

**UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO DE TUMORES
NEUROENDÓCRINOS PANCREÁTICOS DE FURÕES
(*Mustela putorius furo*) A PARTIR DA EXPRESSÃO DE
INSULINA, KI-67 E CITOGERATINA 19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista-UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

RENATA SEMIGHINI GASPAR

**São Paulo
2018**

**UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO DE TUMORES
NEUROENDÓCRINOS PANCREÁTICOS DE FURÕES
(*Mustela putorius furo*) A PARTIR DA EXPRESSÃO DE
INSULINA, KI-67 E CITOCERATINA 19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista-UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação do Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

RENATA SEMIGHINI GASPAR

**São Paulo
2018**

Gaspar, Renata Semighini.

Perfil imuno-histoquímico de tumores neuroendócrinos pancreáticos de furões (*Mustela putorius furo*) a partir da expressão de insulina, KI-67 e citokeratina 19 / Renata Semighini Gaspar. - 2018.

25 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Biologia da Diferenciação e Transformação Celular: Modulação por Fatores Endógenos e Exógenos

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

1. pNETs. 2. Furões. 3. CK19. 4. Oncologia. 5. Pancreatopatias. I. Xavier, José Guilherme (orientador). II. Título.

RENATA SEMIGHINI GASPAR

**PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO DE TUMORES
NEUROENDÓCRINOS PANCREÁTICOS DE FURÕES
(*Mustela putorius furo*) A PARTIR DA EXPRESSÃO DE
INSULINA, KI-67 E CITOCERATINA 19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista-UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Universidade Paulista – UNIP

Prof.^a Dr.^a Eliana Reiko Matushima
Universidade de São Paulo- FMVZ- USP

Prof.^a Dr.^a Maria Anete Lallo
Universidade Paulista – UNIP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que sempre me dá sabedoria para enfrentar os desafios diários e vencer todos os obstáculos.

Aos meus avós que foram exemplo de força e determinação! A minha mãe e irmã que sempre me apoiaram e me incentivaram a estudar e me ensinaram a seguir no caminho do bem. Ao meu marido que me apoia nas dificuldades e me ajuda com o cuidado dos nossos filhos, nos períodos de ausência durante essa trajetória. A minha sogra e sogro por ajudar a cuidar dos meus filhos quando precisei me ausentar e aos meus filhos que são o motivo de tanto esforço para poder seguir e enfrentar os novos desafios.

Ao meu orientador Prof.^º Dr.^º José Guilherme Xavier, pela sua dedicação e orientação para tornar possível a conclusão desse trabalho.

A todos os professores que fizeram parte da minha trajetória e contribuíram para o meu desenvolvimento.

Aos amigos e colegas que direta e indiretamente colaboraram com essa jornada e colaboraram para o meu trabalho e o meu desenvolvimento.

A toda equipe administrativa da pós que estão sempre dispostos a nos ajudar e nos orientar sempre que necessário com disposição e agilidade. Meu muito obrigado a todos.

**PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO DE TUMORES NEUROENDÓCRINOS PANCREÁTICOS
DE FURÕES (*Mustela putorius furo*) A PARTIR DA EXPRESSÃO DE INSULINA, KI-67
E CITOQUERATINA 19**

Gaspar R. S^{1*}, Silva L. A. S.¹, Mourão J. M. P.²; Xavier J. G¹

ABSTRACT: Gaspar R.S., Silva L.A.S. Mourão J.M.P., Xavier J. G. 2018.

[Imunohistochemical profile of pancreatic neuroendocrine tumors of ferrets (*Mustela putorius furo*) based on insulin, Ki-67 and cytokeratin 19 expression.]

Investigação imuno-histoquímica de marcadores diagnósticos e prognósticos em tumores neuroendócrinos pancreáticos de furões (*Mustela putorius furo*). Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista, Avenida José Maria Whitaker 290, Vila Clementino, São Paulo, 04057-000, Brasil. E-mail: xavier2126@gmail.com

Neuroendocrine tumors of the pancreas (pNETs) constitute a heterogeneous group of neoplasms derived from cells of the neuroendocrine system with low incidence in the human species and are still not fully understood. There is a strong interest in the identification of animal models for the study of this condition. Gonadectomized ferrets develop endocrine tumors frequently, including pNETs, with an estimated incidence of 21 to 25% of neoplasms diagnosed in the species. In order to increase the knowledge about these conditions in ferrets and to draw a parallel with the pNETs in humans, in this project we investigated the expression of insulin, Ki-67 and keratin 19 in neuroendocrine adenomas and carcinomas using an immunohistochemical method in the pancreas of ferrets, seeking information about their histogenesis, proliferative activity and evolution. In total 9 pancreatic tumors were evaluated, from 5 males and 4 females, with the predominance of animals between 4 and 5 years of age, comprising 3 adenomas and 6 carcinomas. All of them exhibited insulin positivity, suggesting their derivation of islet beta cells, corroborating the frequent designation of insulinomas, and tumor functionality, responsible for the clinical signs presented by the pNETs, differing from the usual silent tumors present in humans, in which they predominate the afunctrional tumors. In contrast to that observed in human pNETs, in which proliferative activity is the central parameter for the distinction between adenomas and carcinomas, there was no significant difference in proliferative activity in the pNETs of sampled ferrets. In addition, in these neoplastic cells did not express keratin 19, the

immunopositivity being restricted to the glandular ductal component. In this sense, the usual preservation of the endocrine activity present in the mustelid lesion associated with low proliferative activity and negativity for keratin 19 may be related to a more indolent tumor profile, since the expression of keratin 19 in pNETs in humans is reported in more aggressive tumors.

