

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP
PROGRAMA DE DOUTORADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E
EXPERIMENTAL

**EXPRESSÃO COORDENADA DE CERATINAS
7 E 20 EM CARCINOMAS MAMÁRIOS
DE CÃES E GATOS**

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

JOÃO PAULO BOCCIA

SÃO PAULO
2016

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP
PROGRAMA DE DOUTORADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E
EXPERIMENTAL

**EXPRESSÃO COORDENADA DE CERATINAS
7 E 20 EM CARCINOMAS MAMÁRIOS
DE CÃES E GATOS**

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

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Xavier

JOÃO PAULO BOCCIA

SÃO PAULO
2016

Boccia, João Paulo

Expressão coordenada de ceratinas 7 e 20 em carcinomas
mamários de cães e gatos / João Paulo Boccia. - 2016.

53 f. : il.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da
Universidade Paulista, São Paulo, 2016.

Área de Concentração:.Biologia da Diferenciação e
Transformação Celular.

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

1. Carcinoma mamário. 2. Ceratina 7. 3. Ceratina 20. 4. Cão. 5.
Imuno-histoquímica.. I. Título. II. Xavier, José Guilherme (orientador).

JOÃO PAULO BOCCIA

**EXPRESSÃO COORDENADA DE CERATINAS
7 E 20 EM CARCINOMAS MAMÁRIOS
DE CÃES E GATOS**

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

Aprovado em ____/____/____:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Universidade Paulista UNIP

Profa. Dra. Diva Denelle Spadacci Morena
Instituto Butantan

Prof. Dr. Antonio Matera
Universidade de São Paulo USP

Profa. Dra. Silvia Crusco
Universidade Paulista UNIP

Prof. Dr. Vicente Borelli
Universidade Paulista UNIP

AGRADECIMENTOS

Ao professor doutor José Guilherme Xavier, pela dedicação e ensinamentos durante a graduação e doutorado, e pelos esforços em *prol* da pesquisa e crescimento acadêmico da instituição. Minha eterna gratidão.

Agradeço à Universidade Paulista pelo apoio e oportunidade.

Aos professores e funcionários que participaram direta ou indiretamente deste projeto. Seremos eternamente amigos.

Ao assistente de coordenação Eduarda da Silva Oliveira pelo apoio e dedicação para com o nosso trabalho.

Aos técnicos Isaque Santana e Josiane S. Costa pelo auxílio no processamento imuno-histoquímico.

ABSTRACT: The keratins form a group of 20 acidic or basic proteins, constituents of the epithelial cytoskeleton with individualized expression throughout the tissues. Its presence may be useful in histogenic characterization in carcinomas of unknown primary site. In this study we evaluate the pattern of expression of keratins in breast carcinomas of canine and feline females using immunohistochemical procedure. Canine and feline mammary carcinomas excised at UNIP and UMESP Veterinary Hospitals were submitted to histological processing, classification and tumor graduation. This was followed by immunostaining with the use of mouse anti-keratin human 7 and 20 monoclonal antibodies, respectively, OV-TL 12/30 and K20-8 clones, both DAKO® with 1: 100 dilution; DAB LSAB detection system. The measurement of immunostaining was performed by mixed scores, integrating intensity and extension of the marking. 40 primary tumors and 4 nodal metastasis (in cats) were evaluated, predominating tubular and solid carcinomas, belong to different degrees of malignancy. As for immunophenotyping, there was predominance in dogs, of the double negativity, CK7- / CK20-, and in cats CK7+/CK20- corresponding respectively, to 75% (15/20) and 60,0% (12/20) of the samples. Solid and anaplastic carcinomas showed double negativity in the eleven cases analyzed. Divergent immunoexpression related to primary tumor was detected in 2 nodal lesions. The predominant immunophenotypic pattern was the double negativity in dogs, as opposed to that reported in the literature, and the isolated positivity for CK7 in cats, which suggests its use as preferential immunohistochemical profiles in breast carcinomas in these species. Such characterization shows to be particularly useful in the search of primary site of metastatic carcinomas of unknown origin in dogs and cats.

KEYWORDS: Cat, Dog, keratins, immunohistochemistry, Mammary carcinoma.

