

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL

**CONTRIBUIÇÃO DA IMUNO-HISTOQUÍMICA NA
CARACTERIZAÇÃO HISTOGÊNICA E PROGNÓSTICO DE
CONDROSSARCOMA NASAL E CARCINOMA GÁSTRICO
DE CÉLULAS EM ANEL DE SINETE EM CÃES**

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.

CAMILA SABAUDO ALVES

SÃO PAULO
2017

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL

**CONTRIBUIÇÃO DA IMUNO-HISTOQUÍMICA NA
CARACTERIZAÇÃO HISTOGÊNICA E PROGNÓSTICO DE
CONDROSSARCOMA NASAL E CARCINOMA GÁSTRICO
DE CÉLULAS EM ANEL DE SINETE EM CÃES**

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.

CAMILA SABAUDO ALVES

SÃO PAULO
2017

Alves, Camila Sabaudo.

Contribuição da imuno-histoquímica na caracterização histogênica e prognóstico de condrossarcoma nasal e carcinoma gástrico de células em anel de sinete em cães. / Camila Sabaudo Alves. – 2017.

53 f. : il. color.

Tese de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2017.

Área de concentração: Biologia da diferenciação e transformação celular.

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

1. Cães. 2. Imuno-histoquímica. 3. Oncologia . 4. Patologia veterinária. I. Xavier, José Guilherme (orientador). II. Título.

CAMILA SABAUDO ALVES

**CONTRIBUIÇÃO DA IMUNO-HISTOQUÍMICA NA
CARACTERIZAÇÃO HISTOGÊNICA E PROGNÓSTICO DE
CONDROSSARCOMA NASAL E CARCINOMA GÁSTRICO
DE CÉLULAS EM ANEL DE SINETE EM CÃES**

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.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Universidade Paulista – UNIP

Prof. Dra. Renata Avancini Fernandes
Universidade Paulista – UNIP

Prof. Dra. Beatriz de Bem Kerr Martins
Universidade São Judas Tadeu – USJT

ALVES. Camila Sabaudó. **Contribuição da imuno-histoquímica na caracterização histogênica e prognóstico de condrossarcoma nasal e carcinoma gástrico de células em anel de sinete em cães.** 2017. 53f. Qualificação de Mestrado em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista- UNIP. São Paulo, 2017.

RESUMO

O número crescente de processos oncológicos em cães tem determinado uma progressiva demanda por métodos diagnósticos mais acurados, objetivando a rápida e adequada caracterização da doença, permitindo a seleção do protocolo terapêutico mais adequado. Nesse sentido, a imuno-histoquímica apresenta-se como uma ferramenta potencialmente relevante. Neste estudo são relatados aspectos clínico-patológicos e imuno-histoquímicos de dois casos de lesões neoplásicas pouco frequentes em cães, nos quais o emprego de painel imuno-histoquímico foi relevante em termos diagnósticos e prognósticos.

Palavras-chave: Cães; Imuno-histoquímica; Oncologia; Patologia veterinária.

ALVES. Camila Sabaudó. **Contribution of immunohistochemistry in the histogenic characterization and prognosis of nasal chondrosarcoma and gastric signet ring cells carcinoma in dogs.** 2017. 53p. Qualification of Master in Environmental and Experimental Pathology of University Paulista- UNIP. São Paulo, 2017.

ABSTRACT

The increasing number of oncological processes in dogs has determined a progressive demand for an accurate diagnostic method, aiming at the rapid and adequate characterization of the disease, allowing the selection of the most adequate therapeutic protocol. In this sense, immunohistochemistry presents itself as a potentially relevant tool. In this study it was reported clinical-pathological and immunohistochemical aspects of two cases of neoplastic lesions infrequent in dogs, in which the use of immunohistochemical panel was relevant in terms of diagnosis and prognosis.

Key - words: Dogs; Immunohistochemistry; Oncology; Veterinary pathology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	6
REFERÊNCIAS.....	9
CAPÍTULO 1.....	12
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
RESUMEN.....	14
1.INTRODUÇÃO.....	15
2.MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.RESULTADOS.....	18
4.DISSCUSSÃO.....	22
5.CONCLUSÃO.....	24
REFERENCIAS.....	25
CAPÍTULO 2.....	28
RESUMO.....	28
ABSTRACT.....	29
RESUMEN.....	30
1 REVISÃO DE LITERATURA.....	31
2 RELATO DE CASO.....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
REFERÊNCIAS.....	45
ANEXOS.....	52

1 INTRODUÇÃO

A incidência de neoplasias em animais domésticos têm aumentado a cada ano. O câncer é a principal causa de morte em cães nos países desenvolvidos (CRAIG, 2001; PROSCHOWSKY et al., 2003). No Brasil, as neoplasias são consideradas a segunda maior causa de morte em animais de companhia (BENTUBO et al., 2007) e a primeira em animais idosos (FIGHERA et al., 2014), fato decorrente do aumento da expectativa de vida, relacionado ao aumento da prevenção de doenças infecciosas e parasitárias, nutrição, terapêutica e prática médica (WITHROW & VAIL, 2007). Além disto, os meios de diagnóstico de neoplasias têm sido aprimorados, recebendo atenção por parte dos profissionais veterinários, resultando em um aparente aumento da incidência, além da necessidade de se estabelecer novos critérios de diagnóstico, classificação e estadiamento dos tumores (ROSSETTO et al., 2009).

O grande número de informações sobre a biologia tumoral de diferentes tipos neoplásicos em cada espécie, exige um diagnóstico mais acurado, abrangendo características celulares e moleculares das neoplasias que vão além da definição de malignidade (RAMOS-VARA et al., 2008).

A publicação de um artigo de Coons et al. em 1941, que descreveram uma técnica de imunofluorescência para a detecção de antígenos celulares nos cortes de tecido, marcou o início da imuno-histoquímica (IHQ). Desde então, com a incorporação de uma série de aprimoramentos técnicos, a IHQ tornou-se uma ferramenta valiosa para pesquisa de doenças infecciosas e neoplásicas (LEONG, et al, 1987). O nome da técnica provém das raízes "imuno", em referência aos anticorpos utilizados no procedimento, e "histo", significando tecido.

O conceito fundamental por trás da IHQ baseia-se na utilização de anticorpos específicos para identificação de um antígeno "in situ", em tecido fresco ou cortes histológicos processados rotineiramente (LEONG & WRIGHT, 1987; RAMOS-VARA, 2005). Uma vez que a ligação do antígeno-anticorpo ocorre, é detectada uma reação histoquímica colorida visível por microscopia óptica ou fluorocromos com luz ultravioleta. Embora conceitualmente simples, a metodologia da IHQ tornou-se mais complexa e objetivos mais rigorosos de sensibilidade e especificidade foram estabelecidos (RAMOS-VARA, 2011).

A IHQ é influenciada por vários fatores, desde a fase pré-analítica, que compreende a fixação e processamento dos tecidos, passando pela fase analítica, que se refere da escolha de anticorpos primários e sistema de visualização, até a fase pós-analítica que se trata da interpretação dos resultados (GOBBI, 2008). A experiência do patologista com o método é fator relevante, pois ele interfere na escolha dos reagentes e anticorpos a serem usados em cada caso, analisa a qualidade das reações e interpreta os resultados da coloração. Além disso, o patologista integra os achados morfológicos com os resultados do estudo imuno-histoquímico, formulando o diagnóstico anatomopatológico final (NONOGAKI, 2007).

Desde a sua introdução, na década de 70, as publicações científicas com o emprego da imuno-histoquímica aplicada à oncologia canina aumentaram significativamente (Gráfico 1).

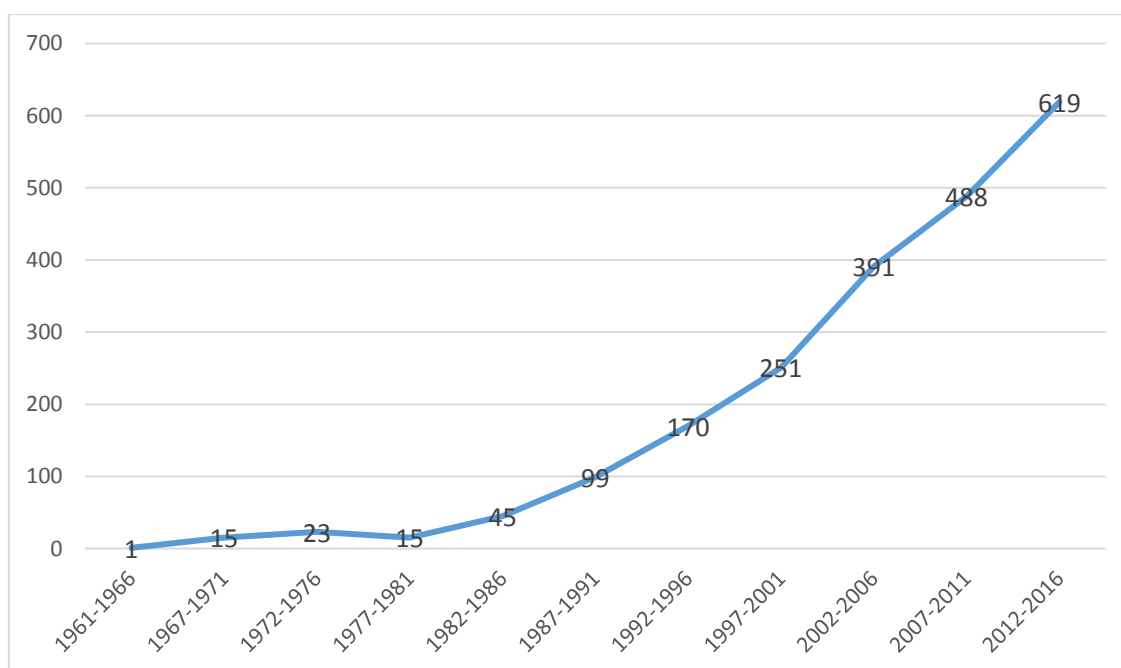


Gráfico 1. Número de publicações científicas a partir dos termos “immunohistochemistry, tumor, dog” rastreadas no Pubmed, entre 1961 e 2016.

Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

Uma série de aplicações, vinculadas ao diagnóstico, têm sido referidas para as reações imuno-histoquímicas, sendo as principais:

- Diagnóstico histogênico de neoplasias indiferenciadas, a partir da pesquisa de marcadores de linhagens celulares (ALVES & VASSALLO, 1999);

- Subtipagem de neoplasias, possível a partir da identificação de moléculas específicas, como no caso de linfomas, direcionando o prognóstico e a terapêutica adequadas (BODEY, 2002);
- Busca do sítio primário em tumores metastáticos de origem desconhecida, particularmente relevante em carcinomas (JAFFER, 2004);
- Caracterização de produtos de secreção de células neoplásicas, permitindo detalhada correlação com manifestações clínicas (ROSAI, 1996);
- Discriminação de natureza “Benigna” versus “Maligna” de algumas proliferações celulares, pois em situações especiais, o encontro de determinadas moléculas caracteriza um comportamento biológico não identificável em bases puramente morfológicas (TAYLOR, 1994);
- Avaliação prognóstica de neoplasias. Diversas neoplasias têm sua avaliação prognóstica complementada pela detecção de receptores hormonais, de oncoproteínas e de fatores ligados à angiogênese e ao ciclo celular (WERNER, 2000);
- Identificação de antígenos de agentes infecciosos: nem sempre identificável à morfologia, em diversas situações, a natureza do agente é esclarecida pela detecção IHQ de seus antígenos, aspecto de grande importância em infecções em imunossuprimidos (FITZGIBBONS, 2000).

O objetivo deste estudo é demonstrar a relevância do emprego da imuno-histoquímica na rotina clínica veterinária, em particular no diagnóstico histogênico e prognóstico de condições oncológicas em cães.