INDEX TERMS: pNETs, ferrets, CK19, oncology, pancreatopathies.

¹ Recebido em _____

Aceito para publicação em _____

¹ Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista, Avenida José Maria Whitaker, 290, Vila Clementino, São Paulo, 04057-000, Brasil. Autor para correspondência: xavier2126@gmail.com

² Clínico veterinário autônomo.

RESUMO. Os tumores neuroendócrinos do pâncreas (pNETs), constituem um grupo heterogêneo de neoplasias derivadas de células do sistema neuroendócrino que apresentam baixa incidência na espécie humana e ainda parcialmente compreendidos, sendo de interesse a identificação de modelos animais para o estudo dessa condição. Furões gonadectomizados desenvolvem tumores endócrinos com frequência, dentre eles os pNETs, com incidência estimada de 21 a 25% das neoplasias diagnosticadas na espécie. No sentido de incrementar o conhecimento acerca dessas condições em furões e traçar um paralelo com os pNETs em humanos, nesse projeto investigou-se, com o emprego de método imuno-histoquímica, a expressão de insulina Ki-67 e ceratina 19 em adenomas e carcinomas neuroendócrinos pancreáticos de furões, buscando informações acerca de sua histogênese, atividade proliferativa e evolução. No total, foram avaliadas 9 formações pancreáticas, provenientes de 5 machos e 4 fêmeas, com o predomínio de animais entre 4 e 5 anos de idade, compreendendo 3 adenomas e 6 carcinomas. Todas exibiram positividade para insulina, sugerindo sua derivação de células beta das ilhotas, corroborando a frequente designação de insulinoma, e a funcionalidade tumoral, responsável pelos sinais clínicos apresentados pelos animais portadores de pNETs, diferindo do usual quadro silencioso presente em humanos, nos quais predominam os tumores assintomáticos. Ao contrário do observado em pNETs humanos, nos quais a atividade proliferativa é o parâmetro central para a distinção entre adenomas e carcinomas, não houve diferença significante quanto à atividade proliferativa nos pNETs de furões amostrados. Em complemento, nestes, as células neoplásicas não expressaram ceratina 19, ficando a imunopositividade restrita ao componente ductal glandular. Nesse sentido, a usual preservação da atividade endócrina presente na lesão dos mustelídeos associada à baixa atividade proliferativa e negatividade para a ceratina 19 pode estar relacionada a um perfil tumoral mais indolente, visto que a expressão de ceratina 19 em pNETs em humanos é referida em tumores mais agressivos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: pNETs, furões, CK19, oncologia, pancreatopatias.

INTRODUÇÃO

Tumor neuroendócrino é um termo tradicional que designa um amplo grupo de condições neoplásicas originárias de estruturas neurais e endócrinas. A localização dessas formações é bastante variada, podendo envolver plexos nervosos, paragânglios, órgãos endócrinos, ou estruturas constituintes do chamado sistema endócrinos difuso, como as ilhotas pancreáticas (Rindi & Wiedenmann, 2012). Estes particularmente são denominados tumores neuroendócrinos pancreáticos (pNETs).

Em humanos, os pNETs constituem um grupo de neoplasias raras, com uma incidência de 0,43 por 100.000 (Fraenkel et al., 2012), mas com uma taxa de incidência crescente nos últimos 20-30 anos (Ehrhart et al., 1996; Caplan et al., 1996). Estudos em humanos, a partir de necropsias revelaram uma prevalência de pNETs entre 0,8% a 10%, sugerindo que a grande maioria deles é clinicamente silenciosa (Lurye & Behrend, 2001; Quesenberry & Carpenter, 2012). Nesse sentido, é necessária a ampliação do conhecimento acerca dessa condição. Considerando sua raridade em humanos, é de interesse a identificação de modelos biológicos que permitam uma melhor compreensão do processo neoplásico.

Embora tenham sido desenvolvidos modelos murinos, com a indução do processo neoplásico, um potencial modelo natural da condição é representado pelos furões, que, uma vez gonadectomizados, desenvolvem com frequência pNETs. O furão (*Mustela putorius furo*) é carnívoro, pertence à família *Mustelidae*, tendo sido domesticado há mais de 2000 anos na Europa, auxiliando na caça de coelhos, devido ao seu tamanho e estrutura corporal (Martin et al. 2007). Vivem em média entre 5 a 6 anos. Devido ao aumento da sua popularidade como animal doméstico, o conhecimento sobre a espécie, seus hábitos e doenças têm se desenvolvido.

Merece destaque a relevância de processos neoplásicos na espécie, sendo entre 40% e 53% dos tumores diagnosticados de origem endócrina (Fox et al., 2000; Antinoff & Hahn, 2004). Os pNETs, frequentemente referidos como insulinoma, compreendem entre 21% e 25% do total de neoplasias diagnosticadas (Li; Fox; Padrid, 1998; Williams & Weiss, 2004). Surgem a partir de células precursoras pluripotentes no sistema pancreático ductal/acinar (Weiss; Williams; Scott, 1998), podendo apresentar atividade funcional vinculada a qualquer dos componentes das ilhotas pancreáticas. Estas são constituídas por quatro tipos de células, secretoras de peptídeos específicos: células α /

glucagon; células β /insulina; células δ /somatostatina; células P/polipeptídio pancreático (Quesenberry & Carpenter, 2012). Segundo a literatura, predominam os tumores de células β , produtoras de insulina, sendo em geral funcionantes, com variantes benignas, adenomas, e malignas, carcinomas (Li; Fox; Padrid, 1998; Williams & Weiss, 2004).

