

# HIPEREXPRESSÃO DE ERK1/2 E CYR61 EM CARCINOMA MAMÁRIO DE CADELAS

**MIGUEL**, Marina Pacheco<sup>1</sup>; **MENEZES**, Liliana Borges<sup>2</sup>; **FIORAVANTI**, Maria Clorinda Soares<sup>3</sup>, **BRITO**, Luiz Augusto Batista<sup>3</sup>, **ARAÚJO**, Eugênio Gonçalves de<sup>3</sup>

Palavras-chave: adenocarcinoma, adenoma, imunoistoquímica, tumor

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento da proximidade entre homem e animais de companhia determinou uma maior preocupação relacionando fatores como nutrição com dietas balanceadas, criação de serviços especializados, medidas profiláticas, novos métodos de diagnósticos e protocolos terapêuticos mais específicos e eficazes, os quais têm contribuído para o aumento da sobrevida de cães e gatos.

Devido a essa maior longevidade, algumas enfermidades que geralmente são diagnosticadas em cães de meia idade a idosos, aumentaram sua frequência em Centros Clínicos Veterinários. Os tumores mamários afetam fêmeas de meia idade a idosas e são as neoplasias mais frequentemente observadas em cadelas (MOULTON, 1990; LOAR, 1992).

As neoplasias mais comuns em cadelas são as que acometem as glândulas mamárias, representando 25 a 30% do total de afecções neoplásicas (MOULTON, 1990; ZUCCARI et al., 2001). Histologicamente, a maioria dos tumores mamários, aproximadamente 65%, são de caráter benigno e 40% a 50% são malignos (MOULTON, 1990; ZUCCARI et al., 2001; DE NARDI et al., 2002; TANAKA, 2003).

Os métodos de classificação das neoplasias mamárias variam consideravelmente, baseando-se no tipo de células envolvidas, no padrão histológico das células neoplásicas, mudanças teciduais, presença de necrose e de infiltração em seu estroma (MOULTON, 1990). Os tumores de comportamento benigno são classificados como adenomas, fibroadenomas, tumores mistos benignos, papiloma ductal. Os malignos são classificados em carcinomas (complexos e simples), tipos especiais de carcinoma, sarcomas, carcinosarcomas e carcinoma ou sarcoma em tumores benignos (MISDORP et al., 1999; MISDORP et al., 2002; LIPARISI et al., 2003).

A etiologia de tumores mamários mais aceita refere-se à influência da atividade hormonal (ZUCCARI et al., 2001; DE NARDI, 2002). Foi constatado que o risco de desenvolvimento de tumor mamário é aproximadamente de 0,5% para cadelas castradas antes do primeiro cio, 8% depois do primeiro cio e 26% após o segundo cio (O'KEEFE, 1997; TANAKA, 2003). Outros fatores avaliados que demonstraram aumentar a chance de incidência de neoplasias mamárias foram obesidade, dieta rica em gordura na juventude, administração de progestágenos de longa ação para prevenção de estro, terapia estrogênica usada para controle de gestação e episódios de pseudogestação (TANAKA, 2003).

Acredita-se que a maioria das patologias morfológicas de um organismo ocorra por alterações em alguma fase do ciclo celular (PERALTA-ZARAGOZA et al., 1997). O ciclo celular é estimulado e regulado por transduções de sinais entre receptores, mensageiros e efetores. Os receptores são proteínas de membrana capazes de se ligar a um transmissor na parte extracelular e permitir a modificação de algum componente intracelular, ou seja, os receptores são os pontos de entrada da informação na célula. A função dos mensageiros intracelulares é transmitir o sinal

do receptor da membrana a diversas proteínas, que farão com que um determinado sinal possa ser sentido pela célula. Os efetores são os componentes que produzem o efeito final na célula (LENZ, 2000).

Vários estudos vêm sendo realizados para definir a relevância clínica de proteínas celulares que participam na progressão do crescimento de neoplasias. Esse interesse tem sido focado particularmente em proteínas que são potenciais indicadores clínicos ou fatores prognósticos de doença (MENENDEZ et al., 2003).

A sequência da cascata das quinases envolve três proteínas análogas, MAPKKK, MAPKK e MAPK. A ativação dessa cascata acontece mediante fosforilação da proteína quinase anterior, sendo MAPK o último componente da cascata. Proteína quinase ativada por mitógeno (MAP quinase) é a chave das proteínas transdutoras de sinal que transmitem sinais envolvendo proliferação celular e apoptose. Os caminhos de transdução de sinal são indicadores da intensidade da indução feita por fatores de crescimento, hormônios esteróides e proteína G. Dentre os três principais caminhos da MAPK, ERK1/2 é o mais relevante em tumores mamários (SANTEN et al., 2002). Estudos recentes demonstraram que neoplasias mamárias frequentemente possuem um aumento na proporção de células com a forma MAPK ativada (SANTEN et al., 2002).