REFERÊNCIAS

- ALVES, V. A. F.; VASSALLO, J. Gerenciamento de qualidade em imunohistoquímica. In: ALVES, V.A.F., BACCHI, C.E., VASSALLO, J. **Manual de Imuno-histoquímica da Sociedade Brasileira de Patologia**, cap 1: 1-9, 1999.
- AMORIM, R. L. Imunohistoquímica em oncologia veterinária. In: DALECK, C.R. et al. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2009. Cap.8, p.135-150.
- BENTUBO, H. D. L.; TOMAZ, M. A.; BONDAN, E. F.; LALLO, M. A. Expectativa de vida e causas de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil). **Ciência Rural**, v.37, n.4, p.1021-1026, 2007.
- BODEY, Bela. The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms. **Expert Opinion of Biology Therapy**, v. 2, n. 4, p. 371-93, 2002.
- COONS, A.H.; CREECH, H. I. J. I.; JONES, R. N. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 47:200–202, 1941.
- CRAIG, Linden E. Cause of death in dogs according to breed: a necropsy survey of five breeds. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.37, p.438-443, 2001.
- FERNANDEZ, N. J.; WEST, K. H.; JACKSON, M. L.; KIDNEY, B. A. Immunohistochemical and histochemical stains for differentiating canine cutaneous round cell tumours. **Veterinary Pathology**, v.42, p.437-445, 2005.
- FIGHERA, R. A.; SOUZA, T. M.; SILVA, M. C.; BRUM, J. S.; GRAÇA, D. L.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.4, p.223-230, 2014.
- FITZGIBBONS, P. L.; PAGE, D. L.; WEAVER, D.; THOR, A. D.; ALLRED, D. C.; CLARK, G. M.; HAYES, D. F. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 124, n. 7, p. 966-78, 2000.

GOBBI, H.; ROCHA, R. M.; NUNES, C. B. Predictive factors of breast cancer evaluated by immunohistochemistry. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 2, p. 127-36, 2008.

HSU, W. L.; HUANG, H. M.; LIAO, J. W.; WONG, M. L.; CHANG, S. C. Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER2 gene. **Veterinary Journal**, v.180, p.116-123, 2009.

JAFFER, S.; BLEIWEISS, I.J. Beyond hematoxylin and eosin: the role of immunohistochemistry in surgical pathology. **Cancer Investigation**, v. 22, n. 3, p. 445-65, 2004.

LEONG, A.S-Y.; WRIGHT, J. The contribution of immunohistochemical staining in tumor diagnosis. **Histopathology**, v.11, n.12, p.1295-1305, 1987.

MANDEL, U.; GAGGERO, B.; REIBEL, J.; THERKILDSEN, M. H.; DABELSTEEN, E.; CLAUSEN, H. Oncofetal fibronectins in oral carcinomas: correlation of two different types. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica** 102:695–702, 1994.

MIGHELL, A. J.; HUME, W. J.; ROBINSON, P. A. An overview of the complexities and subtleties of immunohistochemistry. **Oral Diseases**, v. 4, p. 217–223, 1998.

MOHAMMED, R. A.; MARTIN, S. G.; MAHMMOD, A. M.; MACMILLAN, R. D.; GREEN, A. R.; PAISH, E. C.; ELLIS, I. O. Objective assessment of lymphatic and blood vascular invasion in lymph node-negative breast carcinoma: findings from a large case series with longterm follow-up. **Journal of Pathology**, v. 223, p. 358-365, 2011.

NELSON, P. N.; REYNOLDS, G. M.; WALDRON, E. E.; WARD, E.; GIANNOPOULUS, K; MURRAY, P. G. Monoclonal antibodies. **Journal of Clinical Pathology**, v. 53, p. 111–117, 2000.

NONOGAKI, S.; KANAMURA, C. T.; DE OLIVEIRA, L. F.; BELA, M. C.; DE MENEZES, Y.; WAKAMATSU, A.; ALVES, V. A. F. Análise de indicadores internos e externos relevantes à resolutividade diagnóstica em laboratório de referência em imunohistoquímica. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial**, v. 43, n. 4, p. 297-304, 2007.

PROSCHOWSKY, H. F.; RUGBJERG, H.; ERSBOLL, A. K. Mortality of purebred and mixedbreed dogs in Denmark. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 58, p. 63-74, 2003.

RAMOS-VARA, J. A.; KIUPEL, M.; BASZLER, T.; BLIVEN, L.; BRODERSEN, B.; CHELACK, B.; EHRHART, E. J. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, p. 393-413, 2008.

RAMOS-VARA, J. A. Technical aspects of immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 42, p. 405-426, 2005.

RAMOS-VARA, J.A. Principles and methods of immunohistochemistry. **Methods in Molecular Biology**, v. 691, p. 83-96, 2011.

ROSAI, J. Special techniques in surgical pathology. In: **Ackerman's Surgical Pathology**. 8 ed. Nova York: Mosby-Year Book, 1996. p. 29-62.

TAYLOR, C. R.; COTE, R. J. Major Problems in Pathology. In: **Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist**, v 19, 2 ed. Nova York: WB Saunders, 1994.

WERNER, M.; CHOTT, A.; FABIANO, A.; BATTIFORA, H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 24, n. 7, p. 1016-9, 2000.

WERNER, B.; CAMPOS, A.C.; NADJI, M.; TORRES, L. F. Uso prático da imunohistoquímica em patologia cirúrgica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 4, n. 5, p. 353-364, 2005.

WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. Introduction-"Why Worry About Cancer in Pets?". **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 4th ed. St. Louis, Mo. Saunders Elsevier, 2007.

CAPÍTULO 1

ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICOS DE CONDROSSARCOMA NASAL EM CÃO: RELATO DE CASO

COSTA, MMA¹; ALVES, CS²; SALZO, PS¹; KLEEB, SR^{1, 3}; XAVIER, JG^{1,2,3}

RESUMO

Os neoplasmas sino-nasais são raros em cães, destacando-se os carcinomas. No presente relato aborda-se a ocorrência, em cadela de 10 anos de idade, de formação nasal, cursando com epistaxe. Procedeu-se o diagnóstico a partir de biópsia local, evidenciando-se lesão sólida hiper celular, composta por células redondas dispostas em tapetes, com ocasional organização em lojas, associada à discreta deposição de matriz basofílica, sugerindo natureza condróide. Para confirmação histogênica empregou-se painel imuno-histoquímico, pesquisando-se a expressão de ceratinas, vimentina e proteína S-100, identificando-se positividade das duas últimas. A associação dos dados morfológicos e imuno-histoquímicos permitiu o diagnóstico de condrossarcoma, uma neoplasia maligna incomum em região nasal de cães.

Palavras – chave: Cães; Condrossarcoma; Imuno-histoquímica; Oncologia veterinária.

¹ Universidade Metodista de São Paulo

² Universidade Paulista

CLINIC PATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICALLY ASPECTS OF NASAL CHONDROSARCOMA IN A DOG: CASE REPORT

ABSTRACT

Sino- nasal neoplasms are rare in dogs, carcinomas being the most frequent ones. At this report, it is going to be approached the occurrence in a ten-year-old female dog, of nasal formation, studying with epistaxis. The diagnosis was possible with the result of a local biopsy, with a hypercellular solid lesion composed by round cells with occasional store organization on evidence, associated with the discrete basophilic matrix deposition, suggesting chondroid nature. For histogenic confirmation, an immunohistochemically panel was used, researching the expression of keratin, vimentin, and S-100 protein, identifying the last two as positive. The combination of morphological and immunohistochemically data allowed the diagnosis of chondrosarcoma, a rare malignancy in dogs' nasal region.

Key - words: Dogs; Chondrosarcoma; Immunohistochemistry; Veterinary oncology.

ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS DE CONDROSARCOMA NASAL EN UN PERRO: REPORTE DE UN CASO

RESUMEN

Neoplasias sinunasales son poco frecuentes en los perros, destacando los carcinomas. En el presente informe se refiere a la aparición, en la perra de 10 años de edad, la formación nasal, estudiando con epistaxis. El procedimiento fue el diagnóstico de sitio de la biopsia, lo que evidencia un hiper celular lesión sólida que consiste en células redondas dispuestas sobre alfombras con tiendas organización ocasionales, asociados con la matriz de deposición basófilo discreta, lo que sugiere la naturaleza condroide. Para la confirmación histogenica se utiliza panel de inmunohistoquímica, la investigación de las queratinas de expresión, vimentina y proteína S-100, la identificación positiva los dos últimos. La combinación de los datos morfológicos e inmunohistoquímicos permitió el diagnóstico de condrosarcoma, una neoplasia poco frecuente en la región nasal de los perros.

Palabras - clave: Perros; Condrosarcoma; Inmunohistoquímica; Oncología veterinaria.

INTRODUÇÃO

Neoplasias primárias de cavidade nasal são consideradas raras na maioria dos levantamentos de tumores em animais domésticos²⁵. Uma estimativa relacionada à ocorrência de neoplasmas sinonasais em cães estipula a presença desses processos em 2,5 indivíduos a cada grupo de 100.000 animais²¹. Partindo de registros de laboratórios de patologia, a prevalência desses tumores gira em torno de 0,8% das necropsias, correspondendo a 0,8 a 1,0% do total de neoplasmas em cães¹.

Particularmente os condrossarcomas compreendem cerca de 5 a 10% dos tumores ósseos em cães, sendo constituídos por células anaplásicas com proporções variadas de deposição de matriz condróide, originando-se em tecido esquelético ou extra esquelético²³. Enquanto na espécie humana apenas 2% desses processos esteja sediado em região de cabeça, em cães a localização mais frequente dessa neoplasia é a região nasal e nasofrontal, sendo frequentemente bilateral¹⁸. Refere-se maior risco de ocorrência em cães das raças Pastor Alemão, Boxer e Golden Retriever, sendo a idade média de acometimento 8,7 anos^{17,19}. A etiologia do condrossarcoma geralmente é desconhecida embora possa apresentar como fator de risco a exostose cartilaginosa múltipla³.

São tumores de crescimento lento e baixa incidência de metástase, presente em menos de 15% dos casos, concentrando-se, nesses casos, em pulmões. No entanto, tendem a um comportamento infiltrativo, com comprometimento de estruturas ósseas e tecidos moles adjacentes^{19,23}.

Os sinais clínicos como secreção nasal, espirros e obstrução da cavidade nasal, são associados a natureza desse tumor. O diagnóstico definitivo requer exame histológico a partir de amostras colhidas do local da lesão⁸.

A sobrevida sem tratamento cirúrgico ou quimioterápico varia de 2 a 6 meses e frequentemente é necessária a eutanásia, em virtude de distúrbios respiratórios, neurológicos e anorexia¹⁴.

O prognóstico para esse tumor está relacionado a localização, o grau de diferenciação e possibilidade de ressecção, e a sobrevida depende da rápida obtenção do diagnóstico⁵.

O presente relato refere-se à caracterização clínico-patológica e imuno-histoquímica de caso de formação nasal em cadela de 10 anos de idade, diagnosticada como condrossarcoma.

1 MATERIAL E MÉTODOS

Foi atendida uma cadela, SRD, com 10 anos de idade, em serviço veterinário autônomo, com quadro de epistaxe em narina esquerda, identificando-se, ao exame clínico, aumento de volume em região dorsal nasal. O animal foi submetido a exame radiográfico de crânio, solicitando-se hemograma e avaliação bioquímica sérica. Foi receitado Prednisona (1 mg/kg BID) e Amoxicilina (20 mg/kg BID). Após 10 dias, o animal retornou exibindo progressão da lesão em plano nasal, procedendo-se no dia seguinte, biópsia local (Figura 5), com imersão da amostra em formol a 10% e subsequente inclusão em parafina, avaliação histopatológica e imuno-histoquímica.