RESUMO: As ceratinas formam um grupo de 20 proteínas ácidas e básicas, constituintes do citoesqueleto, exibindo expressão particularizada em cada tecido. Sua expressão pode ser útil na caracterização histogênica de carcinomas de sítio primário desconhecido. Neste estudo avaliou-se o padrão de expressão de ceratinas em carcinomas mamários de cadelas e gatas com o emprego de procedimento imuno-histoquímico. Carcinomas mamários de cães e gatos excisados nos hospitais veterinários da Universidade Paulista e da Universidade Metodista de São Paulo foram processados histologicamente, classificados e graduados. Seguiu-se procedimento imuno-histoquímico com o emprego de anticorpos monoclonais de camundongos anti-ceratinas (K) 7 e 20 humanas, com o uso dos clones, respectivamente OV-TL 12/30 e K20-8, ambos da DAKO na diluição 1:100; com sistema de amplificação LSAB e DAB como cromógeno. A mensuração da imunomarcação foi realizada com o uso de escores mistos, considerando a intensidade e distribuição da marcação. Quarenta tumores primários e 4 metástases nodais (em gatos) foram avaliadas, predominando carcinomas tubulares e sólidos, com diferentes graus de malignidade. Em cães predominou a dupla negatividade, e em gatos K7+/K20-, respectivamente, em 75% (15/20) e 60% (12/20) das amostras. Carcinomas sólidos e anaplásicos apresentaram dupla negatividade nos 11 casos analisados. Imunoexpressão divergente em relação ao tumor primário ocorreu em duas lesões nodais. O padrão imunofenotípico de dupla negatividade predominante em cães, diferente do relatado em literatura, e a positividade isolada à K7 em gatos, devem ser compreendidos como os perfis imuno-histoquímicos preferenciais em carcinomas mamários dessas espécies. Essa caracterização pode ser particularmente útil na pesquisa pelo sítio primário em carcinomas metastáticos de origem desconhecida em cães e gatos.

PALAVRAS-CHAVE: Cão, Carcinoma mamário, Ceratinas, Gato, Imuno-histoquímica.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. EXPRESSÃO COORDENADA DE CERATINAS 7 E 20 EM CARCINOMAS MAMÁRIOS DE CÃES.

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3. RESULTADOS.....	15
4. DISCUSSÃO	19
5. CONCLUSÕES.....	22
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

CAPÍTULO 2. EXPRESSÃO COORDENADA DE CERATINAS 7 E 20 EM CARCINOMAS MAMÁRIOS DE GATOS.

1. INTRODUÇÃO.....	33
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3. RESULTADOS.....	39
4. DISCUSSÃO	44
5. CONCLUSÕES.....	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

CAPÍTULO 1. Expressão coordenada de ceratinas 7 e 20 em carcinomas mamários de cães

Boccia,¹ J. P.; Kleeb,² S. R.; Perinelli,³ A. F.; Lallo,¹ M. A.; Xavier,^{1,2} J. G.

¹ Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental; ² Docente do curso de Medicina Veterinária -UMESP; ³ Médica-veterinária autônoma

ABSTRACT- Boccia, J. P.; Kleeb, S. R.; Perinelli, A. F.; Lallo, M. A.; Xavier, J. G. 2016
[Coordinated expression of keratins 7 and 20 in canine breast carcinomas]

Unknown primary site tumors represent between 5% to 10% of tumor cases diagnosed in humans, with the predominance of carcinomas. Technological advancement allows the phenotypic characterization of tumor cells, particularly by researching their cytoskeletal components and surface molecules. In the epithelial neoplasias, the most widely molecules used are keratins, particularly keratins 7 and 20, which are useful in the histogenic discrimination of carcinomas of unknown origin. In dogs, the most prevalent carcinoma, which shows high metastatic potential, are those located in the breast. There were selected twenty breast carcinomas from the HOVET/UMESP Pathology Services that were classified histologically and by their degree, and then, they were submitted to immunohistochemical procedure, seeking the expression of keratins 7 and 20. There was predominance of tubular carcinomas followed by the solid ones. There were evaluated 8 grade I, 8 grade II, and 4 grade III tumor malignancy. The predominant immunophenotypic pattern, which was presented in 75% of the cases, was the one with double-negativity, suggesting its use as the immunophenotype preferential profile in breast carcinomas, in opposition to the reported in the literature. This characterization appears to be potentially useful in the research of primary site of canine metastatic carcinomas of unknown origin.