Existe controvérsia na literatura, em especial referente à lesão na espécie humana, acerca da adequação da avaliação histopatológica na distinção entre lesões benignas e malignas de pâncreas endócrino, e a variação morfológica nessas formações nem sempre implica em diferenças em seu comportamento biológico (Caywood et al., 1988). O paralelismo de comportamentos também pode reforçar um potencial modelo biológico para o estudo de neoplasias de pâncreas em humanos (Antinoff & Hahn 2004). Ressalta-se ainda a maior demanda por informações acerca de furões frente à sua crescente adoção como animal de companhia.

Com esse enfoque, neste estudo visou-se, com o emprego de método imuno-histoquímico para caracterizar a histogênese dos pNETs em furões, bem como avaliar sua atividade proliferativa e a expressão de ceratina 19 (CK19), um indicador prognóstico relevante em pNETs na espécie humana.

MATERIAL E MÉTODOS

A coleta das neoplasias foi realizada durante procedimentos cirúrgicos com fins diagnósticos e terapêuticos, dentro das normas preconizadas para o procedimento, tendo sido o projeto aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Paulista, sob o protocolo 070/18.

Animais

Foram avaliadas formações nodulares provenientes de tumores neuroendócrinos pancreáticos em furões (*Mustella putorius furo*), de ambos os sexos, provenientes do laboratório Rous Patologia Animal.

Preservação e processamento da amostra para a avaliação histológica

As amostras pancreáticas provenientes de exérese cirúrgica de neoplasias em furões sintomáticos foram imediatamente imersas em solução de formol a 10%, procedendo-se após a fixação por até 48h. A neoplasia foi avaliada macroscopicamente e fragmentos representativos submetidos à emblocagem em parafina, seguindo-se a realização de cortes de aproximadamente 5 μ m., em micrótomo, e coloração pelo método de hematoxilina-eosina.

Classificação histopatológica

A caracterização histopatológica e classificação das neoplasias seguiram parâmetros morfológicos descritos por Capen, 2002.

Imuno-histoquímica

Para a execução das imunomarcações (quadro 1), foram realizados cortes histológicos de 5 μ m., dispostos em lâminas silanizadas, passando por desparafinização, recuperação antigênica pelo calor em panela de pressão, bloqueio da peroxidase endógena, seguindo-se incubação com os anticorpos primários, incubação com anticorpo secundário (MATCH1 Probe) e complexo peroxidase (MATCH1 Polymer) e posterior revelação com a diaminobenzidina. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Harris, seguindo-se a montagem das lâminas.

Quadro 1. Painel de marcadores imuno-histoquímicos

anticorpo	natureza	origem	reatividade	clone	fabricante
insulina	policlonal	cobaia	anti-humano	IS002	Dako
Ki-67	monoclonal	camundongo	anti-humano	MIB-1	Biocare Medical
CK19	monoclonal	camundongo	anti-humano	Ks19.1	Biocare Medical

Avaliação da expressão de insulina

A expressão de insulina foi identificada a partir da presença de reatividade citoplasmática nas células neoplásicas, granular ou difusa.

Quantificação da expressão de Ki-67

A quantificação da imunomarcação foi realizada de duas formas: considerando-se a contagem de células neoplásicas positivas em 10 campos de grande aumento (CGA) e a partir da contagem de 500 células tumorais em sítios com elevada imunopositividade (“hot spots”).

Avaliação da expressão da CK19

Para a avaliação da expressão de CK19 foi estabelecido o emprego de método qualitativo e semiquantitativo (Sampaio-Góes et al., 2005; Soini et al., 2001), em 10 campos, com objetiva de 40X. Os campos selecionados para a análise foram os de maior intensidade e/ou porcentagem de células marcadas (“hot spots”), distantes das margens do corte histológico, de modo a evitar marcações inespecíficas/artefatuais.

Para determinação qualitativa (intensidade de coloração), preconizou-se o agrupamento dos tumores em 5 grupos: 0 = marcação ausente; 1 = mínima; 2 = leve; 3 = moderada; 4 = intensa.

Para a avaliação quantitativa, foi considerada porcentagem de área apresentando imunoreatividade, expressa da seguinte forma: 0 = marcação ausente; 1 = <25% da área apresentando positividade; 2 = 25-50% da área apresentando positividade; 3 = 50-75% de área apresentando positividade; 4 = >75% da área apresentando positividade.

Em sequência, as pontuações das avaliações qualitativa e quantitativa foram somadas, resultando nos seguintes escores: 0 = marcação ausente; 1 = imunoreatividade fraca (soma de escalas de 1 a 4); 2 = imunoreatividade intensa (soma de escalas de 5 a 8).

Avaliação estatística

Para a comparação entre a imunoexpressão e a classificação histopatológica, foi selecionado o teste t de Student, com P<0,05 considerado estatisticamente significante.

RESULTADOS

Os casos avaliados foram provenientes de clínica veterinária particular e arquivados no laboratório Rous Patologia Animal. No total, foram resgatados 9 casos de lesões neoplásicas de pâncreas endócrino, sendo revistos e classificados, resultando nas amostras incluídas no quadro 2.

Quadro 2. Casos de tumor neuroendócrino pancreático nos furões, correlacionando-se gênero, idade e diagnóstico.