Cortes teciduais de aproximadamente 5mm, foram corados pelo método de hematoxilina-eosina e processados imuno-histoquimicamente, empregando-se a metodologia descrita por Hsu et al, 1981¹ com recuperação antigênica pelo calor em panela de pressão, contendo solução tampão de citrato de sódio a 0,01M, pH 6,5, por 5 minutos em ebulição. Seguiu-se o bloqueio da peroxidase; incubação com o anticorpo primário; incubação com anticorpo secundário e polímero (DAKO-Envision). Revelação contendo o cromógeno diaminobenzidina. Como anticorpos primários foram utilizados os anticorpos monoclonais de camundongo anti-humano para vimentina (clone vim 3B4), e ceratinas (clone AE1 e AE3), e o anticorpo policlonal de coelho anti-proteína S-100 (Z0311), todos provenientes da Dako A/S, Dinamarca.

2 RESULTADOS

O exame radiográfico evidenciou aumento de tecidos moles em região dorsal ao osso nasal, com opacificação de cavidade nasal do lado esquerdo.

Histopatologicamente identificou-se tecido hipercelular, caracterizado por população de células redondas, dispostas solidamente, com eventual organização de lojas. Presença de anisocariose. Ocasionais figuras de mitose. Frequente vacuolização citoplasmática. Destaque para a ocorrência multifocal de discretos depósitos de material fracamente basofílico, consistente com matriz condróide. Ausência de delimitação do processo (Figura 1). Para a confirmação histogênica procedeu-se marcação imuno-histoquímica, revelando imunopositividade das células neoplásicas para vimentina, com importante expressão citoplasmática difusa (Figura 2 e Figura 3), e imunomarcação citoplasmática, de leve a moderada, para a proteína S-100 (Figura 4). Não houve positividade às ceratinas.

A associação dos achados morfológicos e imuno-histoquímicos permitiu o diagnóstico de condrossarcoma. Segundo a classificação de estadiamento tumoral pela Organização Mundial de Saúde (OMS), o presente caso classifica-se em T1, N0 e M0.

Com o diagnóstico estabelecido foi sugerido tratamento com quimioterapia para citorredução e subsequente cirurgia e radioterapia. Após uma sessão de quimioterapia, com o emprego de Doxorubicina por via intravenosa (30 mg/m²), a proprietária optou por tratamento suporte com antibiótico (Amoxicilina 20 mg/kg BID), antiinflamatório (Prednisona 1 mg/kg BID) e analgésicos (Tramadol 4 mg/kg TID e Dipirona 25 mg/kg TID).

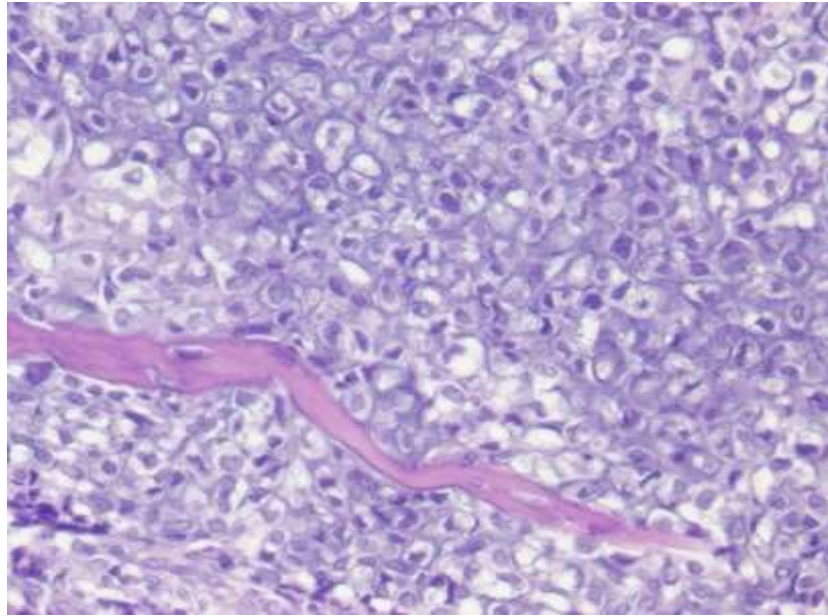


Figura 1. Fotomicrografia evidencia tecido sólido, hipercelular, constituído por células redondas, exibindo núcleo ovalado central e frequente vacuolização citoplasmática. H/E, 40x. **Fonte:** Rous Patologia Animal Ltda, 2016.

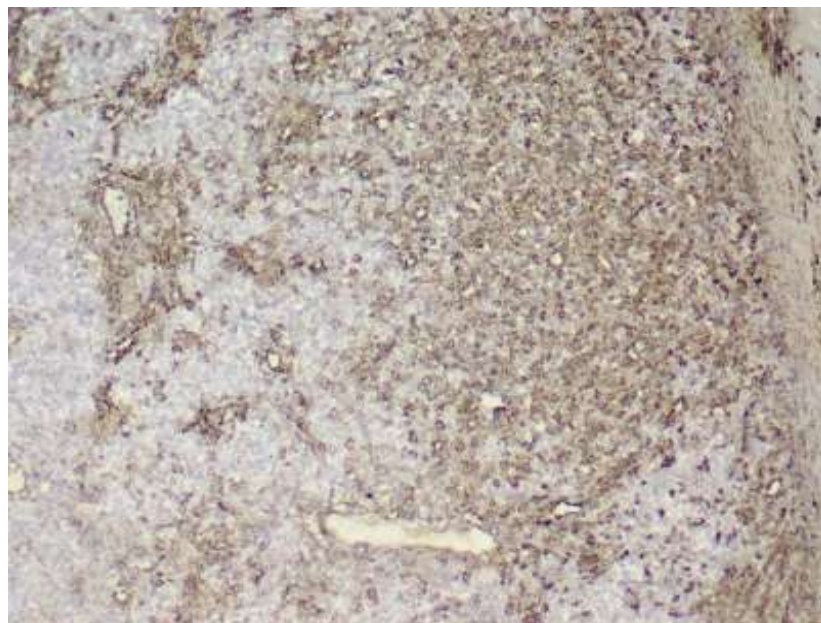


Figura 2. Fotomicrografia evidenciando importante imunopositividade citoplasmática para a vimentina, difusamente. DAB, 10x. **Fonte:** Rous Patologia Animal Ltda, 2016.

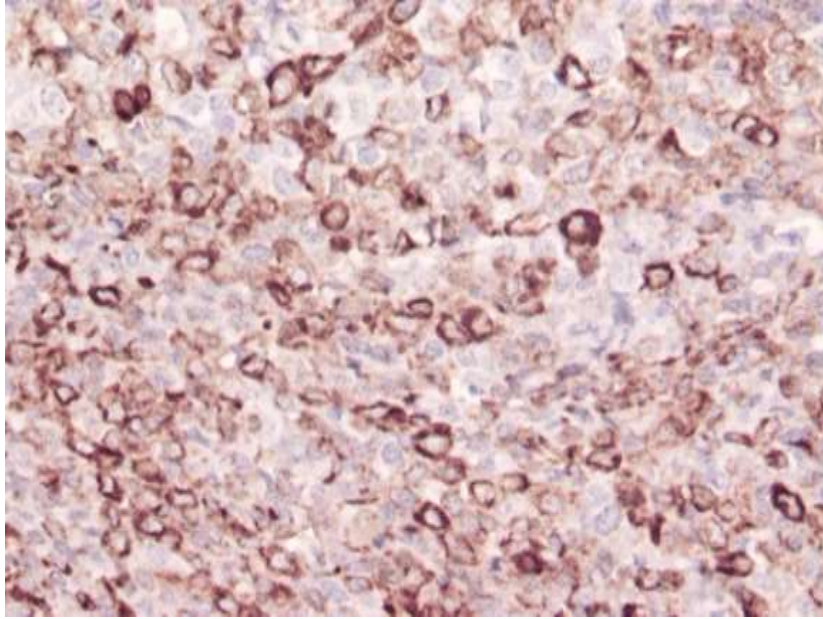


Figura 3. Detalhe da imunomarcção citoplasmática para a vimentina nas células neoplásicas. DAB, 40x. **Fonte:** Rous Patologia Animal Ltda, 2016.

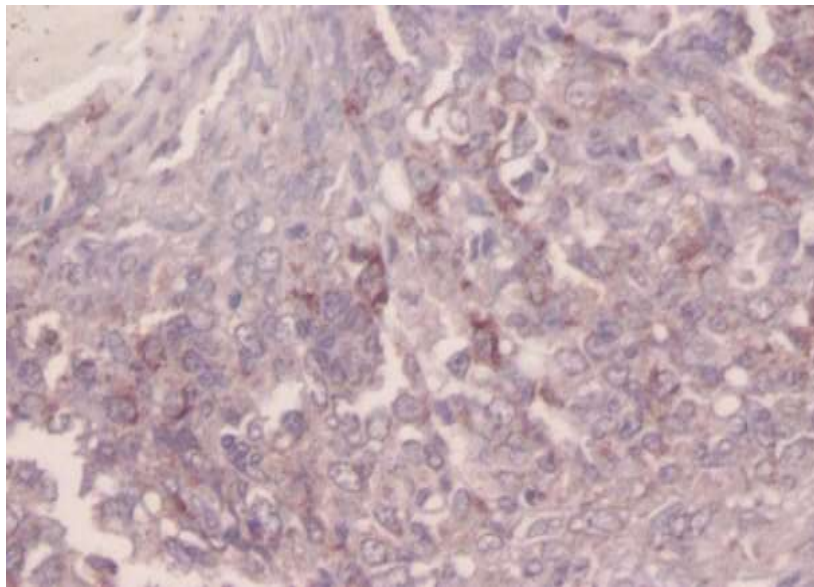


Figura 4. Fotomicrografia evidencia imunopositividade citoplasmática de células neoplásicas para proteína S-100. DAB, 60x. **Fonte:** Rous Patologia Animal Ltda, 2016.



Figura 5. Cicatriz cirúrgica em área de excisão tumoral. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2016.

3 DISCUSSÃO

Embora raros, os tumores de cavidade nasal e seios paranasais são as neoplasias primárias mais comuns no trato respiratório em cães. Predominam processos malignos, correspondendo, em casuística envolvendo 239 casos, a 82% das ocorrências. Em termos histogênicos predominam os processos epiteliais, responsáveis por cerca de 2/3 dos tumores intranasais¹⁵ sendo o restante sarcomas, com o predomínio dos de natureza condróide²⁴. Dentre os condrossarcomas de crânio, 28,8% localizam-se em cavidade nasal¹⁰. Em consonância com a literatura, no caso relatado o animal acometido tinha 10 anos de idade^{17,19}.

De acordo com Greemfield, 2007, dentre os sinais clínicos mais relevantes está a epistaxe intermitente progressiva unilateral, condizente com o histórico do presente relato.

O animal deve ser submetido a anestesia para exames complementares como radiografias e tomografias computadorizadas de cavidade nasal e do seio frontal, com o propósito de avaliar a extensão da doença e determinar a área mais provável para a amostragem para exame histopatológico¹¹.

O condrossarcoma é composto por áreas sólidas hipercelulares povoadas por células cartilaginosas de cavidade nasal, associadas à produção, em quantidades variáveis, de matriz cartilaginosa^{4,22}. Em tumores pouco diferenciados o procedimento imuno-histoquímico funciona como uma importante ferramenta diagnóstica, no sentido de identificação histogênica da população proliferativa²⁰.

A partir da caracterização morfológica da lesão, neste estudo optou-se pelo emprego de um painel de anticorpos para o rastreamento de populações epiteliais, mesenquimais e, em especial, de condrócitos. A pesquisa epitelial justifica-se pela elevada incidência de carcinomas em território nasal de cães, sendo estes tumores, em condições de comprometimento de diferenciação, representados por agregados de células redondas, à semelhança do observado neste caso. A amostra mostrou ausência de imunomarcagem para ceratinas, favorecendo a exclusão da hipótese diagnóstica de carcinoma. Em contrapartida, a imunopositividade para vimentina reforçou a hipótese inicial de lesão sarcomatosa. Complementando-se o painel com a expressão de proteína S-100 nas células neoplásicas, que, embora não específica para condrócitos, em associação com as características morfológicas lesionais, em

particular a deposição de matriz fracamente basofílica, consistentes com matriz condróide, permitiu o diagnóstico conclusivo de condrossarcoma nasal¹².