Index terms: Breast carcinoma, Dog, Immunohistochemistry, Keratin 7, Keratin 20

RESUMO: Os tumores de sítio primário desconhecido representam entre 5% - 10% dos casos diagnosticados em humanos, predominando os carcinomas. O avanço tecnológico permite a caracterização fenotípica das células tumorais, particularmente pela pesquisa de componentes de seu citoesqueleto e moléculas de superfície. Em neoplasias epiteliais as moléculas mais abordadas são as ceratinas, em particular as ceratinas 7 e 20, úteis na discriminação histogênica em carcinomas de origem desconhecida. Nos cães, os carcinomas de maior incidência, apresentando elevado potencial metastático, são os mamários. Foram selecionados 20 casos de carcinomas mamários provenientes dos arquivos Serviço de Patologia do HOVET/UMESP, classificados histologicamente, graduados e submetidos a procedimento imuno-histoquímico pesquisando-se a expressão das ceratinas 7 e 20. Predominaram os carcinomas tubulares seguidos dos carcinomas sólidos. Foram avaliados oito tumores de grau I, oito tumores de grau II e quatro tumores de grau III de malignidade. O padrão imunofenotípico predominante, presente em 75% dos casos, foi o de dupla negatividade, sugerindo-se sua utilização como perfil imuno-histoquímico preferencial em carcinomas mamários, em oposição ao relatado em literatura. Tal caracterização mostra-se potencialmente útil na pesquisa de sítio primário em carcinomas metastáticos de origem desconhecida em cães.

Termos de indexação: Cão, Carcinoma Mamário, Ceratina 7, Ceratina 20, Imuno-Histoquímica.

Introdução

A glândula mamária é um órgão complexo, sofrendo contínuas modificações durante a vida, particularmente devido ao crescimento corpóreo e à estimulação hormonal, existindo um amplo espectro de “normalidade” cito e histológica mamária (Russó et al. 1990). A mama consiste de díctulos, ductos terminais intralobulares e ductos terminais extralobulares, que drenam para o ducto interlobular constituindo a chamada unidade ductal tubular terminal (TDLU), (Ronnov-Jessen *et al.* 1996). Um exame cuidadoso de glândulas mamárias aparentemente normais de cadelas velhas pode revelar uma série de pequenas lesões, entre elas processos neoplásicos em estágios iniciais de desenvolvimento (Cameron & Fulkin, 1971).

Em cães os tumores de mama estão entre os problemas cínicos mais frequentes, compreendendo cerca de metade das neoplasias de cadelas adultas (Bostock, 1997). Predomina o acometimento de fêmeas com mais de 7 anos de idade, havendo controvérsias quanto à frequência dos tumores malignos de mama, com estudos relatando sua ocorrência entre 28% a 91% do total de casos (Gilbertson *et al.* 1983). Com frequência esses processos metastatizam, principalmente para linfonodos regionais e parênquima pulmonar, sendo eventualmente identificado o tumor metastático sem diagnóstico de neoplasia mamária anterior. Nessas situações é importante, para fins terapêuticos, a identificação do território de origem do carcinoma metastático. Um recurso recentemente aplicado à oncologia veterinária. A partir de seu emprego em oncologia humana se dá a pesquisa da expressão de ceratinas nas células neoplásicas (Espinosa De Los Monteros *et al.*, 1999). As ceratinas compreendem um grupo de filamentos intermediários integrantes do citoesqueleto, expressos principalmente em células epiteliais em diferentes localizações do organismo, presentes em epitélios simples, estratificados, ceratinizados e corneificados (Bragulla & Homberger, 2009).