A primeira evidência para o papel das MAPK foi demonstrada pela hiperexpressão e hiperfosforilação de ERK1/2 em câncer de mama primário. Estudos subsequentes confirmaram essa elevação de ERK1/2 tanto em tumores mamários quanto em outros tipos de cânceres (WANG et al., 2002).

*Cyr61* é uma proteína pertencente a uma família de reguladores de crescimento, denominada família CCN. Esta família consiste de seis membros distintos conhecidos como *Cyr61* (Proteína rica em Cisteína), CTGF (Fator de Crescimento de Tecido Conectivo), Nov (Gene de Hiperexpressão em Nefroblastoma), WISP-1, 2 e 3 (Proteínas de Secreção Induzida). Estas proteínas estão associadas à Matriz Extracelular (ECM) e à superfície celular e estão envolvidas em vários mecanismos de regulação de função celular, incluindo proliferação, diferenciação, sobrevivência, adesão e migração (PLANQUE & PERBAL, 2003).

XIE et al. (2001) relata que *Cyr61* é uma proteína altamente expressada em tumores mamários. Vários estudos têm sugerido uma hiperexpressão de *Cyr61* em tumores de mama e possível envolvimento no desenvolvimento de neoplasias mediadas por estrógenos. De acordo com PLANQUE & PERBAL (2003), foi observado um aumento da expressão de *Cyr61* em um grande número de tumores mamários primários com receptor de progesterona positivo, mas receptor de estrógenos negativo. Esta observação sugere que *Cyr61* pode ser mediador da atividade de progesterona em neoplasias mamárias.

Devido à elevada incidência desta neoplasia, seu estudo vem crescendo em relação a outras afecções. Aumentos de glândulas mamárias que não estejam relacionados com pseudociese, lactação ou mastite devem ser avaliados para possíveis diagnósticos de neoplasias (ZUCCARI et al., 2001). O objetivo deste trabalho é estudar a expressão de *Cyr61* e ERK1/2 em adenocarcinoma de glândulas mamárias de cadelas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

A imunoistoquímica foi realizada em cortes parafinados de carcinomas complexo de mama de 2 cadelas, classificados em exame histopatológico prévio feito no Setor de Patologia da Escola de Veterinária da UFG.

Primeiramente, as amostras obtidas foram fixadas em formol tamponado e processadas de acordo com a técnica descrita por LUNA (1968). Os blocos foram laminados a 3 µm e aderidos em lâminas previamente silanadas.

Posteriormente à aderência, as lâminas foram incubadas em estufa a 36° C, para facilitar o processo de desparafinização, conseguido após passagens em xilol e álcool 70%, 80%, 90% e absoluto.

Na técnica de imunistoquímica a recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato e aquecidas em panela de pressão por 6 minutos. O bloqueio da peroxidase foi realizado imergindo as lâminas em uma solução de álcool metílico e peróxido de hidrogênio, seguindo o protocolo. Posteriormente, foi colocado o anticorpo primário anti-*Cyr61* (Santa Cruz Biotechnology, EUA) nas amostras de adenocarcinoma mamário, incubado em diluição de 1/500 e anti-pERK1/2 em amostras de adenoma complexo de mama, em diluição de 1/1000 a 4 °C câmara úmida por toda noite. No dia seguinte, o anticorpo secundário anti-coelho foi adicionado. A reação foi revelada pela adição de DAB peroxidase (ARAÚJO et al., 2001). As lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris e observadas em microscópio óptico.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os tecidos tratados com anti-pERK1/2 mostraram marcação acentuada dos núcleos de células tumorais oriundas do epitélio glandular e de células endotélias, além de marcação moderada de núcleo de fibroblastos presentes no estroma tumoral. O mesmo foi observado por CHENG et al. (2001), em estudo realizado para detectar expressão das proteínas p-MAPK, c-fos e c-jun em tumores mamários.

Vários trabalhos sugerem a participação de MAPK ativada em tumor mamário humano (ADEYINKA et al., 2002; OH et al., 2001; KUROKAWA et al., 2000). De acordo com trabalho realizado por ADEYINKA et al. (2002) a hiperexpressão de MAPKs ERK1 e ERK2 ativadas pode ocorrer durante o desenvolvimento de neoplasias *in vivo*. Estes autores verificaram evidente aumento na expressão dessas proteínas na maioria dos tecidos neoplásicos estudados quando comparadas a tecidos mamários normais.