O tratamento dos condrossarcomas em geral é limitado à ressecção cirúrgica com margens amplas, devido à sua elevada resistência à quimioterapia e à radioterapia. As opções de terapia incluem reduções de volume cirúrgica, combinada ou não com radioterapia, quimioterapia, implante de irídio, imunoterapia e criocirurgia, porém o prognóstico pobre para lesões não ressecáveis e metastáticas, variando de 3 a 6 meses de vida¹³.

4 CONCLUSÃO

As neoplasias de cavidade nasal são pouco comuns em cães, em particular as de natureza mesenquimal. No presente relato foi empregado painel imuno-histoquímico para a confirmação histogênica em tumor nasal, caracterizando-se um condrossarcoma, evidenciando perfil fenotípico semelhante ao de tumores condróides sediados em outras regiões.

REFERÊNCIAS

1. BRODEY, R. S. Canine and feline neoplasia. **Adv Vet Sci Comp Med**, 14: 311-354, 1970.
2. COUTO, C. G. Distúrbios da Cavidade Nasal. In: NELSON RW; COUTO CG. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. Elsevier, Rio de Janeiro, 2006.
3. DOIGE, C. E. Multiple cartilaginous exostosis in dogs. **Vet Pathol** 24: 276-278, 1987.
4. FLETCHER, C. D. M.; UNNI, K. K; MERTENS F. **World Health Organization Classification of Tumours. Tumours of soft tissue and bone**. IARC Press, 2002.
5. FOSSUM, T. W. **Cirurgia de Pequenos Animais. 2 ed.**, Roca, São Paulo, 2005.
6. GARCEZ T. N. A.; TEIXEIRA, F. S.; LAMBERTS, M.; MUCCILLO, M. S. Condrossarcoma mixóide em um coelho. **Acta Sci Vet**, 3: 295-299, 2009.
7. GONCALVES, A. M.; CORREA, L. F. D.; QUEVEDO, L. S.; SCHREINER, T.; ANJOS, B. L. . Condrossarcoma primário de cavidade nasal em um cão. **Acta Sci Vet**, 2: 1-5, 2012.
8. GREEMFIELD, C. L. Neoplasias do Trato Respiratório; In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais. 3 ed.**, Manole, Barueri, 2007.
9. HSU, M. K.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J Histochem Cytochem**, 29: 577-580, 1981.
10. KIM, H.; NAKAICHI, M.; ITAMOTO, K.; TAURA, Y. Primary chondrosarcoma in the skull of a dog. **J Vet Sci**, 8: 99-101, 2007.
11. KLEINER JA & SILVA Tumores ósseos em pequenos animais. **Rev Medvop**, 1: 21-33, 2003.

12. KOJIMA, D.; HATAI, H.; OYAMADA, T.; PARK, C. H. Extraskeletal myxoid chondrosarcoma with systemic metastasis in a five-month-old irish setter dog. **J Vet Med Sci**, 74: 1045-1049, 2012.
13. KUMARI, R. The oncogene LRF is a survival factor in chondrosarcoma and contributes to tumor malignancy and drug resistance. **Carcinogenesis**. 33: 2076-83, 2012
14. LIU, S. Tumores ósseos e cartilagosos. In. BOJRAB, M. J. **Mecanismos da Moléstia na Cirurgia dos Pequenos Animais; 2. ed.** Manole, São Paulo, 1996.
15. MADEWELL, R.R.; PRIESTER, W. A.; GILLETTE, E. L.; SNYDER, S. P. Neoplasms of the nasal passages and paranasal sinuses in domesticated animals as reported by 13 veterinary colleges. **Amer J Vet Res**, 37: 851-856, 1976.
16. MELER, E. A retrospective study of canine persistent nasal disease: 80 cases (1998-2003). **Can Vet J**, 49: 71-76, 2008.
17. PATNAIK, A. K.; LIEBERMAN, P. H.; ERLANDSON, R. A.; LIU, S. K. Canine Sinonasal Skeletal Neoplasms: Chondrosarcoma and Osteosarcomas. **Vet Pathol**, 21: 475-482, 1984.
18. PATNAIK, A. K. Canine sinonasal neoplasms: clinicopathological study of 285 cases. **J Am Anim Hosp Assoc** 25: 103-114, 1989.
19. POPOVITCH, C. A.; WEINSTEIN, C. A.; GOLDSCHMIDT, M. H.; SHOFER, F. S. Chondrosarcoma: a retrospective study of 97 dogs (1987-1990). **Journal of American Animal Hospital Association**, Lakewood, 30: 81-85, 1994.
20. RAMOS-VARA, J. A & MILLER, M. A. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry – the red, borwn and blue technique. **Vet Pathol** 51: 42-87, 2014.
21. SCHNEIDER, R. General considerations. In MOULTON JE (ed), **Tumors in Domestic Animals, 3rd ed.** University of California Press, Berkeley, 1990.

22. STRAW, R. C. Tumores ósseos e articulares. In: ETTINGER SJ. **Tratado de Medicina Interna Veterinária, 5° ed.**, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.
23. SYLVESTRE, A. M.; BRASH, M. L.; ATILOLA, M. A. O.; COCKSHUTT, J. R. A case series of 25 dogs with chondrosarcoma. **Vet Comp Orthoped Trauma** 55: 13-17, 1992.
24. WILSON, D. W & DUNGWORTH, D. L. Tumors of the Respiratory System. In: MEUTEN DJ. **Tumors in Domestic Animals**, 4th ed. Iowa State Press, Ames, 2002.
25. WITHROW, S. J. Cancer of the nasal planum. In WITHROW SJ & VAIL DM. **Small Animal Clinical Oncology**, 4th ed. Saunders Elsevier, St Louis, 2007.

CAPÍTULO 2

ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICOS DE CARCINOMA GÁSTRICO DE CÉLULAS EM ANEL DE SINETE EM UM CÃO: RELATO DE CASO E REVISÃO DE LITERATURA

ALVES, C. S. ¹, COSTA, C. J. S. ², KLEEB, S. R. ²; XAVIER, J. G. ^{1,2}

1. Curso de pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista.

2. Curso de Medicina Veterinária da Escola de Ciências Médicas e da Saúde da Universidade Metodista de São Paulo.

RESUMO

Tumores gástricos são raros em cães, sendo aproximadamente 70% dos casos malignos. Os carcinomas representam menos de 1% das neoplasias malignas nessa espécie. Dentre os tipos de carcinomas gástricos, o de células em anel de sinete (GSRCC) é altamente invasivo e de mau prognóstico. Relata-se caso de GSRCC em cadela lhasa apso, de oito anos, com histórico de gastrite há um ano, com anorexia, êmese e apatia. Ao exame ultrassonográfico, identificou-se espessamento de parede gástrica e nodulação próxima ao baço e pâncreas. Em biópsia de estômago e de linfonodo observou-se predomínio de células redondas, distendidas por mucina com núcleo periférico, caracterizando um GSRCC, com extensão nodal. A partir da imunomarcagem identificou-se CK7-/CK20+, HER-2-, com 20% das células neoplásicas em proliferação. Optou-se por não realizar o tratamento quimioterápico e o animal teve uma sobrevida de cinco meses.

UNITERMOS: Cães; Carcinoma de células em anel de sinete; Imuno-histoquímica; Oncologia veterinária.

CLINICAL, PATHOLOGICAL AND IMMUNO-HISTOCHEMICAL ASPECTS OF GASTRIC SIGNET RING CELL CARCINOMA IN A DOG: CASE REPORT AND LITERATURE REVIEW.

ALVES, C. S. ¹, COSTA, C. J. S. ², KLEEB, S. R. ²; XAVIER, J. G. ^{1,2}

1. Postgraduate course in Environmental and Experimental Pathology, University Paulista.
2. Veterinary Medicine Course of the School of Medical Sciences and Health of the University Methodist of São Paulo.

ABSTRACT

Gastric tumors are rare in dogs, with nearly 70% of malignant cases. Even carcinomas are considered rare, taking part of less than 1% of malignancies in these species. Among gastric carcinomas, the gastric signet ring cell carcinoma (GSRCC) type is highly invasive with poor prognosis. This study reports an eight-year-old, Lhasa apso female dog, presenting a GSRCC, with history of gastritis, anorexia, emesis and apathy of one-year duration. Ultrasound examination revealed thickening of the gastric wall and a mass formation near the spleen and pancreas. At gastric and lymph node biopsy there were a majority of round cells, distended by mucin with peripheral nucleus, thus, characterizing GSRCC, with nodal metastasis. At immunohistochemical analysis CK7- / CK20 +, HER-2- were identified, with 20% of malignant neoplastic cells in proliferating. It was decided not to perform the chemotherapeutic and the animal had a five-month survival.

KEY - WORDS: Dogs; Gastric signet ring cell carcinoma; Immunohistochemistry; Veterinary oncology.

ASPECTOS CLINICO-PATOLÓGICOS E INMUNO-HISTOQUÍMICOS DE CARCINOMA GÁSTRICO DE CÉLULAS EN ANILLO DE SELLO EN UN PERRO: RELATO DE CASO Y REVISIÓN DE LITERATURA.

ALVES, C. S. ¹, COSTA, C. J. S. ², KLEEB, S. R. ²; XAVIER, J. G. ^{1,2}

1. Curso de postgrado en Patología Ambiental y Experimental, Universidad Paulista.
2. Curso de Medicina Veterinaria de la Escuela de Ciencias Médicas y de la Salud de la Universidad Metodista de São Paulo.

RESUMEN

Los tumores gástricos son raros en perros, siendo aproximadamente el 70% de los casos malignos. Los carcinomas representan menos del 1% de las neoplasias malignas en esta especie. Entre los tipos de carcinomas gástricos, el de células en anillo de sello (GSRCC) es altamente invasivo y de mal pronóstico. Se relata caso de GSRCC en perla lhasa apso, de ocho años, con historial de gastritis hace un año, con anorexia, émise y apatía. En el examen ultrasonográfico, se identificó espesamiento de pared gástrica y nodulación cercana al bazo y páncreas. En biopsia de estómago y de ganglio se observó predominio de células redondas, distendidas por mucina con núcleo periférico, caracterizando un GSRCC, con extensión nodal. A través de la inmuno-histoquímica se identificó CK7- / CK20 +, HER-2-, con el 20% de las células neoplásicas en proliferación. Se optó por no realizar el tratamiento quimioterápico y el animal tuvo una sobrevida de cinco meses.

UNITERMOS: Perros; Carcinoma de células en anillo de sello; Inmuno-histoquímica; Oncología veterinaria.

1 REVISÃO DE LITERATURA

O câncer caracteriza-se como um complexo fenômeno biológico, oriundo de sucessivas mutações genéticas, capaz de vencer o equilíbrio dos mecanismos de defesa e vigilância celulares e moleculares dos tecidos corpóreos, sendo, atualmente, considerado uma das doenças mais preocupantes para a humanidade¹. Somente nos EUA, mais de 1,66 milhões de seres humanos e mais de 4,2 milhões de cães são diagnosticados com câncer, anualmente².

Em medicina veterinária, as neoplasias de maior ocorrência em cães são as de pele, glândula mamária, órgãos linfohemopoiéticos, boca, testículo e ossos³. Tumores gástricos são infrequentes em cães, sendo em aproximadamente 70% dos casos malignos⁴. Mesmo os carcinomas são considerados raros, representando menos de 1% das neoplasias malignas dessa espécie⁵. Já em humanos, estima-se que essa condição neoplásica é a quinta mais prevalente e corresponde à terceira causa de morte relacionada ao câncer, em todo o mundo, principalmente na Ásia Oriental⁶.