Podem ser divididas, em tipo I (ácidas) e tipo II (básicas ou neutras), compreendendo, respectivamente, 28 e 26 variantes, particularizadas por diferenças no peso molecular e no ponto isoelétrico (Hermann *et al.*, 2007). Espinosa de los Monteros *et al.* 1999, evidenciaram a possibilidade da determinação do sítio primário desconhecido a partir de neoplasias metastáticas de cães e gatos associando a pesquisa de expressão das ceratinas (K) 7 e 20 à semelhança do utilizado em patologia humana (Wang *et al.*, 1995). Estas correspondem respectivamente à ceratinas de tipo II e I, sendo frequente a expressão associada destes 2 grupos de filamentos intermediários (Moll *et al.*, 1990). A ceratina 7 é um polipeptídeo de 54 kDa encontrado em vários epitélios simples, incluindo cervix, pulmão, mama, ducto biliar e ductos coletores renais, epitélio transicional da bexiga e mesotélio, estando ausente no epitélio do trato gastrointestinal, túbulos contorcidos proximais e distais renais e epitélio escamoso (Ramaekers *et al.*, 1990; Van Niekerk *et al.*, 1990). Já a ceratina 20 é uma proteína de 46 kDa expressa pelo epitélio intestinal, foveolar, urotélio e células de Merkel (Moll *et al.*, 1992). Como resultado da pesquisa da expressão das ceratinas 7 e 20, surgem 4 possíveis perfis de expressão: K7+/K20+, K7+/K20-, K7-/K20+, K7-/K20-.

O presente estudo visa ampliar o conhecimento acerca da expressão de ceratinas em neoplasias mamárias de cadelas, em especial de K7 e K20, através da pesquisa da expressão dessas ceratinas em carcinomas de diferentes tipos e graus histológicos, averiguando a adequação e a abrangência do emprego dessa combinação de marcadores para a identificação da histogênese de neoplasias mamárias, particularmente útil na pesquisa histogênica de tumorações metastáticas de origem desconhecida.

Material e Métodos

Foram utilizados fragmentos de peças cirúrgicas provenientes de cadelas portadoras de carcinomas mamários, atendidas junto ao HOVET-UMESP, fixadas em formol a 10%, emblocadas em parafina, submetidas à microtromia resultando em cortes de 4 μm , corados pela hematoxilina-eosina. Procedeu-se classificação histológica (Misdorp *et al.*, 1999) e graduação tumoral (Karayannopoulou *et al.*, 2005). Associou-se procedimento imuno-histoquímico, seguindo a metodologia descrita por HSU *et al.*, 1981. Cortes histológicos de 4 μm foram dispostos em lâminas silanizadas e submetidos à recuperação antigênica pelo calor úmido, contendo solução tampão de citrato de sódio a 0,01M, pH 6,5, por 5 minutos em ebulição. Depois do resfriamento da solução realizou-se lavagem das lâminas em PBS. Seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena através da incubação por 30 minutos em solução contendo 80% de álcool metílico e 20% de peróxido de hidrogênio 30 volumes, seguindo-se lavagem das lâminas por três vezes em PBS. A etapa seguinte foi a incubação com o anticorpo primário, diluído em solução composta por 0,5 ml de azida sódica a 5%, 0,25 ml de albumina bovina fração V (Sigma) a 5% e 12 ml de PBS. As lâminas permaneceram em câmara úmida por 12 horas a 4 °C. Seguiu-se a incubação com anticorpo secundário e complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, DAKO). Para a revelação foi empregada solução contendo cromógeno diaminobenzidina em 20 ml de PBS e mantida em freezer a 20 °C. Antes da utilização foi acrescentado 5 μl de peróxido de hidrogênio 30 volumes para cada 2 ml da solução cromógena, aplicando-se sobre a lâmina deixando reagir por um minuto. Procedeu-se a lavagem em água destilada, contracorando-se pela hematoxilina, seguindo-se desidratação, diafanização e montagem em resina sintética e lamínula. Os anticorpos utilizados foram: anticorpo monoclonal de camundongo anticeratina 7 humana, clone OV-TL 12/30, DAKO®; diluição 1:100; o anticorpo

monoclonal de camundongo anticeratina 20 humana, clone K_s20-8, DAKO®; diluição 1:100.

Durante todo o procedimento foram utilizados controles positivos externos e internos, estes representados por glândulas apócrinas cutâneas.