Na microscopia das lâminas com anticorpo anti-*Cyr61* observou-se marcação difusa do estroma de caráter moderado, sendo mais evidente no endotélio vascular. Ainda que escasso, o citoplasma das células epiteliais tumorais encontrava-se fortemente marcado, delimitando claramente os ninhos de células dispersos no estroma.

O anticorpo policlonal *Cyr61* tem sido utilizado em tecidos humanos no estudo de câncer de mama (MENENDEZ et al., 2003). A marcação por *Cyr61* descrita era esperada, pois segundo MOUSSAD E BRIGSTOCK (2000) esta proteína está envolvida em diversos eventos celulares, principalmente, proliferação, adesão, migração, apoptose, regulação da angiogênese, crescimento de tumor, placentação, ossificação endocondral, entre outros.

A marcação difusa e moderada do estroma mamário, a maior evidência no endotélio vascular e a forte marcação dos citoplasmas das células epiteliais tumorais foram observações semelhantes ao descrito por MOUSSAD & BRIGSTOCK (2000) que afirmaram que a *Cyr61*, bem como as outras proteínas da mesma família, têm como células alvo os fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais, células do músculo liso e células normais.

De acordo com TSAI et al. (2000), carcinomas invasivos mamários revelam elevada expressão da proteína *Cyr61*. Estudos adicionais usando

imunoistoquímica, revelaram que a proteína *Cyr61* estava hiperexpressada em 30% dos tumores mamários enquanto que em tecidos mamários normais não houve expressão.

#### 4. CONCLUSÃO

As observações microscópicas da imunoistoquímica demonstram que a detecção dos níveis de expressão da *Cyr61* e ERK1/2 em adenocarcinoma mamário e adenoma complexo de cadelas podem constituir-se de um marcador precoce, ser usado como um fator prognóstico e ser um alvo molecular para componentes designados a bloquear a proliferação celular visando uma possível terapêutica.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ADEYINKA, A.; NUI, Y.; CHERLET T.; SNELL, L.; WATSON, P.H.; MURPHY, L. C. Activated Mitogen-activated Protein Kinase Expression during Human Breast Tumorigenesis and Breast Cancer Progression. **Clinical Cancer Research**. v. 8, p. 1747-1753, 2002.
- 2 ARAUJO, E. G.; BIANCHI, C.; SATO, K.; LI XA, SELLKE, FW. Inactivation of the MEK/ERK pathway in the myocardium during cardiopulmonary bypass. *Journal of Thoracic and cardiovascular surgery*, St Louis, v.121, n.4, p. 773-781, 2001.
- 3 CHENG, R. X.; FENG, D. Y.; ZHENG, H.; TAN, Y. Effect of activation of p-MAPK on activating c-fos and c-jun proteins in breast cancer. **Journal of West China University of Medical Sciences**, v. 26 n. 1, p. 10-12, 2001
- 4 DE NARDI, A.B.; RODASKI, S.; SOUSA, R.S.; COSTA, T.A.; MACEDO, T.R.; RODIGHIERI, S.M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C.H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, Paraná, v.7, n.2, p.15-26, 2002.
5. KUROKAWA H., LENFERINK A., SIMPSON J., PISACANE P., SLIWKOWSKI M., FORBES J., ARTEAGA C. Inhibition of HER2/neu (erbB-2) and mitogen-activated protein kinases enhances tamoxifen action against HER2-overexpressing, tamoxifen-resistant breast cancer cells. **Cancer Research**, Japão, v. 60, p. 5887-5894, 2000.
- 6 LIPARISI, F.; AMARAL, P. P.; ARAÚJO, S. T. Estudo histopatológico retrospectivo das neoplasias mamárias em cadelas diagnosticadas no laboratório de anatomia patológica do Centro Universitário Plínio Leite. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 11., 2003, Botucatu. **Resumos...** Botucatu:UNESP, 2003. p. 240.
- 7 LENZ, G. **Transdução de sinal**. Janeiro, 2000. 14f. (Parte introdutória da tese de doutorado submetida ao CPG-Bioquímica da UFRGS) - Porto Alegre. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/biofis/Cap2Transinal.PDF>. Acesso em 18 jun. 2003.
- 8 LOAR, A. S. O sistema reprodutivo. In: ETTINGER, S. J. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 3. ed. São Paulo: Manole, 1992. cap. 102, p. 1895-1906.
- 9 LUNA, L.G. **Manual of histological staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. Washington:Mc Graw Hill, 1968. 258 p.
- 10 MENENDEZ, J.A.; MEHMI, I.; GRIGGS, D.W.; LUPU, R. The angiogenic factor CYR61 in breast cancer: molecular pathology and therapeutic prospectives. **Endocrine-Related Cancer**, Bristol, v. 10, n. 2, p. 141-52, 2003.
- 11 MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, T.P. *Histological Classification of Mammary Tumours of the dog and cat*. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1999. 59p.