No Brasil, o carcinoma gástrico (CG) aparece como terceiro na incidência entre homens e em quinto em mulheres, além disso, estima-se a ocorrência de 20.520 novos casos, somente em 2016⁷. Dados obtidos no Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde mostram que esse tipo de neoplasia maligna foi responsável, no Brasil, por 14.182 óbitos no ano de 2013. Frente a esse cenário, é evidente o desafio que essa doença representa para a saúde humana, sendo que a mesma condição no cão potencialmente pode ser abordada como um modelo biológico em patologia comparada. Nesse sentido, estudos adicionais são fundamentais para a validação dessa abordagem, podendo contribuir para uma melhor compreensão da condição patológica e colaborar com o desenvolvimento de abordagens clínicas e terapêuticas que beneficiam ambas as espécies^{8,9}.

Assim como no homem, os CGs caninos possuem etiologia pouco compreendida^{10,11}. Além disso, os registros sobre a epidemiologia em cães dificulta o entendimento etiológico das neoplasias em geral¹². Mas, conhecimentos acumulados ao longo dos anos demonstram os riscos que fatores biológicos, químicos e físicos presentes no ambiente têm para o desenvolvimento da carcinogênese¹³, e no caso do CG humano não é diferente, hábitos presentes na sociedade moderna como tabagismo; consumo de álcool, sal e gordura; obesidade e falta de exercícios físicos,

baixo consumo de frutas e verduras; envelhecimento e baixo *status* econômico parecem contribuir como carcinógenos importantes para a iniciação dessa neoplasia^{14,15}.

Um fator biológico que parece ser determinante para a promoção do CG humano é a infecção por *Helicobacter pylori*, capaz de aumentar em até 3 vezes o risco de CG, devido aos danos que esse agente provoca na mucosa, estimulando possíveis mutações¹⁶. Ainda, essa infecção bacteriana é frequentemente relacionada à patogenia deste neoplasma, culminando em evolução maligna em cerca de 3% dos infectados¹⁷. Distintamente, cães raramente apresentam *H. pylori* no estômago¹⁸, e outras espécies de *Helicobacter* estão presentes tanto em cães doentes quanto em sadios^{19,20}. Por outro lado, há relatos de predisposição racial, principalmente em pastores-belgas^{21,22}. Ainda são referidos como predispostas as raças staffordshire bull terrier, collie, chow-chow, hovawart, poodle e boiadeiro de Flandres^{23,24}. Alguns fatores foram relatados por favorecerem o desenvolvimento do CG, como o uso prolongado ou contato excessivo com n-nitrosaminas, composto carcinogênico utilizado para a indução experimental da neoplasia^{25,26,27}. Ainda, há evidências que relacionam gastrites atrófica e hipertrófica com o desenvolvimento de CG em cães^{28,29,30,31}.

Os CG são neoplasias que acometem cães de meia idade, por volta de oito anos^{4,32}, embora casos esporádicos com animais jovens já tenham sido reportados²⁴. À semelhança do observado em humanos, em cães é mais frequente em machos^{4,5,10}. Os sinais clínicos em cães geralmente são brandos ou inexistentes, em fase inicial, seguindo-se manifestações inespecíficas relacionadas ao trato digestório, como anorexia, perda de peso, letargia e vômito, sem alterações hematológicas e bioquímicas significativas^{5,10}.

O tumor primário localiza-se principalmente na curvatura menor do estômago e em região de piloro, podendo acometer as demais áreas do tecido gástrico. Ocorre espessamento da parede e aumento de tecido fibroso, resultando no comprometimento da distensão do órgão e acúmulo de gás^{5,10,21,32}. Devido a apresentação primária inespecífica, o CG dificilmente é diagnosticado nessa fase³³, sendo usualmente caracterizado em estágio avançado, quando metástases já foram estabelecidas, tornando o prognóstico reservado e limitando a resposta terapêutica³⁴. A metástase representa um ponto crítico na sobrevida do paciente, sendo responsável

por 90% da mortalidade de portadores de câncer. Comumente, pacientes com CG apresentam metástase, preferencialmente em duodeno, fígado, glândulas adrenais, pâncreas, omento, baço e pulmão^{35,36}.

O diagnóstico para CG se baseia principalmente no histórico do paciente, raça, manifestações clínicas, achados imaginológicos e análise histopatológica, fundamental para confirmação³². Exames de imagem, como radiografias, ultrassonografias (US) e tomografia computadorizada (TC), podem fornecer informações significativas para o caso, embora sinais inespecíficos possam ser obtidos^{10,32,36}. A ultrassonografia e a tomografia computadorizadas são amplamente utilizadas, proporcionando informações relevantes, como espessura da parede gástrica, dimensão de linfonodos e investigação de sítios metastáticos³². Entretanto, a TC pode ter sua interpretação comprometida por artefatos, principalmente a presença de gases, e a US é pouco sensível a detecção de ulcerações³⁶. Dessa forma, o exame de exploração recomendado para a verificação de CG é a endoscopia³⁷.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2000), os CG são classificados em cinco categorias, de acordo com o padrão de histológico: tubular, papilar, mucinoso, células em anel de sinete, e indiferenciado. Nos tumores tubulares, as células distribuem-se em paliçada, constituindo túbulos, apresentando variações em relação ao formato e dimensões lumenais. Morfologicamente, essas células podem ser prismáticas, cubóides ou pavimentosas. As lesões papilares apresentam boa diferenciação, constituindo projeções exofíticas revestidas por células prismáticas ou cubóides. São considerados carcinomas mucinosos as neoplasias em que mais de 50% da lesão é formada por acúmulo extracelular de mucina. Já no carcinoma gástrico de células em anel de sinete (GSRCC, do inglês, *gastric signet-ring cell carcinoma*) o acúmulo de mucina é intracitoplasmático, determinando um deslocamento nuclear periférico em mais da metade da lesão tumoral³⁸. Estudos realizados em pacientes humanos evidenciam que o GSRCC representa aproximadamente 30% das neoplasias gástricas malignas^{39,40}. Já uma pesquisa realizada no Hospital Veterinário da Universidade Complutense de Madrid⁴¹, evidenciou que entre 17 casos de CG caninos diagnosticados entre 1995 a 2007, o GSRCC representou 47% dos animais acometidos, seguido por 41,2% de cães com tumores tubulares e 11,8% com carcinomas indiferenciados. Corroborando esses dados, em investigação de

biomarcadores tumorais para CG, identificou que dos 19 cães presentes no estudo 8 apresentavam CG mucinoso/GSRCC ⁴².

Levantamentos recentes têm demonstrando a diminuição do CG em humanos, mas evidenciam também o aumento da ocorrência de GSRCC, principalmente na Ásia, EUA e Europa^{43,44}. Dados relativos a incidência em cães ainda são restritos, em virtude da falta de registros e de limitações diagnósticas¹². O GSRCC tem prognóstico pobre, baixa diferenciação e alto potencial invasivo^{43,45}. Diferente dos demais CG, tende a se estender por toda a mucosa gástrica, podendo até mesmo acometer órgãos vizinhos⁴⁶. Na espécie humana o GSRCC, possui maior prevalência em mulheres jovens do que em homens⁴⁷. A classificação fenotípica dos GSRCC precisa ser melhor elucidada, mas é realizada de acordo com a expressão de moléculas presentes no tumor, podem ser: tipo G, expressam exclusivamente um ou mais marcadores gástricos, sem expressão de marcadores intestinais; tipo I, apresenta marcadores intestinais, mas ausência de marcadores gástricos; tipo GI, dupla marcação, apresentando marcadores gástricos e intestinais, e tipo UC, os que não expressam marcadores gástricos ou intestinais^{46,48}.

Em estudo, foram correlacionados os tipos de GSRCC com o prognóstico de pacientes, evidenciando que o GSRCC do tipo G apresenta melhor comportamento biológico, melhor prognóstico e maior expressão de proteínas de adesão, configurando baixa invasividade; o do tipo I é relatado pela alta habilidade de invasão, pobre prognóstico e baixa sobrevida. Ainda, o antígeno de proliferação celular, Ki-67, apresentou elevada expressão nas amostras do tipo I e GI, evidenciando a alta capacidade proliferativa, confirmando comportamento biológico agressivo exercido pelos GSRCC que expressam marcadores intestinais ⁴⁸.

O emprego de marcadores tumorais tem contribuído para o avanço da oncologia em diversos aspectos, como na caracterização histogênica de neoplasias pobremente diferenciadas, no estabelecimento de seu prognóstico e eventualmente na predição⁴⁹. As informações obtidas fornecem suporte para o melhor discernimento da biologia tumoral, proporcionando suporte científico para a elaboração de metodologias terapêuticas e avanços tecnológicos na oncologia. A pesquisa de componentes do citoesqueleto, de marcadores de proliferação celular e de produtos oncogênicos integram abordagens clássicas relativas à investigação oncológica, apresentando, respectivamente, finalidades de caracterização histogênica,

informação prognóstica e preditiva. O conhecimento de biomarcadores do GSRCC na medicina veterinária é escasso, devido à baixa incidência da condição.

Este trabalho se propõe a relatar caso de carcinoma gástrico de células em anel de sinete em cão, e investigar, com o emprego de método imuno-histoquímico, a expressão de alguns marcadores potencialmente relevantes, para o diagnóstico, prognóstico e eventual predição dessa enfermidade. Os achados obtidos por esse estudo podem ser de relevância para avanços na abordagem de pacientes portadores de GSRCC.

2 RELATO DE CASO

Uma cadela, lhasa apso, 8 anos, 5,9 kg, castrada, foi inicialmente atendida em serviço veterinário autônomo sob queixa inicial de anorexia, hematêmese, prostração e apatia. Animal com histórico de gastrite severa linfoplasmocítica há um ano, realizava tratamento paliativo com Omeprazol (1 mg/ kg SID). Realizado tratamento suporte na clínica com fluidoterapia intravenosa e não identificado sucesso, decidiu-se encaminhar a paciente para internação intensiva.

Ao exame físico, o animal estava prostrado em decúbito lateral, nível de consciência reduzido, estado geral grave, hidratado, pelame opaco, mucosas perláceas, tempo de preenchimento capilar maior que 3 segundos, linfonodos não reativos, dor moderada à palpação abdominal em região epigástrica e mesogástrica, eupneico (FR= 40 MRM), normocárdico (FC= 80 BPM). Presença de sopro tipo II/III em auscultação, pulso fraco, normotermia e nistagmo horizontal.

Na avaliação hematológica, observou-se anemia e trombocitose associados a anisocitose e moderada policromasia. As análises bioquímicas de uréia, creatinina, ALT, FA, albumina, proteína total e glicemia não apresentaram alterações significativas. Frente ao quadro de dor, foi realizada analgesia por via intravenosa (Dipirona 25 mg/kg e Tramadol 2 mg/kg) para realização de ultrassonografia abdominal na paciente, caracterizando-se espessamento da parede gástrica com perda da estratificação de camadas e tecido reativo sugestivo de peritonite. Ainda, notou-se a presença de uma estrutura nodular em região compreendida entre estômago, baço e ramo esquerdo do pâncreas, sugestivo de neoplasia ou linfadenomegalia.

Em decorrência do quadro de anemia, foi realizado transfusão de concentrado de hemácias sem intercorrências, tornando o animal mais alerta e com parâmetros vitais estáveis. Depois de atingida a estabilidade do quadro clínico, a cadela foi submetida à laparotomia exploratória sem ocorrência de irregularidades no transoperatório. Esse procedimento foi necessário para realizar a biópsia da neoformação, localizada em porção gástrica e ressecção de linfonodo regional.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras coletadas foram fixadas em formol 10% e submetidas a processamento histológico de rotina, com inclusão em parafina, corte em micrótomo, coradas pela hematoxilina-eosina (HE) e montadas em lâminas para análise microscópica. Adicionalmente, procedeu-se a desparafinização de lâminas silanizadas, submetidas à inativação da peroxidase endógena e bloqueio de ligações inespecíficas, utilizando solução de metanol (150 mL) acrescido de 1,5 de peróxido de hidrogênio a 3% em incubação por 20 minutos e lavagem em água corrente, respectivamente. Posteriormente, se realizou a recuperação antigênica da amostra pré-tratada com tampão citrato 10 mM/ pH 6,0 (21g de ácido cítrico monohidratado PA diluído em 1L de água destilada) em forno microondas por 10 minutos em máxima potência (800 W) e 20 minutos de repouso dentro da solução de citrato e em temperatura ambiente.