A mensuração da imunomarcação foi procedida com o uso de escores mistos, a partir da determinação qualitativa (intensidade de coloração) e semiquantitativa (porcentagem de células positivas) à objetiva de 40 aumentos, segundo as seguintes escalas que, somadas, originam os escores abaixo descritos (Soini *et al.*, 2001; Sampaio-Góes *et al.*, 2005):

- Escala qualitativa:

0 = marcação ausente

1 = fraca

2 = moderada

3 = intensa

4 = muito intensa

- Escala semiquantitativa:

0 = marcação ausente

1 = < 25% de células apresentando citoplasma positivo

2 = 25-50% de células apresentando citoplasma positivo

3 = 50-75% de células apresentando citoplasma positivo

4 = > 75% de células apresentando citoplasma positivo

- Escores mistos:

0 = marcação ausente

1 = imunorreatividade fraca (soma de escalas de 0 a 4)

2 = imunorreatividade intensa (soma de escalas de 5 a 8)

Resultados

Foram avaliados 20 carcinomas mamários, provenientes de peças cirúrgicas de animais atendidos no HOVET/UMESP. A amostragem compreendeu animais entre 6 e 15 anos, apresentando idade média de 9,9 anos. Os tipos histológicos predominantes foram os carcinomas tubulares (50%, 10/20) e os sólidos (40%, 8/20). Em relação à graduação histológica, foram avaliados 8 carcinomas de grau I, 8 de grau II e 4 de grau III de malignidade (Tabela 1). O painel imuno-histoquímico evidenciou o predomínio de tumores com dupla negatividade para os marcadores, estando o perfil K7-/K20- presente em 75% dos casos (15/20) (Tabela 2). Considerando-se os padrões histológicos das neoplasias mamárias, a positividade para as ceratinas mostrou-se restrita às variantes tubulares com padrão focal, sendo de intensidade moderada a fraca para K7 em quatro casos de carcinomas tubulares (Tabela 2/Figura 1) e fraca para K20 em dois casos (Tabela 2/Figura 2). Identificou-se a coexpressão de ceratinas em apenas uma ocasião. Carcinomas sólidos e anaplásicos apresentaram dupla negatividade nos nove casos analisados. Em relação ao grau de malignidade, a expressão de ceratinas mostrou-se sempre focal, sendo, porém, mais frequente nos tumores bem diferenciados, 3/8, ocorrendo nessas neoplasias de grau I de malignidade o único caso de expressão de intensidade moderada e o de coexpressão de ceratinas. Nas neoplasias de graus II e III identificou-se apenas um caso de expressão fraca e focal em cada grupo.

Tabela 1. Relação dos casos de cadelas portadoras de carcinomas mamários avaliadas, considerando-se raça, idade, classificação e graduação histopatológicas. SRD: sem raça definida.

Caso	raça	idade	classificação	graduação
1	SRD	9	tubular simples	II
2	cocker spaniel inglês	8	tubular simples	I
3	yorkshire terrier	6	túbulo-papilífero simples	I
4	SRD	11	túbulo-papilífero simples	I
5	pinscher	8	túbulo-papilífero simples	II
6	poodle	9	túbulo-papilífero simples	II
7	SRD	8	túbulo-papilífero simples	I
8	SRD	7	tubular complexo	III
9	SRD	10	tubular complexo	I
10	SRD	10	tubular complexo misto	I
11	cocker spaniel inglês	6	mucinoso	I
12	SRD	9	sólido simples	II
13	SRD	11	sólido simples	III
14	SRD	12	sólido simples	II
15	SRD	12	sólido simples	II
16	SRD	12	sólido simples	II
17	teckel	12	sólido simples	III
18	pinscher	15	sólido complexo	I
19	SRD	15	sólido misto	II
20	poodle	8	anaplásico	III

Tabela 2. Perfil de imunorreatividade dos carcinomas mamários de cadelas às ceratinas 7 e 20, considerando-se aspectos qualitativos e quantitativos, sendo EQL: escore qualitativo, com 0: marcação ausente, 1: fraca, 2: moderada, 3: intensa, 4: muito intensa; EQT: escore quantitativo com 0: marcação ausente, 1: < 25% das células marcadas, 2: de 25-50% das células marcadas, 3: de 50-75% de células marcadas, 4: >75% das células marcadas; e EM: escore misto com 0: marcação ausente, 1: imunorreatividade fraca, 2: imunorreatividade intensa.

