YUKI, M; ITOH, H; TAKASE, K. Serum  $\alpha$ -acid glycoprotein concentration in clinically healthy puppies and adult dogs and in dogs with various diseases. **Veterinary Clinical Pathology**, v.39, n.1, p.65-71, 2009.

YULE, T.D; DREIER, K; JONHSON, A.F; PALMERDENSMORE, M. SIMMONS K; FANTON, R. Canine parvovirus vaccine elicits protection from the inflammatory and clinical consequences of the disease. **Vaccine**, v.15, p.720-729, 1997.

## CAPÍTULO II

### PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA

### ACUTE PHASE PROTEINS IN FEMALE DOGS WITH MAMMARY TUMORS

#### RESUMO

As proteínas de fase aguda (PFA) sofrem alterações na concentração sérica mediante processos infecciosos, inflamatórios e neoplásicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar alterações nas concentrações séricas das PFA em cadelas com neoplasia mamária, comparando com a avaliação histológica e leucograma. Foram realizados os testes ultrasensível para proteína C reativa (PCR) e a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para identificar outras PFA (albumina, ceruloplasmina, transferrina, haptoglobina Hp,  $\alpha$ -1 antitripsina,  $\alpha$ -1 glicoproteína ácida). As PFA foram avaliadas em 45 cadelas com tumor de mama, divididas nos grupos benigno (n=13), maligno não ulcerado (n=24) e maligno ulcerado (n=8). O grupo controle foi composto por 20 cadelas saudáveis. As pacientes com neoplasia mamária maligna ulcerada apresentaram elevações séricas na PCR, Hp e redução da albumina ( $P < 0,05$ , one-way ANOVA e Teste de Dunn). Nestas pacientes foi observada correlação positiva entre o leucograma inflamatório e aumento das PFA ( $P = 0,02$ , Teste de Fisher). As pacientes com neoplasia mamária benigna e maligna não ulcerada apresentaram

elevação sérica apenas da PCR, sem alterações no leucograma. Conclui-se que avaliações conjuntas da PCR, Hp, albumina podem ser utilizados como ferramenta de auxílio diagnóstico e prognóstico em cadelas com neoplasia mamária.

**PALAVRAS-CHAVE:** proteínas de fase aguda, eletroforese, câncer

### **ABSTRACT**

Acute phase proteins (APPs) are serum proteins whose concentrations change after infectious and inflammatory disease, and cancer. The aims of this study were to evaluate changes in APPs concentration and to correlate these findings with histological classification and WBC in female dogs with mammary tumors. Ultrasensitive assay to evaluate serum C-reactive protein (CRP) and SDS-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) electrophoresis were used to measure APPs concentrations (albumin, ceruloplasmina, transferrin, haptoglobina Hp,  $\alpha$ -1-acid glycoprotein and  $\alpha$ -1-antitrypsin). APPs were studied in 45 female dogs with mammary tumor divided in the following groups: benign (n=13), malignant without ulceration (n=24), and malignant with tumoral ulceration (n=8). Patients with malignant mammary neoplasia plus ulceration had significant increase of CRP, Hp, and decreased levels of albumin ( $P < 0,05$ , one-Way ANOVA and Dunn Test). Positive correlation between APPs and inflammatory leukocytosis was observed ( $P = 0,02$ , Fisher test). Patients with benign and malignant tumor without mammary ulceration only had CRP serum concentration elevation and normal WBC. In conclusion, combined changes of CRP, Hp and albumin may be used as a prediagnostic tool and prognostic in dogs with mammary tumors.

**KEY-WORDS:** acute phase proteins, electrophoresis, cancer

## 1. INTRODUÇÃO

Os tumores mamários são as neoplasias mais frequentes em cadelas com idade superior a cinco anos que não foram submetidas à castração antes do primeiro cio. Aproximadamente 50 a 70% das neoplasias mamárias apresentam classificação histológica maligna, contudo a evolução clínica, a capacidade de fazer metástase regional e distante, podem variar drasticamente entre os indivíduos (FONSECA e DALECK, 2000; DE NARDI et al., 2002; ZUCCARI et al., 2006; MOTTA, 2008). Os marcadores tumorais vêm sendo utilizados para auxiliar no diagnóstico precoce e no prognóstico de diferentes neoplasias. Muitos destes marcadores são substâncias detectadas e quantificadas no sangue, fluidos e/ou tecidos corporais, dentre os quais, as proteínas de fase aguda (PFA) vêm se destacando.

As PFA são classificadas em positivas e negativas. As PFA positivas são aquelas cuja concentração sérica aumenta diante de processos infecciosos, inflamatórios ou neoplásicos. Por sua vez, as PFA negativas são aquelas cuja concentração sérica reduz em resposta a algum destes processos. As PFA positivas podem ser subdivididas em PFA positivas maiores (quando a concentração sérica sofre elevação rápida, retornando aos valores basais também de forma rápida), e PFA positivas moderadas (quando a concentração sérica aumenta lentamente e permanece elevada por mais tempo). No cão, as principais PFA positivas maiores são a proteína C reativa (PCR) e o amiloide sérico A (ASA), a principal PFA positiva moderada é a Haptoglobina (Hp), e as principais PFA negativas são a albumina e a transferrina (CERÓN, ECKERSALL e MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005).

As PFA fazem parte da resposta inflamatória inicial e são mediadas por citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (FNT $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6). As PFA apresentam diversas funções que incluem o auxílio da homeostase corporal através do controle da infecção e inflamação que se estabelece logo após o dano celular, inibição da quimiotaxia e modulação dos neutrófilos, indução de citocinas e formação de anticorpos (THEILGAARD-MÖNCH, et al., 2006; CÉRON, et al., 2005; MURATA et al., 2004).

As PFA também sofrem alterações frente a processos neoplásicos (MYLONAKIS et al., 2011; CALAZANS et al., 2009; CÉRON, et al., 2005; YAMAMOTO et al., 1993). Estudos recentes demonstraram variações nas PFA em cães

com tumores mamários, pancreáticos, carcinoma de células escamosas e linfoma (MUKORERA et al., 2011; GALEZOWSKI et al., 2010), e em humanos com câncer de próstata e mama (STARK et al., 2009). Nas neoplasias mamárias as variações nos valores séricos das PFA podem ocorrer em função da inflamação tecidual crônica, ao tamanho do tumor primário e presença de metástases (TECLES et al., 2009; CROSSLEY et al., 2010). Apesar de diversos estudos avaliando as PFA em cadelas com neoplasia mamária, poucos avaliaram o perfil analítico das PFA em conjunto com a classificação histopatológica e leucograma destas pacientes. O presente trabalho teve por objetivos avaliar alterações nas concentrações séricas das principais PFA positivas (PCR, Hp, ceruloplasmina, alfa-1-antitripsina, alfa-1-glicoproteína ácida) e negativas (albumina, transferrina) comparando ao leucograma e a malignidade tumoral conforme resultado histopatológico em cadelas com neoplasia mamária.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Foram selecionadas 45 cadelas de idades e raças variadas diagnosticadas com neoplasia mamária, atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná - Curitiba (HV-UFPR). Foram excluídas do estudo cadelas que apresentaram doenças concomitante à neoplasia ou submetidas a tratamento medicamentoso em prazo inferior a 30 dias da data da consulta ou vacinadas em prazo inferior a quatro meses da data da consulta.