Os anticorpos primários anti- Ki-67, HER-2, CK7 e CK20 (Quadro 1), foram diluídos em PBS (NaCL 160,0g + Na₂HO₄ 27,31g + NaH₂PO₄2H₂O 4,8g + 1L de H₂O destilada) e incubados *overnight* (18 horas) com a amostra em um recipiente fechado, a 4°C de temperatura. Após o período de incubação, as amostras sofreram três lavagens, com intervalos de 5 minutos entre elas, utilizando PBS. A seguir, foi realizada a incubação com anticorpo secundário e complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, DAKO) por 40 minutos, nas mesmas condições de temperatura descritas anteriormente. Após a incubação, seguiu-se com três lavagens em PBS, e subsequentemente, aplicou-se o revelador, cromógeno diaminobenzidina (Dako®), responsável pela coloração acastanhada da reação. E por fim, as lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris (Queel®) por 30 segundos, novamente lavadas em água corrente, desidratadas em amônia a 2% e álcool, e montadas com lamínulas e Entellan®. A imunoexpressão de Ki-67 foi quantificada a partir da observação de 500 células neoplásicas.

Quadro 1. Relação de anticorpos utilizados no estudo

Anticorpo	Clone	Origem	Título
CK7	OV-TL 12/30	DAKO	1:100
CK20	Ks20-8	DAKO	1:100
Ki-67	MIB-1	DAKO	1:100
HER-2	Sp3	Spring	1:50

Fonte: Rous Patologia Animal Ltda, 2017.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras gástricas macroscopicamente mostraram-se sólidas, brancacentas, macias, opacas e homogêneas. Microscopicamente apresentaram revestimento mucoso contínuo por epitélio prismático simples. Destaque, a partir de lâmina própria, para população de células redondas, apresentando citoplasma distendido por mucina, com deslocamento periférico nuclear. Estas invadem parede gástrica, avançando por submucosa e estrato muscular. Presença de anisocariose e figuras de mitose atípicas. Eventual multinucleação. Frequentes lagos de mucina em interstício. Discreto infiltrado leucocitário misto. Ausência de delimitação do processo. Essas características são compatíveis com o padrão lesional do CG do tipo GSRCC, segundo a classificação da OMS³⁸.

Em associação foi amostrado linfonodo regional, apresentando-se sólido, opaco, castanho claro entremeado por áreas brancacentas e heterogêneo. Ao microscópio evidenciou-se a preservação da cápsula exibindo escassos agregados linfóides periféricos. No entorno e comprometendo porções teciduais profundas extensa população de células redondas, distendidas por mucina, com deslocamento periférico nuclear. Lagos de mucina em interstício. Necrose multifocal. Ausência de delimitação do processo, caracterizando lesão metastática.

Com base no sistema TNM de estadiamento tumoral da Organização Mundial de Saúde (OMS), o presente caso classifica-se em T3, N1 e M0. O estadiamento funciona como uma espécie de anotação taquigráfica da evolução tumoral, permitindo a comparação entre casos e auxiliando na definição da abordagem clínica mais adequada em tumores malignos, considerando os seguintes parâmetros: tamanho do tumor, acometimento de linfonodos regionais e presença de metástases à distância⁶⁰.

O GSRCC é diagnosticado a partir da observação do predomínio de células epiteliais distendidas por mucina, com deslocamento periférico nuclear⁵⁰. De maneira geral é compreendido como uma neoplasia maligna de mau prognóstico. Uma vez que sua sintomatologia não é patognomônica, se faz necessária a utilização de recursos complementares a fim de obter informações para diagnóstico e o prognóstico do caso. A utilização de recurso de imagens é muito promissora para a investigação de lesões

tumorais, entretanto, o diagnóstico só é definido com a adição da análise histopatológica, como realizado nesse estudo.

A partir dos achados histopatológicos optou-se pela realização de procedimento imuno-histoquímico, com o objetivo de confirmar a histogênese da condição e de obter informações prognósticas. A investigação de marcadores tumorais é uma prática em ascensão na oncologia veterinária, aplicável em condições análogas a esta, mas também como indicadores preditivos, como complemento na distinção entre lesões inflamatórias e neoplásicas, e entre neoplasias benignas e malignas. Com frequência são empregados marcadores usualmente utilizados na investigação desses tumores na espécie humana, que amiúde apresentam reatividade cruzada com tecidos de cães ^{42,51}.

A combinação CK7/CK20 é usualmente empregada para a distinção entre sítios primários de neoplasias epiteliais, particularmente útil na identificação de sítio primário em carcinomas metastáticos⁵². Dentre as citoceratinas, observou-se apenas imunoexpressão de CK20 nas células neoplásicas, em paralelo à ausência de marcação para CK7 (Figura 1). Tais achados são opostos aos identificados, em tumor análogo, na espécie humana, na qual predomina o perfil CK7+/CK20-⁵¹. GÜRBÜZ e KÖSE identificaram que 20% das células tumorais no GSRCC humano apresentam perfil de imunoexpressão CK7-/CK20+. Também Espinosa de Los Monteros et al., 1999, identificaram perfil análogo em 1 dos 2 adenocarcinomas gástricos caninos avaliados⁵⁴.

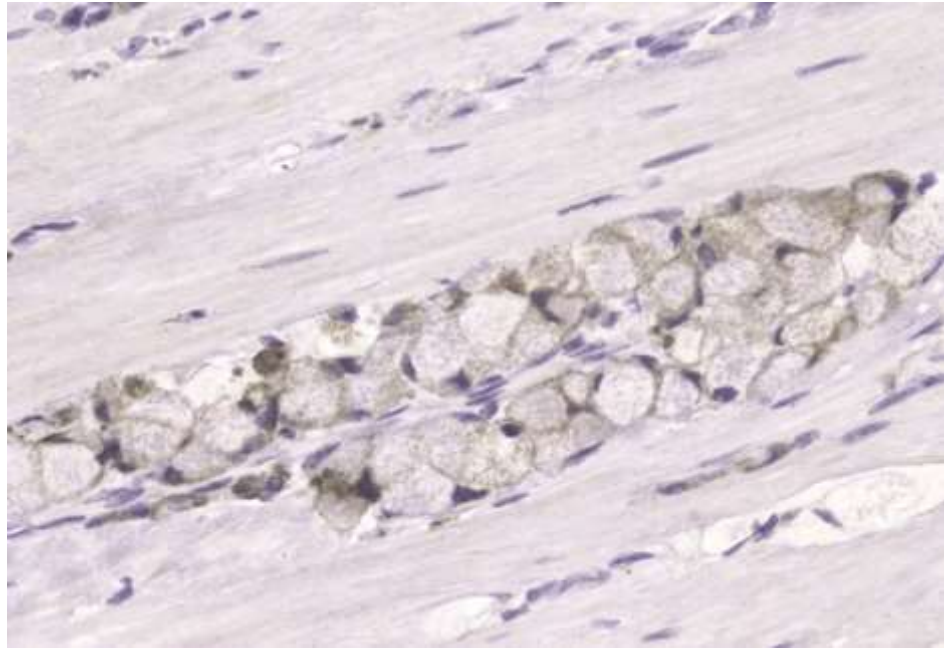


Figura 1. Fotomicrografia de corte histológico de estômago, evidenciando expansão de população neoplásica, disposta em cordão, apresentando distensão citoplasmática por mucina e deslocamento periférico nuclear. Destaque para a presença de imunoexpressão de CK20, marcada em castanho (LSAB contra-corada com hematoxilina de Harris, 40x). **Fonte:** Rous Patologia Animal Ltda, 2017.

Em associação foi observada importante atividade proliferativa em população neoplásica, com imunopositividade nuclear para Ki-67 em 20% das células tumorais (Figura 2). O valor prognóstico da expressão de Ki-67 em carcinomas gástricos em humanos não é consensual, identificando-se resultados contraditórios na literatura^{56,57}. No entanto, em geral, os valores detectados em carcinomas gástricos humanos são superiores ao observado neste caso.

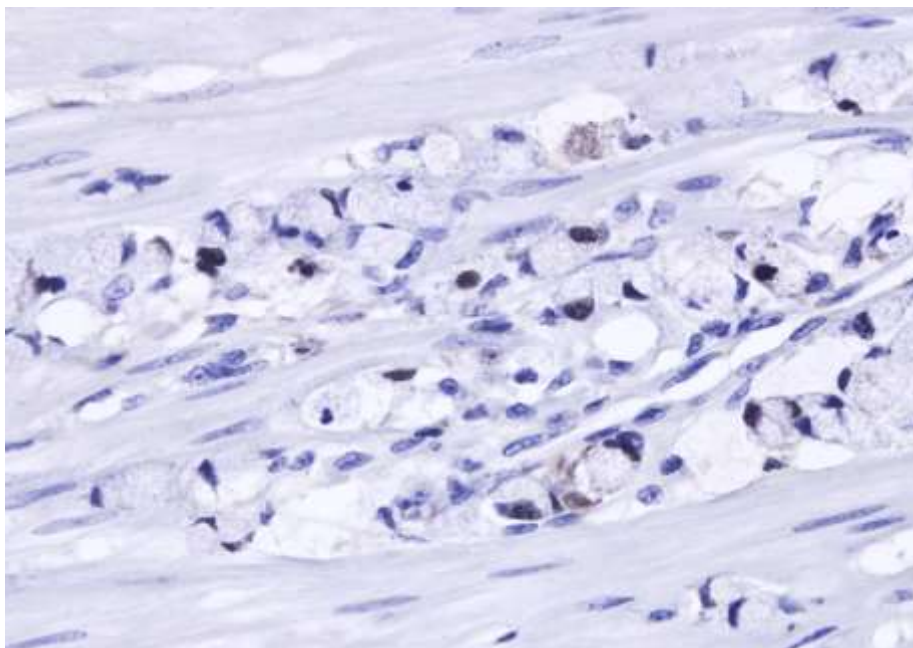


Figura 2. Fotomicrografia de corte histológico de estômago, evidenciando expansão de população neoplásica, disposta em cordão, apresentando distensão citoplasmática por mucina e deslocamento periférico nuclear. Destaque para a presença de imunoexpressão nuclear de Ki-67, marcada em castanho (LSAB contra-corada com hematoxilina de Harris, 40x). **Fonte:** Rous Patologia Animal Ltda, 2017.

A via de sinalização de EGF tem sido estudada em uma série de condições neoplásicas, estando envolvida na carcinogênese de diversos tipos tumorais, como neoplasias de mama, ovário, glândula salivar, próstata, pulmão e estômago⁵³. O gene HER-2 codifica para o receptor de fator epidérmico (EGF-R), participando na iniciação, progressão e metastatização neoplásicas⁵⁵. O desenvolvimento do trastuzumab, um anticorpo monoclonal que se liga diretamente ao domínio extracelular de HER-2, bloqueando sua atividade, representou uma importante alternativa terapêutica em tumores que expressam HER-2, tornando a pesquisa de sua expressão uma valiosa estratégia para a terapêutica. Não houve detecção de HER-2 nos cortes analisados. No entanto, em estudo prévio, foi caracterizada expressão de HER-2 na maioria dos adenocarcinomas gástricos, relacionando-se a pior prognóstico, analogamente ao observado em humanos⁴².