CASO	EQL/CK7	EQLCK20	EQT/CK7	EQT/CK20	EM/CK7	EM/CK20
1	2	0	1	0	1	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	2	1	1	1	1	1
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	1	0	1	0	1	0
9	0	1	0	1	0	1
10	1	0	1	0	1	0
11	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0

Em termos quantitativos, a imunomarcação mostrou-se constantemente focal, nunca envolvendo mais do que 10% das células tumorais. Em relação à intensidade de coloração detectou-se marcação citoplasmática de moderada a fraca.

Figura 1- Fotomicrografia de carcinoma tubular complexo misto de mama, grau I de malignidade, apresentando imunopositividade de células tumorais para K7 (LSAB, contra-corado com hematoxilina de Harris, 40x).

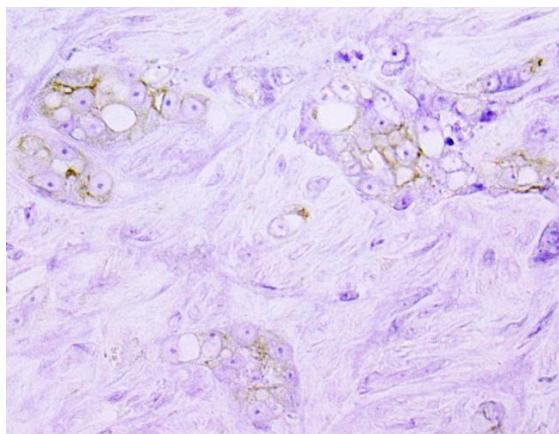
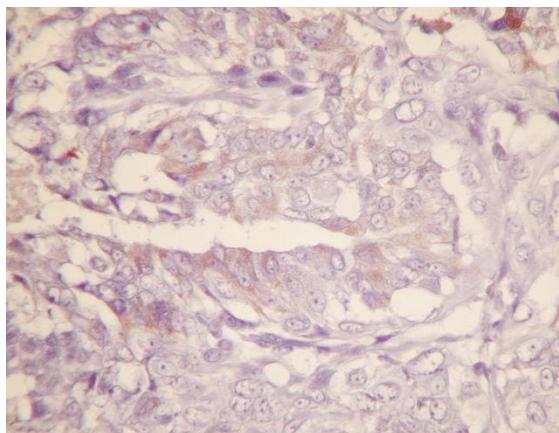


Figura 2- Fotomicrografia de carcinoma tubular complexo de mama, grau I de malignidade, apresentando imunopositividade de células tumorais para K20 (LSAB, contracorado com hematoxilina de Harris, 40x).



Discussão

Os tumores de sítio primário desconhecido representam uma importante faixa dentro da casuística oncológica, correspondendo, na espécie humana, entre 5%-10% dos casos diagnosticados nos Estados Unidos e na Europa (Klein, 2009). Dentre os mais de duzentos tipos distintos de câncer, os de origem epitelial são os de maior incidência na espécie humana, e em consequência os mais estudados (De Palma & Hanahan, 2012). Considerando o fato que em geral a expressão de ceratinas guarda relação com a origem da célula, e tende a ser preservada quando da transformação neoplásica em carcinomas, desenvolveu-se este estudo (Karantza, 2011). A idade média de aproximadamente dez anos espelhou o período de maior ocorrência de carcinomas mamários em cadelas (Lana *et al.*, 2007). Também os tipos histológicos predominantes foram os mais frequentes na espécie canina, sendo ocasionais casos de carcinomas mucinosos e anaplásicos. As glândulas apócrinas dérmicas mostraram-se adequadas como controles positivos internos da imunomarcação por exibirem dupla positividade, para K7 e K20. Também a utilização de anticorpos anti-humanos mostrou-se útil para o estudo em cães, dada a ampla reatividade cruzada desses filamentos intermediários entre espécies (Lazarides, 1980).