Para obtenção das amostras de sangue foi realizada venopunção da jugular externa. O sangue foi armazenado em tubos de ensaio com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para realização de hemograma e sem anticoagulante para realização de proteinograma sérico. Após centrifugação a 2500 rotações por minuto durante 5 minutos, o soro obtido foi armazenado em freezer comum a -20°C até a realização do proteinograma.

A determinação da concentração da proteína sérica total (PST) foi realizada pelo método de Biureto (kit Labtest®, Belo Horizonte) com leitura em espectrofotômetro semi-automatizado (Labquest®, São Paulo). A determinação das concentrações das frações protéicas foi realizada por eletroforese em matriz gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) pela técnica descrita por LAEMMLI (1970), utilizando o sistema vertical para eletroforese. Ambas as análises laboratoriais, de PST e de eletroforese em SDS-PAGE foram feitas no Laboratório de

Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo.

A determinação da concentração sérica da PCR foi realizada no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do HV-UFPR, utilizando teste turbidimétrico ultrasensível com Kit comercial (Biotécnica® Varginha, Minas Gerais).

As pacientes com neoplasia mamária foram submetidas à mastectomia e o tecido mamário encaminhado ao Laboratório de Patologia Veterinária do HV-UFPR para análise histopatológica segundo critérios da Organização Mundial (MEUTEN, 2002). Após a avaliação histopatológica, as pacientes foram divididas em três grupos: neoplasia mamária benigna, neoplasia mamária maligna não ulcerada e neoplasia mamária maligna ulcerada.

Para o grupo controle, foram selecionadas 20 cadelas clinicamente saudáveis com idade média de cinco anos (3-8 anos), encaminhadas ao HV-UFPR para ovariectomia eletiva ou vacinação. As pacientes passaram por avaliação clínica, hematológica e exame de ultrassonografia abdominal com o objetivo de descartar doenças.

A análise estatística foi realizada utilizando o software *GraphPad Prism*® versão 5.0 para Windows®. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi empregado para verificar a normalidade dos resultados. As concentrações séricas das proteínas resultaram em dados não paramétricos, por consequência foi executado a análise de variância de Kruskal-Wallis e o teste Dunn para fazer a comparação dos grupos. A idade das pacientes resultou em dados paramétricos, sendo empregado o teste de análise de variância one-way ANOVA, seguida do teste de Tukey para comparação entre os grupos. A estatística descritiva foi utilizada para a avaliação dos parâmetros hematológicos já categorizados, ou seja, após classificação do hemograma. O teste exato de Fisher foi aplicado para verificar a correlação entre as PFA e a presença de inflamação (avaliado pelo leucograma). Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos com confiança de 95%.

### **3. RESULTADOS**

As pacientes com neoplasia apresentaram média de idade semelhante entre os grupos ( $P > 0,05$ ). A média de idade para o grupo de pacientes com neoplasia benigna foi de 8,8 anos (mínima 3 e máxima 16 anos), para as pacientes com neoplasia maligna não

ulcerada 9,8 anos (mínima 5 e máxima 15 anos) e as com neoplasia maligna ulcerada 9,1 anos (mínima 5 e máxima 14 anos).

De acordo com o resultado da avaliação histopatológica, 71,1% (32/45) das cadelas apresentaram tumores mamários malignos e 28,9% (13/45) benignos. Nenhuma paciente com neoplasia mamária benigna apresentou ulceração tumoral e, no do grupo de neoplasias mamárias malignas, oito estavam ulceradas e 24 não apresentaram ulceração tumoral.

No grupo com neoplasia benigna 53,8% (7/13) foram classificadas como adenoma simples, 23,1% (3/13) adenoma complexo e 23,1% (3/13) tumor misto benigno. No grupo com neoplasia maligna 59,4% (19/32) foram classificadas como carcinoma simples, 15,6% (5/32) carcinoma papilífero cístico, 12,5% (4/32) carcinoma papilífero simples a complexo, 6,3% (2/32) carcinoma complexo, 3,1% (1/32) carcinoma sólido e 3,1% (1/32) tumor misto maligno.

A análise das proteínas séricas realizadas pela técnica de eletroforese em SDS-PAGE, evidenciou 25 proteínas, sendo identificadas nove frações proteicas: imunoglobulina A (IgA), ceruloplasmina, transferrina, albumina, alfa-1-antitripsina, haptoglobina (Hp), alfa-1-glicoproteína ácida, imunoglobulina G (IgG: resultado da soma de duas frações, Ig de cadeia pesada e Ig de cadeia leve). Detectaram-se também três proteínas ainda não conhecidas, identificadas neste trabalho pelo peso molecular como proteína 34 kDa (34.000 Da), proteína 31 kDa (31.000 Da) e proteína kDa 23 (23.000 Da). A Figura 1 mostra o gráfico resultante da leitura da eletroforese em espectrofotômetro. O resultado do proteinograma sérico dos grupos controle, neoplasia benigna, neoplasia maligna não ulcerada e neoplasia maligna ulcerada encontram-se na Tabela 1.