Em conformidade com a referida agressividade do GSRCC, no momento do diagnóstico foi identificada, em paralelo à lesão primária, foco de disseminação nodal, agravando o prognóstico do animal. Apesar do diagnóstico da neoplasia maligna, a tutora do animal optou por não realizar o tratamento quimioterápico, sendo apenas

mantido o protocolo de suporte visando a antagonização dos sinais clínicos apresentados pelo animal, composto por tratamento via oral com Omeprazol (1 mg/kg SID), Ranitidina (2 mg/kg BID), Dipirona (25 mg/kg TID), Metronidazol (15 mg/kg BID), Enrofloxacino (5 mg/kg SID), Prednisona (1 mg/kg BID), Micofenolato (10 mg/kg BID), Maropitant (2 mg/kg SID) e Ondasetrona (1 mg/kg BID). O tratamento se manteve durante 5 meses e com a progressão dos sinais clínicos optou-se pela eutanásia.

Uma particularidade a ser ressaltada no caso descrito é o histórico de gastrite crônica, com diagnóstico estabelecido há um ano. A relação entre inflamação e câncer há muito tempo tem povoado a literatura médica, tendo sido aclarados, recentemente, aspectos moleculares do processo, envolvendo a instabilidade de microssatélites e a inibição de vias de reparo do DNA⁵⁸. Na espécie humana, foi evidenciada a relação entre infecção por *Helicobacter pylori* e o desenvolvimento de carcinoma gástrico, evento não caracterizado em cães⁵⁹.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este relato buscou investigar uma condição neoplásica de ocorrência infrequente, associada a sinais clínicos inespecíficos e importante agressividade biológica, na qual a associação de técnicas de diagnóstico por imagem, histopatologia convencional e imuno-histoquímica viabilizam a identificação da condição, estabelecimento do prognóstico e terapêutica apropriadas. Em paralelo, o conhecimento acerca da condição pode contribuir para a utilização da condição em cães como um modelo de estudo para a doença na espécie humana.

REFERÊNCIAS

1. DIAZ, E. E. F.; SAITO, R. F.; CHAMMAS, R. Introdução ao câncer. In: SAITO et al. **Fundamentos da Oncologia Molecular**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, cap. 1, p. 1-14., 2016.
2. SCHIFFMAN, J. D.; BREEN, M. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 370, n. 1673, p.1-13, 2015.
3. DORN, C. Richard "The epidemiology of cancer in animals." **California Medicine**, v. 107, n. 6, p. 481, 1967.
4. SCANZIANI, E.; GUALTIERI, M.; FONDA, D. Gastric carcinoma in the dog: a clinicopathological study of 11 cases. **Journal of Small Animal Practice**, v. 30, n. 6, p. 353-360, 1989.
5. SWANN, H. M.; HOLT, D. E. Canine gastric adenocarcinoma and leiomyosarcoma: a retrospective study of 21 cases (1986–1999) and literature review. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 38, n. 2, p. 157-164, 2002.
6. TORRE, L. A., BRAY, F., SIEGEL, R. L., FERLAY, J., LORTET-TIEULENT, J., JEMAL, A. Global cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.
7. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. Estômago. Rio de Janeiro: INCA, 2013. Disponível em:
<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/estomago/definicao>>. Acesso em: 20 jun. 2017.
8. ROWELL, J. L.; MCCARTHY, D. O.; ALVAREZ, C. E. Dog models of naturally occurring cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 7, p. 380-388, 2011.
9. VAIL, D. M.; MACEWEN, E. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. **Cancer Investigation**, v. 18, n. 8, p. 781-792, 2000.

10. GUALTIERI, M.; MONZEGLIO, M. G.; SCANZIANI, E. Gastric neoplasia. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 29, n. 2, p. 415-40, 1999.
11. LI-CHANG, H. H.; KASAIAN, K.; NG, Y.; LUM, A.; KONG, E.; LIM, H.; YIP, S. Retrospective review using targeted deep sequencing reveals mutational differences between gastroesophageal junction and gastric carcinomas. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 32, 2015.
12. PANG, L. Y.; ARGYLE, D. L. Using naturally occurring tumours in dogs and cat to study telomerase and cancer stem cell biology. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1792, n. 4, p. 380-91, 2009.
13. MELO, N. C.; PAVANELLI, A. C.; SICHERO, L. Carcinogênese química e física. In: SAITO et al. **Fundamentos da Oncologia Molecular**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, cap. 1, p. 53-80, 2015.
14. GONZALEZ, C. A.; LUJAN-BARROSO, L.; JENAB, M.; DUELL, E. J.; AGUDO, A.; TJØNNELAND, A.; KAAKS, R. Fruit and vegetable intake and the risk of gastric adenocarcinoma: A reanalysis of the european prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC-EURGAST) study after a longer follow-up. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 12, p. 2910-2919, 2012.
15. WADHWA, R.; SONG, S.; LEE, J. S.; YAO, Y.; WEI, Q.; AJANI, J. A. Gastric cancer [mdash] molecular and clinical dimensions. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 10, n. 11, p. 643-655, 2013.
16. WROBLEWSKI, L. E.; PEEK, R. M. Helicobacter pylori in gastric carcinogenesis: mechanisms. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 42, n. 2, p. 285-298, 2013.
17. CORREA, P.; HOUGHTON, J. Carcinogenesis of Helicobacter pylori. **Gastroenterology**, v. 133, n. 2, p. 659-672, 2007.
18. AMORIM, I.; FREITAS, D. P.; MAGALHÃES, A.; FARIA, F.; LOPES, C.; FAUSTINO, A. M.; GÄRTNER, F. A comparison of Helicobacter pylori and non-Helicobacter pylori Helicobacter spp. Binding to Canine Gastric Mucosa with Defined Gastric Glycophenotype. **Helicobacter**, v. 19, n. 4, p. 249-259, 2014.

19. CATTOLI, G.; VAN VUGT, R.; ZANONI, R. G.; SANGUINETTI, V.; CHIOCCHETTI, R.; GUALTIERI, M.; KUSTERS, J. G. Occurrence and characterization of gastric *Helicobacter* spp. in naturally infected dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 239-250, 1999.
20. HERMANN, W.; KREGEL, K.; BREUER, W.; LECHNER, J. *Helicobacter*-like organisms: histopathological examination of gastric biopsies from dogs and cats. **Journal of Comparative Pathology**, v. 112, n. 3, p. 307-318, 1995.
21. SCANZIANI, E.; GIUSTI, A. M.; GUALTIERI, M.; FONDA, D. Gastric carcinoma in the Belgian shepherd dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 32, n. 9, p. 465-469, 1999.
22. SEIM-WIKSE, T.; JÖRUNDSSON, E.; NØDTVEDT, A.; GROTMOL, T.; BJORNVAD, C. R.; KRISTENSEN, A. T.; SKANCKE, E. Breed predisposition to canine gastric carcinoma-a study based on the Norwegian canine cancer register. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 55, n. 1, p. 25, 2013.
23. SULLIVAN, M.; LEE, R.; FISHER, E. W.; NASH, A. S.; MCCANDLISH, I. A. A study of 31 cases of gastric carcinoma in dogs. **The Veterinary Record**, v. 120, n. 4, p. 79-83, 1987.
24. SEIM-WIKSE, T.; KOLBJØRNSSEN, Ø.; JÖRUNDSSON, E.; BENESTAD, S. L.; BJORNVAD, C. R.; GROTMOL, T.; SKANCKE, E. Tumour gastrin expression and serum gastrin concentrations in dogs with gastric carcinoma are poor diagnostic indicators. **Journal of Comparative Pathology**, v. 151, n. 2, p. 207-211, 2014.
25. SUGIHARA, H.; TSUCHIHASHI, Y.; HATTORI, T.; FUKUDA, M.; FUJITA, S. Cell proliferation and cell loss in intramucosal signet ring cell carcinoma of canine stomachs induced by N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 110, n. 2, p. 87-94, 1985.
26. SUGIHARA, H.; HATTORI, T.; IMAMURA, Y.; NORIKI, S.; FUKUDA, M.; KATSURA, K.; FUJITA, S. Morphology and modes of cell proliferation in earliest signet-ring-cell carcinomas induced in canine stomachs by N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 117, n. 3, p. 197-204, 1991.

27. SUNAGAWA, M.; TAKESHITA, K.; NAKAJIMA, A.; OCHI, K.; HABU, H.; ENDO, M. Duration of ENNG administration and its effect on histological differentiation of experimental gastric cancer. **British Journal of Cancer**, v. 52, n. 5, p. 771, 1985.
28. KOLBJORNSEN, O.; PRESS, C.; LANDSVERK, T. Gastropathies in the Lundehund. **APMIS**, v. 102, n. 7-12, p. 647-661, 1994.
29. QVIGSTAD, G.; KOLBJORNSEN, O.; SKANCKE, E.; WALDUM, H. L. Gastric neuroendocrine carcinoma associated with atrophic gastritis in the Norwegian Lundehund. **Journal of Comparative Pathology**, v. 139, n. 4, p. 194-201, 2008.
30. LECOINDRE, P.; BYSTRICKA, M.; CHEVALLIER, M.; PEYRON, C. Gastric carcinoma associated with Menetrier's-like disease in a West Highland white terrier. **Journal of Small Animal Practice**, v. 53, n. 12, p. 714-718, 2012.
31. MUNDAY, J. S.; ABERDEIN, D.; CULLEN, G. D.; FRENCH, A. F. Ménétrier disease and gastric adenocarcinoma in 3 Cairn terrier littermates. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 6, p. 1028-1031, 2012.
32. LEE, H. C.; KIM, J. H.; JEE, C. H.; LEE, J. H.; MOON, J. H.; KIM, N. H.; JUNG, D. I. A case of gastric adenocarcinoma in a Shih Tzu dog: successful treatment of early gastric cancer. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 76, n. 7, p. 1033-1038, 2014.
33. WITHROW, S. J.; PAGE, R.; VAIL, D. M. **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology-E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2013.
34. LORENZEN, S.; LORDICK, F. How will human epidermal growth factor receptor 2-neu data impact clinical management of gastric cancer? **Current Opinion in Oncology**, v. 23, n. 4, p. 396-402, 2011.
35. GONZALEZ, A. P.; MELO, C. M.; CHAMMAS, R. Invasão tumoral e metástase. In: SAITO et al. **Fundamentos da Oncologia Molecular**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, cap. 1, p. 1-14, 2015.
36. VON BABO, V.; EBERLE, N.; MISCHKE, R.; MEYER-LINDENBERG, A.; HEWICKER-TRAUTWEIN, M.; NOLTE, I.; BETZ, D. Canine non-hematopoietic gastric neoplasia. **Tierärztliche Praxis Kleintiere**, v. 40, n. 4, p. 243-249, 2012.

37. MAROLF, A. J.; BACHAND, A. M.; SHARBER, J.; TWEDT, D. C. Comparison of endoscopy and sonography findings in dogs and cats with histologically confirmed gastric neoplasia. **Journal of Small Animal Practice**, v. 56, n. 5, p. 339-344, 2015.
38. FENOGLIO-PREISER, C.; CARNEIRO, F.; CORREA, P.; GUILFORD, P.; LAMBERT, R.; MEGRAUD, F.; STOLTE, M. Gastric carcinoma. **Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System**, v. 1, p. 35-52, 2000.
39. KIM, D. Y.; PARK, Y. K.; JOO, J. K.; RYU, S. Y.; KIM, Y. J.; KIM, S. K.; LEE, J. H. Clinicopathological characteristics of signet ring cell carcinoma of the stomach. **ANZ Journal of Surgery**, v. 74, n. 12, p. 1060-1064, 2004.
40. HENSON, D. E.; DITTUS, C.; YOUNES, M.; NGUYEN, H.; ALBORES-SAAVEDRA, J. Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973–2000: increase in the signet ring cell type. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 128, n. 7, p. 765-770, 2004.
41. CARRASCO, V.; CANFRÁN, S.; RODRÍGUEZ-FRANCO, F.; BENITO, A.; SÁINZ, A.; RODRÍGUEZ-BERTOS, A. Canine gastric carcinoma: immunohistochemical expression of cell cycle proteins (p53, p21, and p16) and heat shock proteins (Hsp27 and Hsp70). **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 322-329, 2011.
42. TERRAGNI, R.; GARDINI, A. C.; SABATTINI, S.; BETTINI, G.; AMADORI, D.; TALAMONTI, C.; ULIVI, P. EGFR, HER-2 and KRAS in canine gastric epithelial tumors: a potential human model? **PloS One**, v. 9, n. 1, e85388, 2014.
43. PERNOT, S.; VORON, T.; PERKINS, G.; LAGORCE-PAGES, C.; BERGER, A.; TAIEB, J. Signet-ring cell carcinoma of the stomach: Impact on prognosis and specific therapeutic challenge. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 40, p. 11428, 2015.
44. SIEGEL, R.; MA, J.; ZOU, Z.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2014. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 64, n. 1, p. 9-29, 2014.
45. LU, M.; YANG, Z.; FENG, Q.; YU, M.; ZHANG, Y.; MAO, C.; TANG, J. The characteristics and prognostic value of signet ring cell histology in gastric cancer: A

retrospective cohort study of 2199 consecutive patients. **Medicine**, v. 95, n. 27, 2016.