Embora exista uma grande diversidade de ceratinas, a escolha das ceratinas 7 e 20 para a pesquisa fundamenta-se em sua expressão variável, particularmente em adenocarcinomas, ao contrário do observado em relação às ceratinas 8,18 e 19, perenemente expressas nessas condições (Karantza, 2011), porém inespecíficas para o tecido mamário. A expressão de ceratinas limitou-se aos carcinomas tubulares, com graus variados de malignidade, inexistindo nas demais variantes histológicas avaliadas (carcinomas mucinosos, sólidos e anaplásicos). A frequente dupla negatividade e a fraca

positividade focal para K7 nos carcinomas mamários divergem de estudos anteriores. Vos *et al.*, 1993, identificaram, em cortes de congelação, imunopositividade para a K7 em carcinomas sólidos de mama utilizando o anticorpo RCK 105. Espinosa de los Monteros *et al.*, 1999, identificaram perfil K7+/K20- em 56% dos carcinomas mamários avaliados (5 em 9 casos), identificando maior proporção de células marcadas (de 34% a 100%) do que o verificado neste estudo. A completa ausência de marcação para K7 e K20 em carcinomas sólidos e anaplásicos reforça a hipótese de relação entre a expressão destes filamentos intermediários e a diferenciação tumoral, visto que esses padrões são compreendidos como formas biologicamente avançadas e agressivas de carcinomas mamários, envolvendo importante comprometimento da diferenciação celular (Misdorp *et al.*, 1999). No entanto, embora a imunopositividade para ceratinas tenha sido mais frequente em neoplasias de baixo grau, também esteve presente em tumores de grau II e III de malignidade, evidenciando a maior complexidade da graduação tumoral, parâmetro que envolve outros critérios além dos estruturais, como atividade proliferativa celular. A identificação esporádica de K20 em carcinomas derivados de tecidos em que habitualmente não é expressa, à semelhança do observado neste estudo, foi anteriormente identificada na espécie humana (Moll *et al.*, 1992).

Tais resultados evidenciam o predomínio do fenótipo K7-/K20- em carcinomas mamários de cadelas, sendo a positividade para as ceratinas eventos focais e de baixa intensidade, sugerindo a inclusão desses processos no mais extenso grupo imunofenotípico de carcinomas caninos, caracterizado pela dupla negatividade para ceratinas 7 e 20, como o identificado em tumores hepatocelulares, pancreáticos, renais, bronquíolo-alveolares, endometriais, gástricos, uroteliais, prostáticos e mesoteliomas malignos (Espinosa De Los Monteros *et al.*, 1999). Essa similaridade imunofenotípica compromete o potencial discriminatório dessa combinação de marcadores em relação à

histogênese de carcinomas de origem desconhecida na espécie canina. Uma estratégia possível a ser testada passaria pela pesquisa da expressão de ceratinas acídicas 18 e 19, potenciais competidoras com a K20, nos carcinomas mamários. Outra alternativa seria o acréscimo de marcadores específicos para o tecido mamário, como a mamaglobina, glicoproteína hiperexpressa em 70 a 80% das biópsias de neoplasias mamárias humanas, tanto em sítios primários quanto metastáticos (Leygue *et al.*, 1999). Pandey *et al.*, 2015, identificaram elevação nos níveis séricos dessa glicoproteína em cadelas portadoras de neoplasia mamária. Assim, com a possibilidade do uso de estratégias variadas, o emprego de métodos imuno-histoquímicos ainda se apresenta como uma importante alternativa para elucidação da histogênese neoplásica em oncologia veterinária.

Conclusões

O padrão imunofenotípico predominante nos carcinomas mamários foi o de dupla negatividade para as ceratinas 7 e 20, sugerindo sua utilização como perfil imuno-histoquímico preferencial em carcinomas mamários, em oposição ao relatado em literatura. A expressão de ceratinas mostrou-se focal e restrita a alguns casos de carcinomas tubulares.

Referências Bibliográficas

- Bostock, D. E. 2009. Neoplasia Of The Skin And Mammary Glands In Dogs And Cats. In: Bragulla, H. H.; Homberger D. G. Structure And Functions Of Keratin Proteins In Simple, Stratified, Keratinized And Cornified Epithelia. *Journal Of Anatomy*, 214:516-59.
- Cameron, A. M., Faulkin, L. J. 1971. Hyperplastic And Inflammatory Nodules In The Canine Mammary Gland. *Journal Of The National Cancer Institute*, 47:1277-87.
- De Palma M. & Hanahan D. 2012. The Biology Of Personalized Cancer Medicine: Facing Individual Complexities Underlying Hallmark Capabilities. *Molecular Oncology*, 6:111-27.
- Espinosa De Los Monteros, A.; Fernandez, A.; Millán, M. Y.; Rodriguez, F.; Herráez, P. ; Martin De Las Mulas, J. 1999. Coordinate Expression Of Cytokeratins 7 And 20 In Feline And Canine Carcinomas. *Veterinary Pathology*, 36:179-90.
- Gilbertson S.R., Kurzman I.D., Zachrau R.E., Hurvitz A.I., Black M.M. 1983. Canine Mammary Neoplasms: Biologic Implications Of Morphologic Characteristics Assessed In 232 Dogs. *Veterinary Pathology*, 20:127-42.
- Herrmann, H.; Bar, H.; Kreplak, L.; Strelakov, S. V.; Aebi, U. 2007. Intermediate Filaments: From Cell Architecture To Nanomechanics. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 8:562-73.