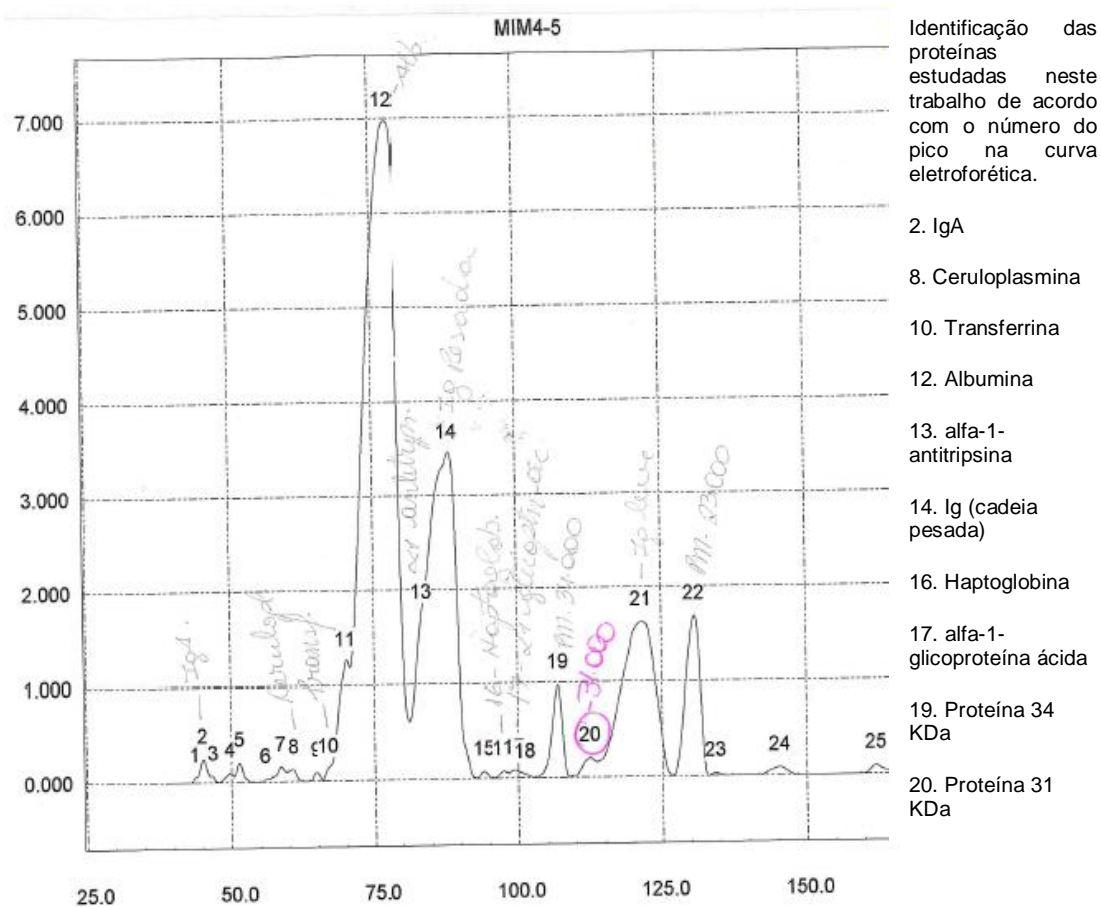


FIGURA 1. Curva eletroforética obtida a partir do escaneamento da amostra de soro de uma cadela do grupo controle. Pode-se notar o pico de das proteínas marcadas pelos números. As proteínas estudadas neste trabalho seguem identificadas na legenda, de acordo com seu respectivo número no gráfico.



TABELA 1. VALORES SÉRICOS DA PROTEÍNA TOTAL, PROTEÍNA C REATIVA E DAS PROTEÍNAS DE FASE AGUDA (PFA) OBTIDAS PELO PROTEINOGRAMA, EM CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA E CONTROLE.

<b>PROTEÍNAS (Peso molecular)</b>	<b>Grupo Controle (n=20)</b>	<b>Grupo Neoplasia Benigna (n=13)</b>	<b>Grupo Neoplasia Maligna Não Ulcerada (n=24)</b>	<b>Grupo Neoplasia Maligna Ulcerada (n=8)</b>
<b>Proteína Total (g/dL)</b>	6,8 ± 0,4	6,4 ± 1,1	7,1 ± 1,6	6,3 ± 0,9
<b>PCR</b>	0,35 ± 0,4 <sup>a</sup>	0,49 ± 0,4 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,7 <sup>b</sup>	2,32 ± 1,6 <sup>b</sup>
<b>Ceruloplasmina (125 kDa)</b>	29 ± 8,1	27,9 ± 11,9	26,7 ± 10,7	39,1 ± 10,3
<b>Transferrina (85 kDa)</b>	77,2 ± 48,4	74,6 ± 89,4	54,7 ± 36,9	80,5 ± 24,1
<b>Albumina (65 kDa)</b>	3713 ± 689,3 <sup>a</sup>	3640 ± 740,3 <sup>a</sup>	3555 ± 1230 <sup>a</sup>	2959 ± 305,1 <sup>b</sup>
<b>Alfa-1- antitripsina (60 kDa)</b>	350 ± 56	297,4 ± 75,2	348 ± 25,5	307,6 ± 95,9
<b>Haptoglobina (39 kDa)</b>	12,5 ± 4,6 <sup>a</sup>	21,9 ± 6,6 <sup>b</sup>	22,8 ± 10,7 <sup>b</sup>	34,6 ± 21,3 <sup>b</sup>
<b>Alfa-1- glicoproteína ácida (37 kDa)</b>	11,2 ± 6,1	19,6 ± 8,1	22,9 ± 24,9	22,9 ± 18

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão. Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si, one-way ANOVA post hoc Tukey para a PCR e teste não paramétrico Kruskal-Wallis somado ao múltiplo de comparação de Dunn (P<0.05) para demais proteínas. \*Valor zero atribuído à proteína não mensurada em uma amostra.

A única alteração proteica observada nas pacientes com neoplasia benigna (n=13) foi a elevação da Hp (21,94 ± 6,65mg/L; P=0,0016, Teste de Dunn), quando comparado ao controle (12,52 ± 4,64mg/L). A média da PCR para o grupo neoplasia benigna (0,49 ± 0,45mg/dL; P = 0,09, One-Way ANOVA, post hoc Tukey) foi semelhante ao grupo controle (0,35 ± 0,41mg/L). A análise do hemograma revelou eritrograma normal em todas as pacientes e alterações no leucograma em cinco (38,5%, n=13), sendo três com inflamação aguda e duas com inflamação crônica.

O valor médio da Hp também se encontrou aumentado nas pacientes com neoplasia de mama maligna não ulcerada (22,81±10,79mg/L; P=0,0003, Teste de Dunn) e ulcerada (34,71 ± 21,34mg/L; P=0,0002, Teste de Dunn), quando comparados ao

grupo controle ( $12,52 \pm 4,64\text{mg/L}$ ). A PCR teve a concentração sérica elevada nos grupos neoplasia mamária não ulcerada ( $0,53 \pm 0,71\text{mg/L}$ ;  $P=0,0097$ , One-Way ANOVA, post hoc Tukey) e neoplasia mamária ulcerada ( $2,32 \pm 1,63\text{ mg/L}$ ;  $P=0,0012$ , One-Way ANOVA, post hoc Tukey) quando comparados ao grupo controle ( $0,35 \pm 0,41\text{mg/L}$ ). A albumina teve a média diminuída apenas para o grupo neoplasia maligna ulcerada ( $2959 \pm 305,1\text{mg/dL}$ ;  $P=0,007$ , Teste de Dunn) quando comparada ao grupo controle ( $3713 \pm 689,3\text{mg/dL}$ ).

A avaliação da série vermelha das pacientes com neoplasia mamária maligna não ulcerada ( $n=24$ ) revelou anemia em 12,5% dos casos (3/24), sendo não regenerativa em dois animais e regenerativa em um. 50% das pacientes do grupo neoplasia mamária maligna ulcerada apresentaram anemia (4/8), sendo regenerativa em dois casos e não regenerativa em dois casos. O leucograma das pacientes com neoplasia mamária maligna não ulcerada ( $n=24$ ) revelou inflamação em 50% dos casos (12/24), sendo classificada como crônica em oito e aguda em quatro pacientes. A prevalência de inflamação foi alta (87,5%, 7/8) nas pacientes com neoplasia mamária ulcerada, sendo que apenas uma não apresentou inflamação. Neste grupo cinco animais foram diagnosticados com inflamação crônica e dois com inflamação aguda.

O grupo neoplasia mamária maligna ulcerada apresentou correlação positiva entre as alterações nas PFA e a presença de leucograma inflamatório ( $P=0,002$ , Teste de Fisher). Correlação negativa foi observada entre os grupos neoplasia benigna e maligna não ulcerada com a presença do leucograma inflamatório ( $P>0,05$ , Teste de Fisher).