46. KRISTIE, M.; KATIĆ, V. Histological, histochemical and immunohistochemical features of gastric signet ring cell carcinoma. **Vojnosanitetski Pregled**, v. 65, n. 11, p. 835-838, 2008.

47. TAGHAVI, S.; JAYARAJAN, S. N.; DAVEY, A.; WILLIS, A. I. Prognostic significance of signet ring gastric cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 28, p. 3493-3498, 2012.

48. TIAN, M. M.; ZHAO, A. L.; LI, Z. W.; LI, J. Y. Phenotypic classification of gastric signet ring cell carcinoma and its relationship with clinicopathologic parameters and prognosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 23, p. 3189, 2007.

49. ALVES, V.F.; BACCHI, C.E.; VASSALLO, J. Garantia de qualidade em imuno-histoquímica. In. ALVES, V.F.; BACCHI, C.E.; VASSALLO, J. **Manual de Imuno-histoquímica**, São Paulo, Sociedade Brasileira de Patologia, p. 1-9, 1999.

50. BOSMAN, F. T.; CARNEIRO, F.; HRUBAN, R. H.; THEISE, N. D. **WHO classification of tumours of the digestive system**. World Health Organization, 2010.

51. TERADA, T. An immunohistochemical study of primary signet-ring cell carcinoma of the stomach and colorectum: I. Cytokeratin profile in 42 cases. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 6, n. 4, p. 703, 2013.

52. WANG, N. P.; ZEE, S.; ZARBO, R. J.; BACCHI, C. E.; GOWN, A. M. Coordinate expression of cytokeratins 7 and 20 defines unique subsets of carcinomas. **Applied immunohistochemistry**, v. 3, n. 2, p. 99-107, 1995.

53. GRAVALOS, C.; JIMENO, A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. **Annals of Oncology**, v. 19, n. 9, p. 1523-1529, 2008.

54. ESPINOSA DE LOS MONTEROS, A.; FERNANDEZ, A.; MILLAN, M. Y.; RODRIGUEZ, F.; HERRAEZ, P.; MARTÍN DE LAS MULAS, J. Coordinate expression of cytokeratins 7 and 20 in feline and canine carcinomas. **Veterinary Pathology**, v. 36, n. 3, p. 179-190, 1999.
55. TERADA, T. Primary pure signet-ring cell adenocarcinoma of the urinary bladder: a report of three cases with an immunohistochemical study. **Medical Oncology**, v. 29, n. 4, p. 2866-2869, 2012.
56. ABDEL-AZIZ, A.; AHMED, R. A.; IBRAHIEM, A. T. Expression of pRb, Ki-67 and HER2/neu in gastric carcinomas: relation to different histopathological grades and stages. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 30, p. 1-7, 2017.
57. BOGER, C; BEHRENS, H. M.; ROCKEN, C. Ki-67 unsuitable marker of gastric cancer prognosis unmasks intratumoral heterogeneity. **Journal of Surgical Oncology**, v. 113, p. 46-54, 2016.
58. RAPOSO, T. P.; BEIRÃO, B. C. B.; PANG, L. Y.; QUEIROGA F.L., ARGYLE, D.J. Inflammation and cancer: till death tears them apart. **Veterinary Journal** v. 205, p. 161-174, 2015.
59. DE FALCO, M.; LUCARIELLO, A.; IAQUINTO, S.; ESPOSITO, V.; GUERRA, G.; DE LUCA A. Molecular mechanisms of *Helicobacter pylori* pathogenesis. **Journal of Cell Physiology**, doi101002/jcp 24933.
60. OWEN, L. N. The TNM Classification of tumors in domestic animals, 1st Ed. **World Health Organization**, Geneva, p. 20-80, 1980.

ANEXO A

Aspectos clínico-patológicos e imuno-histoquímicos de condrossarcoma nasal em cão: relato de caso. *Revista Nosso Clínico*, 2016, ano 19, n. 114, p. 34-36.



ANEXO B

Normas para publicação na revista Clínica Veterinária, a qual será submetida o artigo “Aspectos clínico-patológicos e imuno-histoquímicos de carcinoma gástrico de células em anel de sinete em um cão: relato de caso e revisão de literatura”.



Instruções aos autores

Revista Clínica Veterinária / Redação
Rua dr. José Elias 222 CEP 05043-030
São Paulo - SP
correspondencia@editoraguara.com.br

Indexações:

ISI Web of Knowledge - Zoological Record
Latindex
CAB Abstracts

Artigos científicos inéditos, como trabalhos de pesquisa, revisões de literatura e relatos de caso, enviados à redação são avaliados pela equipe editorial. Em face do parecer inicial, o material é encaminhado aos consultores científicos. A equipe decidirá sobre a conveniência da publicação, de forma integral ou parcial, encaminhando ao autor sugestões e possíveis correções.

Relatos de casos são utilizados para apresentação de casos de interesse, quer seja pela raridade, evolução inusitada ou técnicas especiais, que são discutidas detalhadamente.

Revisões são utilizadas para o estudo aprofundado de informações atuais referentes a um determinado assunto, a partir de análises críticas dos trabalhos de pesquisadores de todo o meio científico, publicados em periódicos de qualidade. Uma revisão deve apresentar no máximo até 15% de seu conteúdo proveniente de livros e no máximo 20% de artigos com mais de dez anos de publicação.

Trabalhos de pesquisa são utilizados para apresentar resultados, discussões e conclusões de pesquisadores que explorem fenômenos ainda não completamente conhecidos ou estudados. Nesses trabalhos, o bem-estar animal deve sempre receber atenção especial.

Para a primeira avaliação, os autores devem enviar pela Internet (correspondencia@editoraguara.com.br) um arquivo texto (.doc) com o trabalho, acompanhado de imagens digitalizadas em formato .jpg. As imagens digitalizadas devem ter, no mínimo, resolução de 300 dpi na largura de 9cm. Se os autores não possuem imagens digitalizadas, devem encaminhar pelo correio ao nosso departamento de redação cópias das imagens originais (fotos, slides ou ilustrações – acompanhadas de identificação de propriedade e autor). Devem ser enviadas também a identificação de todos os autores do trabalho (nome completo por extenso, RG, CPF, endereço residencial completo, telefones e e-mail). Além dos nomes completos, devem ser informadas as instituições às quais os autores estejam vinculados, bem como seus títulos no momento em que o trabalho foi escrito.

Todos os artigos, independentemente de sua categoria, devem ser redigidos em língua portuguesa e acompanhados de versões em língua inglesa e espanhola de: título, resumo (de 700 a

500 caracteres) e uniformes (3 e 5). Os títulos devem ser claros e ser grafados em letras minúsculas – somente a primeira letra da primeira palavra deve ser grafada em letra maiúscula. Os resumos devem ressaltar o objetivo, o método, os resultados e as conclusões, de forma concisa, dos pontos relevantes do trabalho apresentado. Os uniformes não devem constar do título. Devem ser dispostos do mais abrangente para o mais específico (eg. “cães, cirurgias, abscessos, próstata”). Verificar se os uniformes escolhidos constam dos “Descritores em Ciências de Saúde” da Bireme (<http://decs.bvs.br/>). Revisões de literatura não devem apresentar o subtítulo “Conclusões”. Sugere-se “Considerações finais”.

Não há especificação para a quantidade de páginas, dependendo esta do conteúdo explorado. Os assuntos devem ser abordados com objetividade e clareza, visando o público leitor – o clínico veterinário de pequenos animais.

Utilizar fonte arial tamanho 10, espaço simples e uma única coluna. As margens superior, inferior e lateral devem apresentar até 3cm. Não deixar linhas em branco ao longo do texto, entre títulos, após subtítulos e entre as referências.

No caso de todo o material ser remetido pelo correio, devem necessariamente ser enviados, além de uma apresentação impressa, uma cópia em CD-rom.

Imagens como fotos, tabelas, gráficos e ilustrações não podem ser cópias de literatura, mesmo que seja indicada a fonte. Devem ser utilizadas imagens originais dos próprios autores. Imagens fotográficas devem possuir indicação do fotógrafo e proprietário; e quando cedidas por terceiros, deverão ser obrigatoriamente acompanhadas de autorização para publicação e cessão de direitos para a Editora Guarã (fornecida pela Editora Guarã). Quadros, tabelas, fotos, desenhos, gráficos deverão ser denominados figuras e numerados por ordem de aparecimento das respectivas chamadas no texto. Imagens de microscopia devem ser sempre acompanhadas de barra de tamanho e nas legendas devem constar as objetivações utilizadas.

Evitar citar comentários que constem das introduções de trabalhos de pesquisas para não incomodar em ajuda. Procurar se restringir ao “Material e

métodos” e às “Conclusões” dos trabalhos. Sempre buscar pelas referências originais consultadas por esses autores.

As referências serão indicadas ao longo do texto apenas por números sobrescritos ao texto, que corresponderão à listagem ao final do artigo – autores e datas não devem ser citados no texto. Esses números sobrescritos devem ser dispostos em ordem crescente, seguindo a ordem de aparecimento no texto, e separados apenas por vírgulas (sem espaços). Quando houver mais de dois números em sequência, utilizar apenas hífen (-) entre o primeiro e o último dessa sequência, por exemplo são ^{1-4,24,25}. A apresentação das referências ao final do artigo deve seguir as normas atuais da ABNT 2002 (NBR 10520). Utilizar o formato v. para volume, n. para número e p. para página. Não utilizar “et al” – todos os autores devem ser relacionados. Não abreviar títulos de periódicos. Sempre utilizar as edições atuais de livros – edições anteriores não devem ser utilizadas. De modo geral, não serão aceitas apêndices, somente sendo utilizados para literatura não localizada e obras antigas de difícil acesso. As citações de obras de Internet devem seguir o mesmo procedimento das citações em papel, apenas com o acréscimo das seguintes informações: “Disponível em: <http://www.w3schools.com>. Acesso em: dia de mês de ano.” Somente utilizar o local de publicação de periódicos para títulos com incidência em locais distintos, como, por exemplo: Revista de Saúde Pública, São Paulo e Revista de Saúde Pública, Rio de Janeiro. De modo geral, não são aceitas como fontes de referências periódicos ou sites não indexados.

Não utilizar SID, BID e outros. Escrever por extenso “a cada 12 horas”, “a cada 8 horas” etc.

Com relação aos princípios éticos de experimentação animal, os autores deverão considerar as normas do SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório).

Informações referentes a produtos utilizados no trabalho devem ser apresentadas em rodapé, com chamada no texto com letra sobrescrita ao princípio ativo ou produto. No rodapé devem constar o nome comercial, fabricante, cidade e estado. Para produtos importados, informar também o país de origem, o nome do importador/distribuidor, cidade e estado.