Animais	Gênero	Idade (anos)	Diagnóstico
1	macho	4	carcinoma
2	fêmea	4	adenoma
3	macho	4	carcinoma
4	fêmea	3	carcinoma
5	fêmea	6	carcinoma
6	macho	6	carcinoma
7	macho	5	adenoma
8	fêmea	5	adenoma
9	macho	5	carcinoma

Dessas formações, destacou-se o equilíbrio no que se refere ao gênero dos animais, sendo 5 machos e 4 fêmeas. Nos machos predominaram os processos malignos, totalizando 4, frente a 1 lesão benigna. Já as fêmeas exibiram 2 lesões benignas e 2 malignas. Com a exceção de um caso em cada extremo, 3 e 6 anos de idade, os demais casos distribuíram-se entre animais de 4 e 5 anos. No total, foram diagnosticados histopatologicamente 3 adenomas e 6 carcinomas, tendo como critério central de distinção, entre eles a delimitação por cápsula e infiltração de pâncreas exócrino.

A avaliação histopatológica revelou expansões nodulares de células poliédricas ou ovaladas dispostas em ninhos ou cordões associados a discreto estroma reticular e fina rede vascular. O núcleo exibiu cromatina frouxa, sendo o citoplasma fracamente

acidófilo com eventual vacuolização e de limites indistintos. As figuras de mitose foram raras (figura 1). A principal diferença entre os processos benignos e malignos foi a presença de cápsula nos primeiros e invasão do parênquima exócrino pancreático nos últimos (figura 2).

Fig. 1

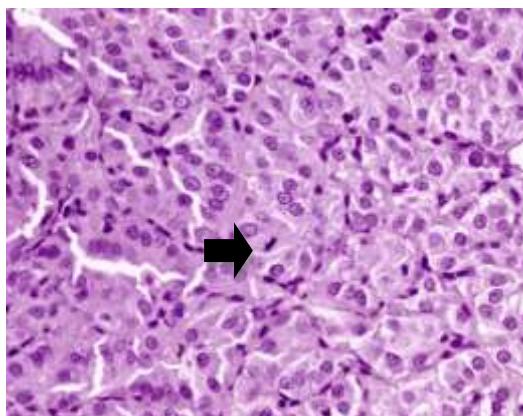


Fig. 2

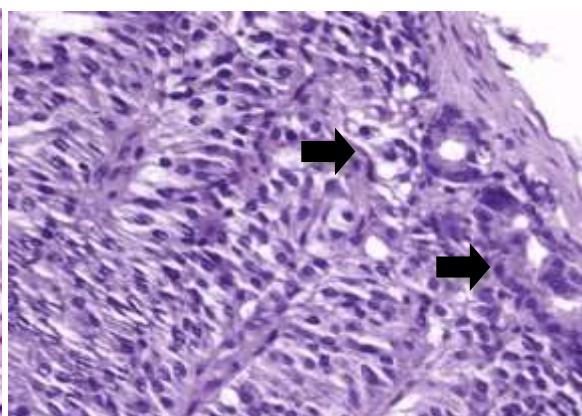


Figura 1. Fotomicrografia de corte histológico de carcinoma de ilhotas pancreáticas, evidenciando figura de mitose em meio às células neoplásicas (seta), Hematoxilina-eosina, 40x.

Figura 2. Fotomicrografia de corte histológico de carcinoma de ilhotas, evidenciando blocos de células neoplásicas invadindo parênquima exócrino (setas), Hematoxilina-eosina, 40x.

O procedimento imuno-histoquímico foi empregado como ferramenta para a caracterização histogênica tumoral, além de informar sobre sua atividade proliferativa e a expressão de um filamento intermediário, a CK19, com potencial prognóstico.

A imunoexpressão citoplasmática de insulina foi identificada, em intensidade variável, em todas as lesões, benignas (figura 3) e malignas (figura 4).

Fig.3

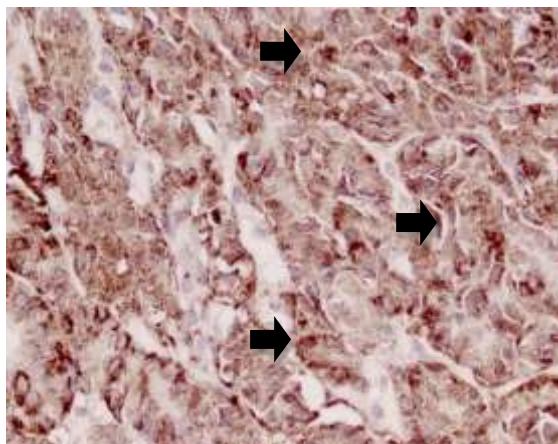


Fig. 4

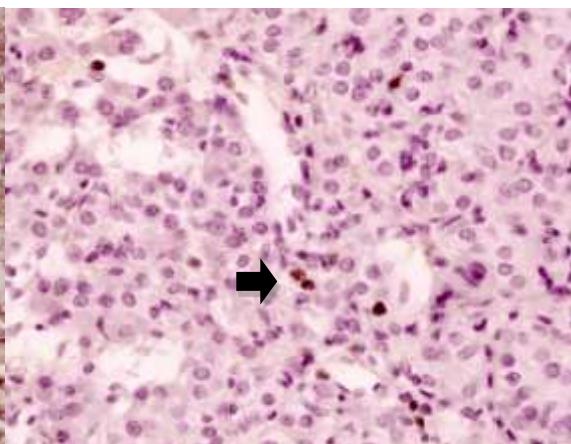


Figura 3. Fotomicrografia de corte histológico de adenoma de ilhotas, evidenciando imunopositividade citoplasmática para a insulina em células neoplásicas (setas), DAB, 40x.