As proteínas 31 ( $53,2\pm 33,8\text{mg/dL}$ ,  $P=0,0056$  Teste de Dunn) e 34 kDa ( $345,3\pm 73,7\text{mg/dL}$ ,  $P=0,0004$  Teste de Dunn) apresentaram média elevada para o grupo neoplasia maligna ulcerada quando comparada ao controle ( $32,6\pm 14,2\text{mg/dL}$  e  $183,3\pm 70\text{mg/dL}$ , respectivamente).

#### **4. DISCUSSÃO**

O presente trabalho investigou as alterações nas concentrações séricas das proteínas de fase aguda, sendo estas comparadas ao leucograma das pacientes e com a malignidade da neoplasia mamária através da classificação histológica. O estudo revelou que a PCR e a Hp estão positivamente associadas a neoplasia mamária maligna, podendo ou não apresentar leucograma inflamatório.

A avaliação em conjunto de uma PFA positiva maior como a PCR, com uma moderada (Hp) apresenta vantagens quanto a avaliação individual destas proteínas

(TECLES, 2009). Deste modo, este estudo observou aumento na PCR e na Hp em todas as pacientes com neoplasia mamária maligna, ulcerada ou não. As pacientes com neoplasia mamária benigna apresentaram aumento apenas da Hp e não da PCR. Este achado levanta a hipótese de que a neoplasia mamária maligna é uma doença que promove inflamação crônica, maior lesão tecidual e necrose tumoral quando comparada a neoplasia mamária benigna (Tecles et al 2009, Planellas et al 2009).

A neoplasia ulcerada é característica de um estadio mais avançado da neoplasia mamária e nestas pacientes a inflamação tecidual da massa tumoral é evidente. No presente estudo o leucograma inflamatório juntamente com o aumento expressivo da PCR e da Hp, e redução na albumina foram observados nas pacientes com neoplasia ulcerada. Este resultado indica que o aumento das PFA em cadelas com neoplasia mamária maligna ulcerada se deve pela maior inflamação tecidual (BUSH, 2004; CÉRON et al., 2005; GEBHARDT et al., 2009; GRIEBSCH et al., 2009; GALEZOWSKI, et al., 2010). A inflamação peritumoral leva à ativação de macrófagos e à liberação de citocinas, que são importantes na ativação da resposta de fase aguda com consequentes alterações das PFA (BALWILL, CHARLES & MANTOVANI, 2005; ROXBURGH & McMILLAN, 2010). Outro fator a ser considerado é a maior expressão de COX2 no carcinoma mamário o que leva a maior liberação das PFA através da estimulação destes receptores (PLANELLAS et al., 2009; HELLER et al., 2005).

A avaliação do leucograma das pacientes com neoplasia mamária não ulcerada não revelou um padrão inflamatório padrão, apesar do aumento significativo da PCR e da Hp sérica, revelando que as PFA podem estar aumentadas mesmo em pacientes sem alterações no hemograma.

O aumento da PCR sérica em cadelas com neoplasia mamária foi demonstrado em pesquisas recentes (CROSSLEY et al., 2010; PLANELLAS et a., 2009; TECLES et al., 2009). O presente estudo observou aumento da PCR nas pacientes com neoplasia mamária maligna e não naquelas com neoplasia benigna, sugerindo que a elevação sérica desta proteína está relacionada com malignidade. O aumento da PCR correlacionando com malignidade da doença e pior prognóstico foi demonstrado em cães com linfoma, câncer pancreático e carcinoma de células escamosas (MUKORERA et al., 2011; GALEZOWSKI et al., 2010). Em humanos, observou-se elevações na PCR sérica em tumores de mama e próstata com estadios mais avançados (STARK et al., 2009; RAVISHANKARAN & KARUNANITHI, 2011).

As funções biológicas da Hp não estão bem compreendidas, mas sabe-se que a Hp se liga à hemoglobina livre, prevenindo as perdas de ferro e reduzindo o dano renal (MARTINEZ-SUBIELA et al., 2002, THEILGAARD-MÖNCH et al., 2006). Os hepatócitos são as principais produtoras da Hp que são liberada frente a estímulos como a inflamação, mas as mesmas podem ser sintetizadas por outras células e tecidos como a célula cancerígena. Elevações da Hp foram observadas em cães com linfoma (CALAZANS et al., 2009) e em seres humanos com vários tipos de câncer, como câncer de ovário (YE et al., 2003), adenocarcinoma uterino (NABLI, TULLER & SHARPE-TIMMS, 2009), e pâncreas (OKUYAMA et al., 2006).

A albumina é uma proteína de fase aguda negativa, a redução observada apenas nas pacientes com neoplasia maligna ulcerada pode ser devido ao aumento expressivo da PCR e da Hp neste grupo, obedecendo um mecanismo de compensação. As citocinas pró-inflamatórias diminuem a síntese da albumina, uma vez que promovem a síntese de outras PFA (PEREIRA & BURINI, 1992; CALAZANS et al., 2009).

Dentre as proteínas estudadas neste trabalho e identificadas pelo peso molecular como 34 kDa, 31 kDa e 23 kDa, não foram encontrados estudos a respeito, o que impossibilita conhecer o mecanismo de ação e a fisiologia. Assim, o presente trabalho optou por considerar o estudo das proteínas 34 kDa, 31 kDa e 23 kDa em função de suas expressões nos gráficos da eletroforese, destacando que o aumento da proteína 31 kDa nas pacientes com neoplasia maligna e da proteína 34 kDa nas pacientes com neoplasia maligna ulcerada merecem atenção em estudos futuros a fim de reconhecer e esclarecer o papel destas proteínas nas neoplasias mamária em cães.

## **5. CONCLUSÃO**

A PCR e a Hp são proteínas inespecíficas, porém, altamente sensíveis, podendo ser usadas como ferramentas auxiliares no diagnóstico e prognóstico de neoplasia mamária em cadelas.

## 6. REFERÊNCIAS

BALKWILL, F; CHARLES, F.A; MANTOVANI, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. **Cancer Cell**, v.7, p.211-217, 2005.

BUSH, B. M. Bioquímica Plasmática. In:**Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. São Paulo: Roca, cap. 5, p.169-223, 2004.

CALAZANS, S.G; DALECK, C.R; FAGLIARI, J.J; REPETTI, C.F; De NARDI, A.B; CASTRO, J.H.T; FERNANDES, S.C; CÉSAR, J.R.F; RODIGUERI, S.M. Proteinograma sérico de cães sadios e com linfoma obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.5, p.1044-1048, 2009.

CERÓN J.J; ECKERSAL P.D; MARTINEZ-SUBIELA S. Acute phase proteins in dogs and cats: Current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, p.85–99, 2005.

CROSSLEY, R; COLOMA, A; RÍOS, C; GONZÁLEZ, C. Determinación de proteína C-reactiva en hembras caninas con tumores mamarios benignos y malignos. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.42, p.101-105, 2010.

DE NARDI, A.B; RODASKI, S; SOUSA, R.S; COSTA, T.A; MACEDO, T.R; RODIGHERI, 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.

FONSECA, C.S; DALECK, C.R. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovário-histerectomia como terapia adjuvante. **Ciência Rural**, v.30, n.4, p.731-735, 2000.