- 12 MISDORP, W; Tumours of the mammary gland. In: Meulten, D. J. **Tumours in domestic animals**. 4. ed. London: University California Press, 2002. cap. 12, p. 575-606.
- 13 MOULTON, J. E. Tumors of the mammary gland. In: MOULTON, J. E. **Tumor in domestic animals**. 3. ed. London: University California Press, 1990. cap.12, p.518-547.
- 14 MOUSSAD, E. E.; BRIGSTOCK, D. R. Connective tissue growth factor: what's in a name? **Molecular Genetics and Metabolism**, Orlando, v. 71, n. 1-2, p. 276-92, 2000.
- 15 OH, A. S.; LORANT, L. A.; HOLLOWAY, J. N., MILLER, D. L.; KERN, F. G.; EL-ASHRY, D.. Hyperactivation of MAPK Induces Loss of ER $\alpha$  Expression in Breast Cancer Cells. **Molecular Endocrinology**. Washington. v. 15, n. 8, p. 1344-1359, 2001.
- 16 O'KEEFE, D. A. Tumores do sistema genital masculino e feminino. In: ETTINGER, S. J.; FELDEMAN, E. C., Tratado de medicina interna veterinária: moléstia do cão e do gato, 4. ed. São Paulo: Manole: 1997. v. 2. cap. 131, p. 2344-2350.
17. PERALTA-ZARAGOZA, O.; BAHENA-ROMÁN, M.; DÍAZ-BENÍTEZ, C. E.; MADRID-MARINA, V. M. C. Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapêuticas. **Salud Publica México**, México, v. 39, p. 451-462, 1997.
- 18 PLANQUE, N.; PERBAL, B. A structural approach to the role of CCN (CYR61/CTGF/NOV) proteins in tumorigenesis. **Cancer Cell International**. França. v. 3, n. 15, p. 1-15, 2003.
19. SANTEN, R. J.; SONGB, R. X.; MCPHERSON, R.; KUMARC, R., LIANA ADAM, L.; MEEI-HUEY JENG, M. H.; YUE, W. The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. USA. v. 80, p. 239–256, 2002.
- 20 TANAKA, N. Tumor de mama: Qual a melhor conduta ? Boletim Informativo ANCLIVEPA-SP. São Paulo, ano VII, n. 29, 2003, p. 6-7.
- 21 TSAI M. S., HORNBY A. E., LAKINS, J.; LUPU, R. Expression and function of CYR61, an angiogenic factor, in breast cancer cell lines and tumor biopsies. **Cancer Research**. Japão, v. 60, p. 5603–5607, 2000.
- 22 XIE, D.; NAKACHI, K.; WANG, H.; ELASHOFF, R.; KOEFFLER, H. P. Elevated Levels of connective tissue growth factor, WISP-1, and CYR61 in primary breast cancers associated with more advanced features. **Cancer Research**, Japão, n. 61, p. 8917–8923, 2001.
- 23 WANG, H. Y.; CHENGA, Z.; MALBON, C. C. Overexpression of mitogen-activated protein kinase phosphatases MKP1, MKP2 in human breast cancer. **Cancer Letters**. USA. v. xx, p. 229–237, 2002.
- 24 ZUCCARI, D.A.P.C.; SANTANA, A.E.; ROCHA, N.S. Fisiopatologia da neoplasia mamária em cadelas – revisão. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 32, p. 50-54, 2001.

#### FONTE DE FINANCIAMENTO – CAPES

- 1 Aluna de Mestrado em Ciência Animal da Escola de Veterinária/UFG, [marinavet2005@yahoo.com.br](mailto:marinavet2005@yahoo.com.br)
- 2 Aluna do Curso de Doutorado em Ciência Animal da Escola de Veterinária/UFG, Profa. de Patologia Geral IPTSP/UFG, [lhm03@hotmail.com](mailto:lhm03@hotmail.com)
- 3 Professor(a) do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária/UFG, [earaujo@vet.ufg.br](mailto:earaujo@vet.ufg.br)