Figura 4. Fotomicrografia de corte histológico de carcinoma de ilhotas, evidenciando imunopositividade nuclear para Ki-67 em células neoplásicas (seta), DAB, 40x.

A avaliação da atividade proliferativa foi realizada com o emprego do Ki-67 (figura 4), sendo que das 9 amostras submetidas à reação, 8 foram coradas, sendo 6 carcinomas e 2 adenomas. A imunomarcação foi quantificada por 2 métodos, a contagem de células positivas em 10 campos de grande aumento (CGA) e a quantificação da expressão em 500 células neoplásicas, considerando-se territórios de elevada positividade (“hot spots”). Com o primeiro procedimento, evidenciou-se, respectivamente, em adenomas e carcinomas, média e desvio padrão de 33 ± 3 e $30 \pm 6,4$, não havendo diferença estatisticamente significante entre os processos, com $p < 0,05$. Em paralelo, avaliando-se a imunopositividade em grupos de 500 células neoplásicas, observou-se, respectivamente, em adenomas e carcinomas, 12 ± 4 e $10 \pm 1,9$, não havendo diferença estatisticamente significante entre os processos, com $p < 0,05$ (figura 5).

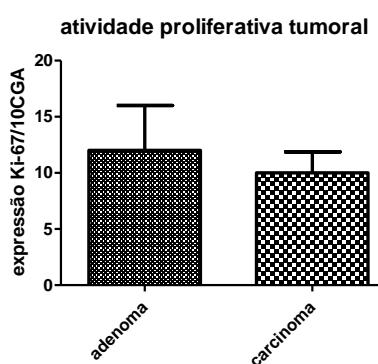
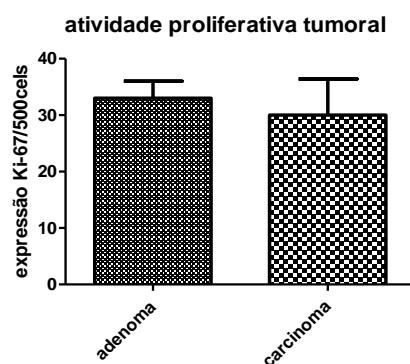
A**B**

Figura 5. Gráficos apresentam a imunopositividade ao Ki-67 em adenomas e carcinomas de pâncreas endócrino; A mensurada pela contagem de 10 campos de grande aumento (CGA) e B por 500 células por formação, teste T de Student, não-pareado $p<0,05$.

A imunoexpressão de CK19 foi pesquisada empregando-se amostras-controle, provenientes de cortes de tireoide e cólon e controles internos, representados por componentes ductais exócrinos, revelando forte positividade citoplasmática (figura 6). Em contrapartida, nas lesões neoplásicas de pâncreas endócrino, tanto benignas quanto malignas, não foi identificada imunomarcação. Assim, a expressão da CK19 limitou-se a células epiteliais dos ductos, não sendo pertinente o emprego da avaliação quantitativa e estatística previamente propostas.

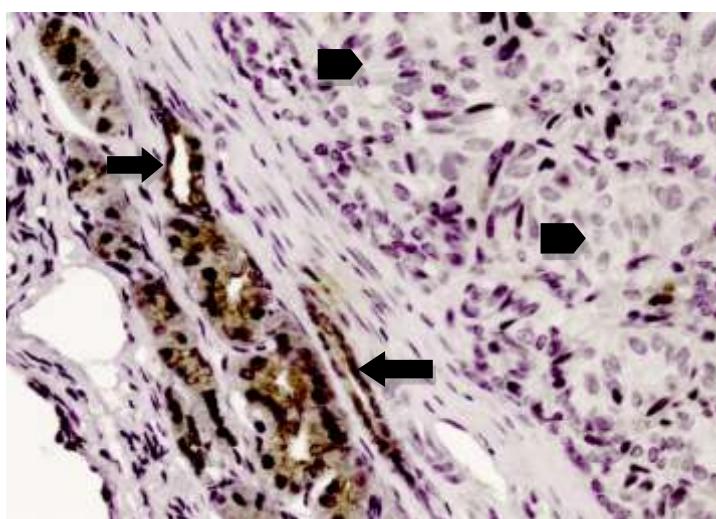


Figura 6. Fotomicrografia de corte histológico de adenoma de ilhotas evidenciando imunopositividade citoplasmática para a ceratina 19 (CK19) restrita a estruturas ductais de parênquima exócrino (seta), em paralelo à ausência de expressão em células neoplásicas (ponta de seta) DAB, 40x.

DISCUSSÃO

Em contraste com a elevada incidência observada em furões, o pNET é uma condição rara em seres humanos, sendo responsável apenas por 1 a 2% de todos os tumores pancreáticos (Oberg & Eriksson, 2005). Como consequência, vários aspectos dessa condição em humanos são incompletamente compreendidos, propondo-se uma investigação acerca da biologia dos pNETs em furões como um potencial modelo de estudo para a condição humana.

Além das afinidades morfológicas, aspectos funcionais entre a condição nas diferentes espécies podem ser pareados. O insulinoma em furões usualmente começa a se manifestar com sinais clínicos a partir dos 4 aos 6 anos de idade, embora já tenha sido reportado caso com início sintomático desde as 2 semanas de vida do animal (Chen, 2010). Os achados clínicos descritos em literatura, convergem com a faixa etária da nossa amostragem, que se concentrou entre os 4 e 6 anos de idade. A ocorrência de predisposição de gênero para essas neoplasias é controversa, sendo sugerida uma incidência crescente em machos (Caplan et al., 1996). Em nosso estudo, constatou-se uma ocorrência maior em machos com o predomínio da variante maligna, apesar do pequeno número de animais.