GALEZOWSKI, A.M; SNEAD, E.C.R; KIDNEY, B.A; JACKSON, M.L. C-Reactive Protein as a prognostic indicator in dogs with acute abdomen syndrome. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**; v.22, p.395-401, 2010;

GEBHARDT, C; HISRSCHBERGER, J; RAU, S; ARNDT G; KRAINER, K; SCHWEIGERT, F.J; BRUNNBERGE L; KASPERS, B; KOHN, B. Use of C-reactive protein in dogs with systemic inflammatory response syndrome or sepsis. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.19, n.5, p.450-458, 2009;

GRIEBSCH,C; ARNDT, G; RAILA, J; SCHWEIGERT, F.J, KOHN, B. C-reactive protein concentration in dogs with primary immunomediadede hemolytic anemia. **Veteterinary Clinical Pathology**, v.38, n.4, p.421-425, 2009.

HELLER, D.A.; CLIFFORD, C.A.; GOLDSCHMIDT, M. H.; D.E.; HOLT, D.E.; SHOFER, F.S.; SMITH, A.; SORENMO, K.U. Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. **Veterinary Pathology**, v.42, p.776-23 780, 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

MEUTEN, D.J. Tumors in domestic animals. 4.ed. **Ames**: Iowa State, p.788, 2002.

MOTTA, F.R. Imunorreatividade da prostaglantina E<sub>2</sub> relacionada à classificação histológica, estadiamento clínico e prognóstico de neoplasias mamárias em cadelas. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho Jaboticabal, 2008.

MUKORERA, V; DVIR, E; VAN DER MERWE, L.L; GODDARD, A. Serum C-Reactive Protein Concentration in Benign and Malignant Canine Spirocercosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine** n.25, p.963–966, 2011.

MURATA, H; SHIMADA, N; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, v.168, p.28-40, 2004.

MYLONAKIS, M.E; CERON, J.J; LEONTIDES, L; SIARKOU, V.I; MARTINEZ, S; TVARIJONAVICIUTE, A; KOUTINAS, A.F; HARRUS, S. Serum acute phase proteins as clinical phase indicators and outcome predictors in naturally occurring canine monocytic Erlichiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, n.25, p.211-217, 2011.

MARTINEZ-SUBIELA, S.; TECLES, F.; ECKERSALL, P. D.; CERON, J. J. Serum concentrations of acute phase protein in dogs with leishmaniasis. **Veterinary Record**, v. 150, n. 8, p. 241-244, 2002.

NABLY, H.N; TULLER, E; SHARPE-TIMMS, K.L; Haptoglobin Expression in endometrial adenocarcinoma of the uterus. **Journals Reproductive Sciences**, v.17, n.1, p. 47-55, 2010.

OKUYAMA, N; IDE, Y; NAKANO, M; NAKAGAWA, T; YAMANAKA, K; MORIWAKI, K; MURATA, K; OHIGASHI, H; YOKOYAMA, S; EGUCHI, H; Ishikawa, O; Ito, T; Kato, M; Kasahara, A; Kawano, S; Gu, J; Taniguchi, N; Miyoshi, E. Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: A detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation. **International Journal of Cancer**, v.118, n.11, p.2803–2808, 2006.

PEREIRA, P. C. M; BURINI, R. C. Reação metabólica à infecção no hospedeiro. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina**, v. 47, p.111-115, 1992.

RAVISHANKARAN, P; KARUNANITHI, R. Clinical significance of preoperative serum interleukin-6 and C-reactive protein level in breast cancer patients. **World Journal of Surgical Oncology**, v.9, 2011.

ROXBURGH, C.S; McMILLAN, D.C. Role of systemic inflammatory response in predicting survival in patients with primary operable cancer. **Future Oncology**, v6, p.149-163, 2010.

STARK, J.R; LI, H; KRAFT, P; KURTH, T; GIOVANNUCCI, E.L; STAMPFER, M.J; MA, J; MUCCI, L.A. Circulatin prediagnostic interleukin-6 and C-reactive protein and prostate cancer incidence and mortality. **International Journal of Cancer**, n.124, p.2683-2689, 2009

TECLES, F; CALDÍN, M; ZANELLA, A; MEMBIELA, F; TVARIJONAVICIUTE, A; SUBIELA, S.M; CERÓN, J.J. Serum acute phase protein in female dogs with mammary tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.21, p.214-219, 2009.

TEILGAARD-MÖNCH, K; JACOBSEIN, L.C; NIELSEN, M.J; RASMUSSEN, T; UDBY, L; GHARIB, M; ARKWRIGHT, P.D; GOMBART, A.F; CALAFAT,J; MOESTRUP, S.K; PORSE, B.O; BORREGAARD, N. Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and realized by neutrophils in response to activation. **Blood**, v.18, n.6, 2006.

YAMAMOTO, S; SHIDA, T; MIYAJI, S;SANTSUKA, H; FUJISE, H; MUKAWA, K; FURUKAWA, E; NAGAE, T; NAIKI, M. Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. **Veterinary Research Communications**, v.17, n.2, p.85-93, 1993.

YE, B; CRAMER, D.W; SKATES, S.J; GYGI, S.P; PRATOMO, V; FU, L; HORICK, N.K; LICKLIDER, L.J; SCHORGE, J.O; BERKOWITZ, R.S; MOK, S.M. Haptoglobin- $\alpha$  Subunit as potential serum biomarker in ovarian cancer identification and characterization using proteomic profiling and mass spectrometry. **Clinical Cancer Research**, v.9, p.2904-2911, 2003.

ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de



cadela. **Brazilian. Journal. of Veterinary. Research. and animal . Science.** São Paulo, v.38, n.1, p.38-41, 2001.

## **CAPITULO III**

### **IMUNOGLOBULINAS IGA E IGG EM CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA**

#### **IMMUNOGLOBULINS IGA AND IGG IN FEMALE DOGS WITH MAMMARY NEOPLASM**

#### **RESUMO**

Imunoglobulinas são moléculas do sistema imune que podem ter sua concentração sérica alterada mediante processos neoplásicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a concentração sérica das imunoglobulinas (Igs), IgA e IgG em cadelas com neoplasia mamária, comparando com a avaliação histológica e com o leucograma. Utilizou-se o método de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para identificação destas Igs. Foram avaliadas 45 cadelas com tumor de mama, divididas em três grupos: neoplasia benigna (n=13), neoplasia maligna não ulcerada (n=24) e neoplasia maligna ulcerada (n=8). O grupo controle foi constituído por 20 cadelas saudáveis. Não foram observadas diferenças significativas ( $P>0,05$ ) entre os grupos para a IgA. Para a IgG observou-se diminuição da concentração sérica no grupo neoplasia benigna ( $P=0,0026$ ), quando comparado ao grupo controle, e ao grupo neoplasia maligna não ulcerada ( $P=0,0051$ ). Conclui-se que a avaliação sérica das Igs G

e A não possuem valor diagnóstico e prognóstico para cadelas com neoplasia mamária e sugerem-se novos estudos para entender o papel da IgG sérica frente às neoplasias mamárias benignas em cadelas.