Considerando-se a avaliação macroscópica das amostras, não foi identificada nenhuma característica que sugerisse uma distinção entre condições benignas e malignas. Histopatologicamente, o adenoma é delimitado de seu parênquima adjacente por uma cápsula fibrosa e íntegra; as células bem diferenciadas possuem formato cuboidal até prismático, com citoplasma fracamente acidofílico, por vezes, de aspecto granular. Os carcinomas podem ser multilobulados, com a presença de focos invasivos no parênquima adjacente. As células carcinomatosas tendem a maior heterogeneidade morfológica, com variações de formato e tamanho, quando comparadas ao observado em adenomas. Porém, para ambas as condições, as figuras de mitose são infrequentes. Nesse sentido, o principal critério para a extinção entre as condições relaciona-se à sua delimitação por cápsula fibrosa (Capen, 2002).

Na lesão humana, a classificação morfológica não se vincula a um comportamento biológico particular, levando à busca por um critério classificatório alternativo que guardasse relação com a evolução tumoral. A quantificação da atividade proliferativa celular atendeu a essa necessidade e passou a ser empregada como

parâmetro para a distinção entre processos benignos e malignos, a partir de cortes marcados pelo Ki-67 (Kloppel et al., 2017). Na literatura, os métodos de quantificação da imunomarcação pelo Ki-67 são variados, destacando-se a contagem da imunopositividade nuclear em 10 campos de grande aumento (Tracht et al., 2017) e a mensuração a partir de 500 células tumorais (Campos et al., 2014).

Richards-Taylor et al. (2017) referem grande heterogeneidade microambiental em pNETs na espécie humana com consequente diversidade proliferativa entre microterritórios. Nesse sentido, teria maior relevância biológica o método no qual pudesse ser selecionada a área a ser mensurada. Como atenuante, no modelo de furões, é observada uma relativa homogeneidade fenotípica ao longo da formação neoplásica. Em complemento, os pNETs em furões podem apresentar pequenas dimensões, com consequente limitação do número de campos microscópicos disponíveis para quantificação, inviabilizando eventualmente o exame de 10 CGA.

Essa foi a maior limitação em nossas amostras, sugerindo maior adequação da quantificação a partir da contagem de 500 células tumorais em “hot spots”. Independentemente do método utilizado, não houve diferença estatisticamente significante na atividade proliferativa entre lesões benignas e malignas de furões. A amostragem limitada, particularmente em lesões benignas, também restringe as conclusões, sendo importante um aumento do número de lesões avaliadas para uma adequada comparação entre as condições. Além disso, uma abordagem complementar importante seria vinculada à observação de comportamento biológico da condição, com o tempo livre de doença e o tempo de sobrevida dos animais, visto que a classificação morfológica encerra certo grau de imprecisão. Nesse sentido, Minkus et al. (1997) evidenciaram uma tendência a maior expressão de Ki-67 em colônias tumorais metastáticas, porém sem diferença estatisticamente significante. Em cães pNETS com elevada expressão de Ki-67 exibiram comportamento biológico mais agressivo (Buishand et al., 2010). A pesquisa da expressão de Ki-67 neste estudo cumpriu a função de parear a condição do furão à humana, não tendo sido identificada analogia entre elas, mesmo que considerada a restrita amostragem de lesões benignas. Esta se deve à baixa frequência de adenomas em relação aos carcinomas de pâncreas endócrino (Ehrhart et al., 1996) e ao fato de 1 das amostras de adenomas não ter apresentado imunomarcação, limitando a comparação entre tumores pNETs benignos e malignos.

Nos furões, diferentemente dos cães e gatos, os pNETs apresentam baixo potencial metastático (Rosenthal & Wyre, 2012). Apesar da pluralidade de tipos celulares e de potenciais produtos secretórios, é relatado amplo predomínio de insulinomas nos pNETs (Andrews et al., 1997). Assim, em muitos casos, a morte se dá pela frequente debilitação do animal associada a sinais decorrentes da produção de insulina, considerando-se que na maioria dos casos os tumores são hormonalmente ativos (Caplan et al., 1996). Os sinais clínicos mais comuns podem ser observados de maneira aguda ou crônica, destacando-se letargia, fraqueza, ptialismo e perda de peso (Quesenberry; Carpenter, 2012). Em nossa amostragem, esses achados foram corroborados, sendo identificada importante imunopositividade para a insulina em todas as amostras, benigna e maligna.

Além da classificação histológica, permitindo a distinção entre lesões benignas e malignas, indicadores adicionais com características prognósticas têm sido investigados, merecendo referência à pesquisa da expressão da CK19 em pNETs humanos. A CK19 faz parte de um dos 20 membros das famílias das ceratinas. Sabe-se que no estágio embrionário é uma molécula fortemente expressa e gradualmente ocorre a perda de sua expressão nas ilhotas pancreáticas mantendo-se, ainda, nas células epiteliais ductais (Piper et al., 2004; Bouwens et al., 1997). Sua imunopositividade foi associada a maior agressividade biológica, com presença de metástases nodais em pacientes com estadiamento TNM avançado, em geral evidenciada em tumores não funcionais (Xu et al., 2013). Também sua expressão está relacionada à invasão perineural e linfovascular e a um menor tempo de sobrevida do paciente (Ali et al., 2006; Schmitt et al., 2007). Em estudo recente, foi caracterizado nos casos com ausência de expressão da CK19 um tempo de sobrevida médio de 5 anos, enquanto que em pacientes com tumores imunopositivos para CK19, apenas 47% dos pacientes sobreviveram até 5 anos (Jain, et al., 2010).

Os tumores produtores de insulina tendem a ser mais indolentes, propondo-se uma possível associação com comportamento biológico e a baixa expressão de CK19 nessas neoformações (Jain et al., 2010). A ausência de expressão da CK19 em nossas amostras, inicialmente, sugere uma divergência biológica importante entre essas lesões e as análogas humanas. No entanto, ela pode estar condicionada à frequente presença, ao contrário do identificado em humanos, de atividade endócrina nos pNETs em furões, associada ao clássico quadro hipoglicêmico nos animais acometidos (Capen & Martin,

1969). Corroborando tal fato, em estudo anterior e em nossa amostragem, foi identificado, com o emprego de método imuno-histoquímico, o amplo predomínio de imunoexpressão de insulina nas células tumorais em pNETs de furões (Andrews et al., 1997). Acredita-se que a aquisição da positividade para CK19 pelas células neuroendócrinas pancreáticas neoplásicas seja um indicador de anaplasia, indicando um comportamento biológico mais agressivo (Ali et al., 2006). Cumpre-nos ressaltar que a imunopositividade para CK19 é preservada na célula epitelial ductal madura.

Uma compreensão possível seria a de admitir a incapacidade da distinção entre a natureza biológica dessas formações a partir da classificação histológica. Analogamente ao que ocorre em humanos, há o predomínio, em furões, de pNETs de baixo grau de agressividade, caracterizados quase que indistintamente por população de células bem diferenciadas, apresentando homogeneidade arquitetural e baixo grau de anaplasia, com reduzida atividade proliferativa e frequente atividade funcional. Isso faz perder a expressão de marcadores embrionários, conforme o identificado em tumores neuroendócrinos pancreáticos bem diferenciados (panNETs) na espécie humana (Kloppel et al., 2017). O acompanhamento da evolução dessas lesões em furões, em particular de seu potencial de disseminação, seria uma estratégia importante para esclarecer essa possibilidade.

CONCLUSÕES

Os tumores neuroendócrinos pancreáticos de furões apresentam perfil biológico caracterizado pelo predomínio de lesões funcionantes, vinculadas à expressão de insulina, com baixa atividade proliferativa e ausência de imunopositividade para CK19, apresentando diferenças consistentes em relação ao observado em tumores neuroendócrinos pancreáticos humanos.

REFERÊNCIAS

- Ali, A.; Serra, S.; Asa, S. L. & Chetty, R. 2006. The predictive value of CK19 and CD99 in pancreatic endocrine tumors. Am. J. Surg. Pathol., 30: 1588-94.
- Andrews, G. A.; Myers, N. C. & Chard-Bergstrom, C. 1997. Immunohistochemistry of pancreatic islet cell tumors in the ferret (*Mustela putorius furo*). Pathol. Vet., 34: 387-393.
- Antinoff, N. & Hahn, K. 2004. Ferret oncology: diseases, diagnostics and therapeutics. Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract., 7: 579-625.
- Bouwens, L.; Lu, W.G. & De Krijger, R. 1997. Proliferation and differentiation in the human fetal endocrine pancreas. Diabetologia, 40: 398-404.
- Buishand, F. O.; Kik, M. & Kirpensteijn, J. 2010. Evaluation of clinic-pathological criteria and the Ki-67 index as prognostic indicators in canine insulinoma. Vet. J., 185: 62-67.
- Campos, M.; Ducatelle, R.; Rutteman, G.; Kooistra, H. S.; Duchateau, L.; de Rooster, H.; Peremans, K. & Daminet, S., 2014. Clinical, pathologic, and immunohistochemical prognostic factors in dogs with thyroid carcinoma. J. Vet. Intern. Med., 28: 1805-1813.
- Capen, C. C. & Martin, S. L. 1969. Hyperinsulinism in dogs with neoplasia of the pancreatic islets. A clinical, pathologic, and ultrastructural study. Pathol. Vet., 6: 309-341.
- Capen, C. C., 2002. Tumors of the endocrine glands. In: Meuten D.J.; Tumors in domestic animals, 4th ed., Iowa State Press. p 607-696.
- Caplan, E. R.; Peterson, M. E.; Mullen, H. S.; Quesenberry, K. E.; Rosenthal, K. L.; Hoefer, H. L. & Moroff, S. D. 1996. Diagnosis and treatment of insulin secreting pancreatic islet cell tumors in ferrets: 57 cases (1986-1994). J. Am. Vet. Med. Assoc, 209: 1741-1745.
- Caywood, D. D.; Klausner, J. S.; O'Leary, T. P.; Withrow, S. J.; Richardson, R. C.; Harvey, H. J.; Norris, A. M.; Henderson, R. A. & Johnston, S. D. 1988. Pancreatic insulin-secreting neoplasms: clinical, diagnostic and prognostic features in 73 dogs. J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 24: 577-84.