Palavras-Chave: cão, diagnóstico, neoplasia mamária

### **ABSTRACT**

Immunoglobulins are molecules of the immune system that may have its serum concentration altered by tumors. The aim of this study was to evaluate serum concentrations of immunoglobulins, IgG and IgA in female dogs with mammary tumors, compared with histological assessment and the white blood count. We used the method of electrophoresis in polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) for the identification of such Igs. We evaluated 45 female dogs with breast cancer were divided into three groups: benign (n=13), non-ulcerated malignancy (n=24) and malignant ulcer (n=8). The control group was consisted of 20 healthy female dogs. There were no significant differences ( $P>0.05$ ), between groups for IgA. For IgG revealed lower serum concentration in benign group ( $P=0.0026$ ), when compared to the control group, and the group does not ulcerated malignancy ( $P=0.0051$ ). We conclude that the evaluation of serum IgG and IgA do not have diagnostic and prognostic value for female dogs with breast cancer and suggest new studies to understand the role of serum IgG front of benign mammary tumors in female dogs.

Keywords: dog, diagnosis, mammary neoplasm

## 1. INTRODUÇÃO

Os tumores mamários são as neoplasias mais frequentes em cadelas com idade superior a cinco anos que não foram submetidas à castração antes do primeiro cio. Aproximadamente 50 a 70% das neoplasias mamárias apresentam classificação histológica maligna, contudo a evolução clínica e a capacidade de fazer metástase regional e/ou distante podem variar drasticamente entre os indivíduos (FONSECA & DALECK, 2000; ZUCCARI et al., 2001; MOTTA, 2008). Nos estádios iniciais, tumores benignos e malignos não são diferentes (KITCHELL, 1999). Características clínicas como tamanho do tumor, ulceração e presença de metástase estão associados ao pior prognóstico (LANA, RUTTERMAN e WITHROW, 2007), porém, a análise histopatológica continua sendo o método mais eficaz para o diagnóstico exato do tipo tumoral e para o prognóstico da doença (MISDORP, 2002).

Os marcadores tumorais vêm sendo utilizados para auxiliar no diagnóstico precoce e no prognóstico de diferentes neoplasias (CROSSLEY et al., 2010). Muitos destes marcadores são substâncias detectadas e quantificadas no sangue, fluidos e/ou tecidos corporais. As imunoglobulinas são glicoproteínas presentes em diversos fluidos orgânicos como o soro sanguíneo, saliva, secreção gástrica, secreção traqueobrônquica, secreção intestinal e seminal (ROIT, BROSTOFF e MALE, 2003). Cada molécula de Ig possui duas funções distintas, onde uma região da molécula é responsável pela ligação ao antígeno, enquanto outra região diferente promove funções efetoras que incluem a ligação da Ig ao tecido do hospedeiro, às várias células do sistema imune, a algumas células fagocitárias e ao primeiro componente da via clássica do sistema complemento (ROIT, BROSTOFF e MALE, 2003).

A imunoglobulina (Ig) mais abundante no soro de mamíferos é a IgG, seguida pela IgM e IgA, sendo esta última predominante em secreções como saliva, leite e fluido intestinal (TIZARD, 2002). A IgG constitui 70-75% do total de Igs no soro e é considerada um anticorpo típico (ROIT, BROSTOFF e MALE, 2003). Trata-se da Ig de maior atuação nos mecanismos de defesa mediados por anticorpos (TIZARD, 2002), apresentando-se igualmente distribuída nos espaços intra e extra-celular. Um mecanismo importante da IgG, nas suas subclasses IgG1 e IgG3 é a ativação da via clássica do complemento, que consiste em um complexo grupo de proteínas séricas envolvidas na eliminação dos patógenos e na mediação da inflamação (ROIT, BROSTOFF e MALE, 2003). Além disso, a IgG é a menor molécula dentre as Igs, e pode sair dos vasos sanguíneos mais facilmente que as demais. Essa capacidade é

particularmente importante nos tecidos inflamados, onde o aumento da permeabilidade vascular permite que a IgG atue mais intensamente no processo de defesa do fluido tecidual e dos tecidos corporais (TIZARD, 2002).

A IgA constitui 15-20% do total de Igs presentes no soro sanguíneo. É secretada pelos plasmócitos predominantemente localizados abaixo da superfície corporal. Ocasionalmente encontram-se polímeros mais altos de IgA no soro que nas secreções corpóreas. O principal modo de ação desta Ig é impedir a aderência de antígenos às superfícies corpóreas, além da sua exclusiva capacidade de agir dentro das células (TIZARD, 2002).

A IgA presente na glândula mamária é localmente sintetizada no tecido mamário, embora muitas células produtoras possam ser originárias do trato gastrointestinal. Já a IgG presente no tecido mamário é seletivamente transferida por transporte ativo a partir do soro. Se um antígeno ativo for infundido em uma glândula mamária não lactante, desenvolve-se uma resposta imune local na qual predominam a IgA e a IgG, particularmente a IgG1 (TIZARD, 2002). O predomínio destas imunoglobulinas despertou interesse na investigação de suas concentrações séricas frente processos neoplásicos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Foram selecionadas 45 cadelas de idades e raças variadas diagnosticadas com neoplasia mamária, atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná - Curitiba (HV-UFPR). Foram excluídas do estudo cadelas com doenças concomitantes à neoplasia e/ou submetidas a tratamento medicamentoso (corticóides, antiparasitários, antibióticos e antifúngicos) ou vacinadas em período inferior a quatro meses da data da consulta.

As amostras de sangue foram obtidas por venopunção da jugular externa. O sangue foi armazenado em tubos de ensaio com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para realização do leucograma e sem anticoagulante para realização do proteinograma sérico. Após centrifugação a 2500 rotações por minuto durante 5 minutos, o soro separado foi armazenado a -20°C até a realização do proteinograma. O leucograma foi realizado após 30 minutos da coleta, com a utilização de analisador automático (Mindray®), calibrado para sangue de cães.

A determinação da concentração da proteína sérica total (PST) foi realizada pelo método de Biureto (Labtest®, Belo Horizonte), utilizando analisador semi-automático

(Labquest®, Diagnóstica, Lagoa Santa/MG). A determinação das concentrações das Igs foi realizada por eletroforese em matriz de gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) utilizando o sistema vertical para eletroforese (Shimadzu CS 9301, Tokio, Japan), conforme técnica descrita por LAEMMLI (1970). As análises de PST e de eletroforese foram realizadas no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo.

As pacientes com neoplasia mamária foram submetidas à mastectomia e o tecido mamário removido foi fixado em formol 10% tamponado e encaminhado ao Laboratório de Patologia Veterinária do HV-UFPR para análise histopatológica segundo critérios da Organização Mundial da Saúde (MEUTEN, 2002). O processamento das amostras incluiu a inclusão em parafina, secção em cortes de 3 a 5 µm de espessura e coloração por hematoxilina e eosina.

Após a avaliação histopatológica, as pacientes foram divididas em três grupos: neoplasia benigna, neoplasia maligna não ulcerada e maligna ulcerada.

Para o grupo controle foram selecionadas 20 cadelas clinicamente saudáveis com idade média de cinco anos (3 a 8 anos), encaminhadas ao HV-UFPR para ovariosalpingohisterectomia eletiva ou vacinação. Foram realizados exames clínicos, hematológicos e de imagem a fim de atestar higidez das pacientes.