- Chen, S. 2010. Advanced diagnostic approaches and current medical management of insulinoma and adrenocortical diseases in ferrets (*Mustela putorius furo*). *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.*, 13: 439-452.
- Ehrhart N.; Withrow, S. J.; Ehrhart, E. J. & Wimsatt, J. H. 1996. Pancreatic beta cell tumor in ferrets: 20 cases (1986-1994). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 209: 1737– 1740.
- Fox, J. G.; Dangler, C. A.; Snyder, S. B.; Rochard, M. J. & Thilsted, J. P. 2000. C-cell Carcinoma (medullary thyroid carcinoma) associated with multiple endocrine neoplasms in a ferret (*Mustela putorius*). *Pathol. Vet.*, 37: 287-282.
- Fraenkel, M.; Kim, M. K.; Faggiano, A. & Valk, G. D. 2012. Epidemiology of Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 26: 691-703.
- Jain, D.; Fischer, S.; Serra, S. & Chetty, R. 2010. The use of cytokeratin 19 (CK19) Immunohistochemistry in lesions of the pancreas, gastrointestinal tract, and liver. *Appl. Immunohistochem Mol Morphol.*, 18:9-15.
- Kloppel, G.; Rosai, J.; Liroyd, R.V. & Osamura, R.Y. 2017. Tumours of the endocrine pancreas. In: Lloyd, R. V. et. (Eds). Who Classification of the Tumours of Endocrine Organs. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, p.175-207.
- Li, X.; Fox, J. G. & Padrid, P. A. 1998. Neoplastic diseases in ferrets: 574 cases (1968-1997). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 212: 1402-1406.
- Li, X & Fox, J.G. 1998. Neoplastic diseases, In: Fox, J.G. *Biology and Diseases of the Ferret*, 2nd ed. London. Blackwell Publishing, p 405-448.
- Lurye, J. C. & Behrend E. N. 2001. Endocrine tumors. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 33: 083-110.
- Martin A.; Irizarry-Rovira A.; Bevier D.; Glickman L. & Hullinger R. 2007. Histology of ferret skin: preweaning to adulthood. *Vet. Derm.*, 18: 401 -411.
- Minkus, G.; Breuer, W.; Arun, S.; Kirsch, M.; Müller, D.; Mueller, J. & Hermanns, W. 1997. Ductuloendocrine cell proliferation in the pancreas of two young dogs with diabetes mellitus. *Pathol. Vet.*, Washington, 34: 164-167.
- Oberg, K. & Eriksson, B. 2005. Endocrine tumours of the pancreas. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 19: 753-81.

- Piper, K.; Brickwood, S.; Turnpenny, L. W.; Cameron, I. T.; Ball, S. G.; Wilson, D. I. & Hanley, N. A. 2004. Beta cell differentiation during early human pancreas development. *J. Endocrinol.*, 181:11-23.
- Quesenberry, K. E & Carpenter, J. W. 2012. Ferrets, Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery. 3 ed. Philadelphia: Elsevier. p. 587-600.
- Richards-Taylor, S.; Tilley, C.; Jaynes, E.; Hu, H.; Armstrong, T.; Pearce, N. W.; Plant, R. & Cave, J. 2017. Clinically significant differences in Ki-67 proliferation index between primary and metastases in resected pancreatic neuroendocrine tumors. *Pancreas J.*, 46: 1354-1358.
- Rosenthal, K. L. & Wyre, N. R. 2012. Ferrets, rabbits and rodents: Clinical medicine and surgery. In: Quesenberry K. E.; Carpenter, J. W. (Eds.). *Endocrine diseases* 3rd ed. St. Louis, Missouri: Saunders. p.86-102.
- Sampaio-Góes, F. C.; Oliveira, D. T.; Dorta, R. G.; Nonogaki, S.; Landman, G.; Nishimoto; I. N. & Kowalski, L. P. 2005. Expression of PCNA, P53, *BAX*, And *BCL-X* in oral poorly differentiated and basaloid squamous cell carcinoma: relationships with prognosis. *Head and Neck*, 27:982-89.
- Schmitt, A. M.; Anlauf, M.; Rousson, V.; Schmid, S.; Kofler, A.; Riniker, F.; Bauersfeld, J.; Barghorn, A.; Probst-Hensch, N. M.; Moch, H.; Heitz; P. U.; Kloepfel, G.; Komminoth, P. & Perren, A. 2007. WHO 2004 criteria and CK19 are reliable prognostic markers in pancreatic endocrine tumors. *J. Surg. Pathol.*, 31: 1677-82.
- Soini, Y.; Puhakka, A.; Kahlos, K.; Säily, M.; Pääkkö, P.; Koistinen, P. & Kinnula, V. 2001. Endothelial nitric oxide synthase is strongly expressed in malignant mesothelioma but does not associate with vascular density or the expression of VEGF, FLK1 Or FLT1. *Histopathology*, 39:179-86.
- Tracht J.; Zhang, K. & Peker, D. 2017. Grading and prognostication of Neuroendocrine tumors of the pancreas: a comparison study of Ki67 and PHH3. *J. Histochem. Cytochem.*, 65: 399-405.
- Weiss, C. A., Williams, B. H. & Scott, M. V. 1998. Insulinoma in the ferret: clinical findings and treatment comparison of 66 cases. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 34:471-475.

- Williams, B. H. & Weiss, C. A. 2004. Ferrets, rabbits and rodents: Clinical medicine and surgery. In: Quesenberry K. E.; Carpenter J. W. (Eds.). *Ferret Neoplasia*. 2. ed. St. Louis, Missouri: Saunders. p.91-106.
- Xu, H.; Zhao, J.; Ji, Y.; Xu, X. & Lou, W. 2013. Expression of CK19 and Kit in resectable pancreatic neuroendocrine. *Intern. Soc. BioMarkers (ISOBM)*, 34:2881-2889.