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi empregado para verificar a normalidade dos resultados. As concentrações séricas das Igs obtidas por eletroforese resultaram em dados não paramétricos, que foram avaliadas pelo teste de análise de variância de Kruskal-Wallis e teste Dunn para a comparação dos grupos. A idade das pacientes resultou em dados paramétricos, sendo empregado o teste de análise de variância one-way ANOVA, seguido por teste de Tukey para comparação entre os grupos. O teste Spearman para dados não paramétricos foi aplicado para verificar a correlação entre as Igs e a presença de inflamação. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

### **3. RESULTADOS**

As pacientes com neoplasia apresentaram média de idade semelhante entre os grupos ( $P > 0,05$ ). Para o grupo de pacientes com neoplasia benigna, a média de idade foi de 8,8 anos (3 a 16 anos), para as pacientes com neoplasia maligna não ulcerada, 9,8 anos (5 a 15 anos) e para as pacientes com neoplasia maligna ulcerada, foi de 9,1 anos (5 a 14 anos).

De acordo com o resultado da avaliação histopatológica, 71,1% (32/45) das cadelas apresentaram tumores mamários malignos e 28,9% (13/45) benignos. Nenhuma paciente com neoplasia mamária benigna apresentou ulceração tumoral e no grupo de neoplasias mamárias malignas, oito estavam ulceradas e 24 não apresentaram ulceração.

No grupo neoplasia benigna 53,8% (7/13) foram classificadas como adenoma simples, 23,1% (3/13) como adenoma complexo e 23,1% (3/13) como tumor misto benigno. No grupo neoplasia maligna, 59,4% (19/32) foram classificadas como carcinoma simples, 15,6% (5/32) como carcinoma papilífero cístico, 12,5% (4/32) como carcinoma papilífero simples a complexo, 6,3% (2/32) como carcinoma complexo, 3,1% (1/32) como carcinoma sólido e 3,1% (1/32) como tumor misto maligno.

No presente estudo, foi observada diminuição de IgG no grupo neoplasia benigna ( $962,8 \pm 246,2\text{mg/dL}$ ;  $P=0,0026$ ), quando comparado ao grupo controle ( $1493 \pm 505,3\text{mg/dL}$ ). Da mesma forma, observou-se diminuição na concentração sérica da IgG no grupo neoplasia benigna ( $962,8 \pm 246,2\text{mg/dL}$ ) quando comparado ao grupo neoplasia maligna não ulcerada ( $1480 \pm 540,6\text{mg/dL}$ ;  $P=0,0051$ ). A correlação entre inflamação e concentração da IgG não foi significativa ( $P>0,05$ ) para nenhum dos grupos estudados. A avaliação da IgA revelou haver diferença significativa entre o grupo controle ( $43,60 \pm 15,10$ ) e o grupo neoplasia maligna não ulcerada ( $29,17 \pm 20,43$ ;  $P=0,0153$ ). Entre os demais grupos, não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ), para a IgA e também não foi observada correlação ( $P>0,05$ ) entre os valores séricos da IgA e o leucograma. O resultado das concentrações de IgG e IgA seguem descritos na TABELA 2.

TABELA 2. CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE IgG E IgA OBTIDAS PELO METODO DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA, EM CADELAS SAUDÁVEIS E COM NEOPLASIA MAMÁRIA.

	Grupo Controle	Grupo neoplasia benigna	Grupo neoplasia maligna não ulcerada	Grupo neoplasia maligna ulcerada
IgG (mg/dL)	1493 <sup>a</sup> $\pm 505,3$	962,8 <sup>b</sup> $\pm 246,2$	1480 <sup>a</sup> $\pm 540,6$	1339 <sup>ab</sup> $\pm 626,3$
IgA (mg/dL)	39,22 $\pm 7,19$	33,12 $\pm 15,24$	30,90 $\pm 14,85$	28,29 $\pm 16,04$

Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si, Kruskal-Wallis e teste múltiplo de comparação de Dunn ( $P<0,05$ ). \*Valores considerados *outliers* foram retirados das amostras.

#### 4. DISCUSSÃO

As alterações celulares comumente provocadas pelas neoplasias são o processo carcinogênico desencadeado pela apoptose desordenada, autossuficiência quanto aos fatores de crescimento, potencial replicativo infinito, angiogênese sustentada e invasão tecidual e metástase. Estas alterações são mais intensas de acordo com o grau de malignidade tumoral, de forma que neoplasias malignas apresentam um padrão maior de alterações do que neoplasias benignas (RODASKI e PIEDARZ, 2008). Na veterinária, aumentos séricos de imunoglobulinas, inclusive IgG, acontecem na síndrome de hiperviscosidade sanguínea ou síndrome hiperproteica globulínica, que é uma síndrome paraneoplásica, desencadeada por cânceres que induzem a produção de globulinas, como o mieloma múltiplo, o linfoma e as leucemias (PINHO, 2008). Na medicina, pacientes com câncer podem apresentar comprometimento ou exacerbação da síntese de anticorpos. Estas alterações acontecem na dependência dos mecanismos imunológicos envolvidos na proliferação de células tumorais, o que vai determinar a elevação ou redução da concentração das Igs no paciente canceroso (SOUZA, LEHN e DENARDIN, 2003).

Moléculas de imunoglobulinas (Igs) de cadeia leve e de cadeia pesadas foram detectadas em linhagens celulares de pessoas portadoras de câncer, MCF-7 (câncer de mama), MGC (câncer gástrico), HeLa (câncer cervical), SW480 (câncer de cólon) e HNE-2 (câncer de nasofaringe). A constatação da expressão de Igs em células cancerígenas foi um importante passo na compreensão de que genes codificadores de Igs podem ser transcritos por outras células além de linfócitos (HU et al., 2008).

Os resultados observados na avaliação dos valores séricos de IgG e IgA neste trabalho demonstram não haver correlação entre a concentração destas Igs e o grau de malignidade tumoral. Os dados obtidos corroboram com os resultados observados por CALAZANS et al. (2009) ao avaliar a concentração de IgG e IgA em cães com linfoma e em cães saudáveis, utilizando a eletroforese em gel de poliacrilamida. A ausência de variação da IgA sérica pode ter sua explicação no fato de que a IgA presente no soro não possui a peça secretora (PS), um componente antigênico extra, encontrado apenas na IgA de secreções externas (salivar, nasal, tráqueo-bronquial, lacrimal, fluidos gastrintestinais, plasma seminal, bile, urina e colostro). A IgA associada à PS é denominada IgAS. Estudos sugerem que a ligação da PS à IgA facilita o transporte



desta Ig para a superfície epitelial, tornando a IgAS mais resistente à proteólise que a IgA sérica (ZAHA-INOUE, 1985).

Calazans et al. (2009) citam a grande variação nas concentrações séricas tanto de cães saudáveis quanto de cães com linfoma para explicar o resultado observado. Contudo, a ausência do componente antigênico, isto é, a ausência da PS na IgA sérica pode ter papel determinante para explicar os resultados encontrados tanto em cães com linfoma, quanto em cadelas com neoplasia mamária.

As Igs A e G são produzidas por plasmócitos, células derivadas da ativação dos linfócitos B após o estímulo de citocinas produzidas no local da inflamação (TIZARD, 2009). Em cadelas com neoplasia mamária, seria esperado alteração nestas proteínas em função da ação inflamatória peritumoral responsável pela ativação de macrófagos e liberação de citocinas (BALKWILL et al., 2005; ROXBURGH & McMILLAN, 2010). No presente estudo a fraca alteração na concentração sérica destas proteínas também pode ser explicada pela liberação de cortisol, que em concentrações elevadas promove o sequestro de linfócitos em órgãos linfóides, alterando a concentração na circulação sanguínea (JAIN, 1993), e diminuindo a produção e liberação das imunoglobulinas (LEANDRO, 2006).

As Igs da classe G exercem diversas funções biológicas importantes ao interagir com vários tipos celulares. O princípio desta interação está na ligação dos domínios Fc (fragmento cristalizável) da IgG com receptores específicos (Fc $\gamma$ R: Fc *gamma* receptores) presentes nas membranas das células do sistema imunológico. Ao se ligar aos Fc $\gamma$ R, a IgG estimula uma variedade de respostas biológicas diretamente vinculadas à eliminação de antígenos como fagocitose, citotoxicidade celular dependente do anticorpo, geração de espécies reativas de oxigênio, liberação de enzimas lisossomais, *clearance* de imunocomplexos, e regulação da produção de anticorpos (ROIT, BROSTOFF e MALE, 2003; MARZOCCHI-MACHADO e LUCISANO-VALIM, 2005). A IgA desempenha importante função na neutralização e eliminação de antígenos locais e na modulação de fatores imunológicos teciduais ou humorais (SOUZA, LEHN e DENARDIN, 2003), e está abundante no tecido mamário (TIZZARD, 2002).

Em função destas características de resposta, esperava-se que as Igs G e A apresentassem alterações na concentração sérica de cadelas com neoplasia mamária

maligna, principalmente devido à capacidade das células neoplásicas de interferir na fisiologia celular e tendo em vista a atuação do processo de carcinogênese tumoral (RODASKI e PIEDARZ, 2008), que possivelmente acionaria um mecanismo de síntese das imunoglobulinas, incluindo IgG e IgA, uma vez que estas Igs exercem papéis importantes na manutenção da homeostase do organismo.

Os resultados do presente trabalho demonstram a necessidade de novas pesquisas a fim de avaliar a função das Igs tanto presentes no soro, quanto presentes nas secreções da glândula mamária de cadelas acometidas por neoplasias. Esta nova avaliação pode fornecer informações importantes sobre o comportamento das Igs G e A à oncologia veterinária.

## 5. CONCLUSÃO

Conclui-se que a avaliação sérica das Imunoglobulinas IgA e IgG não possui valor diagnóstico nem valor prognóstico em cadelas com neoplasia mamária. Novas pesquisas são necessárias para esclarecer o papel da IgG nas neoplasias mamárias benignas em cadelas.

## 6. REFERÊNCIAS.

BALKWILL, F; CHARLES, F.A; MANTOVANI, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. **Cancer Cell**, v.7, p.211-217, 2005.

CALAZANS, S.G; DALECK, C.R; FAGLIARI, J.J; REPETTI, C.F; De NARDI, A.B; CASTRO, J.H.T; FERNANDES, S.C; CÉSAR, J.R.F; RODIGUERI, S.M. Proteinograma sérico de cães sadios e com linfoma obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.5, p.1044-1048, 2009.

CROSSLEY, R; COLOMA, A; RÍOS, C; GONZÁLEZ, C. Determinación de proteína C-reactiva en hembras caninas con tumores mamarios benignos y malignos. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.42, p.101-105, 2010.

FONSECA, C.S; DALECK, C.R. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovariectomia como terapia adjuvante. **Ciência Rural**, v.30, n.4, p.731-735, 2000.

GIRAUDEL JM, PAGES JP, GUELFY JF. Monoclonal Gamopathies in the dog: A Retrospective Study of 18 Cases (1986-1999) and Literature Review. **Journal of American Animal Hospital Association**. Toulouse (FR), v. 38, p.135-147, março-abril, 2002.

HU, D; ZHENG, H; LIU, H; LI, M; REN, W; LIAO, W; DUAN, Z; LI, L; CAO, Y. Immunoglobulin expression and its biological significance in cancer cells. **Cellular & Molecular Immunology**. v.5, n.5, p319-324, 2008.

JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. 1ed. Philadelphia:Lea & Febiger, 1993.

KITCHELL, B. Tumores mamarios. *In*: KIRK, R; BONAGURA, J. **Terapéutica Veeterinaria de Pequeños Animales**. 12ªed. MacGrawHill Interamericana, México. 1999, p.1181-1187.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LANA, S.E; RUTTERMAN, G.R; WITHROW, S.J. Tummor of the mammary gland. *In*: WITHROW, S.J; MaCEWEN, E.G, eds. **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 4ªed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007, p.619-635.

LEANDRO, C.G.; NASCIMENTO, E.; AZEVEDO, M.M.; VIEGAS, A.; ALBUQUERQUE, C.; CAVALCANTI, C.B.; MANHAES-DE-CASTRO, R.; CASTRO, C.M.M.B. Efeito da L-glutamina sobre o Perfil Leucocitário e a Função Fagocítica de Macrófagos de Ratos Estressados. **Revista de Nutrição**, v.19, n.4, 2006.

MARZOCCHI-MACHADO, C.M; LUCISANO-VALIM, Y.M. Receptores para imunoglobulina G (Fc $\gamma$ R). **Medicina**. n.38(1), p.82-95, 2005.

MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. Iowa:Wiley-Blackwell, 2002.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. *In*: MISDORP, W. ed. **Tumors of the domestic animals**. 4ªed. Ames, IA: Iowa State Press, 2002, p.575-606.

MOTTA, F.R. **Imunorreatividade da prostaglantina E<sub>2</sub> relacionada à classificação histológica, estadiamento clínico e prognóstico de neoplasias mamárias em cadelas**. 2008. 51f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Campus Jaboticabal.

PINHO, M.C. Mieloma múltiplo associado à produção de IgG no cão: relato de caso. 2008. 19f. Monografia (Especialização em Patologia Clínica) – Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, RJ.

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: Rocca, 2008, p.23-49.

ROIT, I; BROSTOFF, J; MALE, D. **Imunologia**.6ª ed. Manole Ltda: Barueri/SP, 2003. 481p.

ROXBURGH, C.S.; McMILLAN, D.C. Role of systemic inflammatory response in predicting survival in patients with primary operable cancer. **Future Medicine**, v.6, p.149-163, 2010.

SOUZA, R.M; LEHN, C.N; DENARDIN, O.V.P. Níveis séricos e salivar de imunoglobulina A em portadores de câncer de boca e orofaringe. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.49(1), p.40-44, 2003.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária – uma introdução**. 6ªed. Roca: São Paulo, 2002, 532p.

TIZARD, I.R. **Introdução à Imunologia Veterinária**. 8ªed. Elsevier: Barcelona, 2009. 592p.

ZAHA-YNOUYE, M.M. A imunoglobulina A secretora (IgAS). **Semina**. v.6(3), p.118-124, 1985.

ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. **Brazilian Journal of Veterinary Research. and Animal Science**, v.38, n.1, p.38-41, 2001.