Hsu, S. M.; Raine, L.; Fanger, H. 1981. Use Of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (Abc) In Immunoperoxidase Techniques: A Comparison Between Abc And Unlabeled Antibody (Pap) Procedures. *Journal Of Histochemistry And Cytochemistry*, .29:577-80.

Karantza, V. 2011. Keratins In Health And Cancer: More Than Mere Epithelial Cell Markers. *Oncogene*, 13:127-38.

Karayannopoulou, M.; Kaldrimidou, E.; Constantinidis, T. C.; Dessiris, A. 2005. Histological Grading And Prognosis In Dogs With Mammary Carcinomas: Application Of A Human Grading Method. *Journal Of Comparative Pathology*, 133:246-52.

Klein, C. A. 2009. Parallel Progression Of Primary Tumours And Metastases. *Nature Reviews Cancer*, 9:302-12.

Lana, S. E. & Rutteman, G. R. 2007 Withrow S.J. Tumors Of The Mammary Gland. In: Withrow & Macewen's Small Animal Clinical Oncology, 4th Ed., Philadelphia: Saunders Elsevier.

Lazarides, E. 1980. Intermediate Filaments As Mechanical Integrators Of Cellular Space. *Nature*, 283:249-56.

Leygue, E.I.; Snell, L.; Dotzlaw, H.; Hole, K.; Troup, S.; Hiller-Hitchcock, T; Murphy, L.C.; Watson, P.H. 1999. Mammaglobin, A Potencial Marker Of Breast Cancer Nodal Metastasis. *Journal Of Pathology*, 189: 28-33.

Misdorp, W.; Else, R.W.; Hellmén, E.; Lipscomb, T.P. 1999. World Health Organization International Histological Classification Of Tumors Of Domestic Animals, Washington, Armed Forces Institute Of Pathology.

Moll, R.; Schiller, D. L.; Franke, W.W. 1990. Identification Of Protein It Of The Intestinal Cytoskeleton As A Novel Type I Cytokeratin With Unusual Properties And Expression Patterns. *Journal Of Cell Biology*, 111:567-580.

Moll, R.; Lowe, A.; Laufer, J.; Franke, W.W. 1992. Cytokeratin 20 In Human Carcinomas. A New Histodiagnostic Marker Detected By Monoclonal Antibodies. *American Journal Of Pathology*, 140:427-47.

Pandey, M.; Kumar, B. V. S.; Verma, R. 2015. Mammaglobin As A Diagnostic Serum Marker Of Complex Canine Mammary Carcinomas. *Research In Veterinary Science*, 103:187-92.

Ramaekers, F.; Van Niekerk, C. C.; Poels, L.; Schaafsmma, E.; Huijsmann, A.; Robben, H.; Schaart, G.; Vooijs, P. 1990. Use Of Monoclonal Antibodies To Keratin 7 In the Differential Diagnosis Adenocarcinomas. *American Journal Of Pathology*, 136:641-55.

Ronnov-Jessen L.; Petersen, O. W.; Bissel, M. J. 1996. Cellular Changes Involved In Conversion Of Normal To Malignant Breast: Importance Of The Stromal Reaction. *Physiological Reviews*, 76:69-125.

Russo, J.; Gusterson, B.A.; Rogers A.E.; Russo, I.H.; Wellings, S.R.; van Zwieten, M.J. 1990. Biology Of Disease. Comparative Study Of Human And Rat Mammary Tumorigenesis, *Laboratory Investigation*, 62:244-78.

Sampaio-Góes, F. C. G.; 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.

Soini, Y.; Puhakka, A.; Kahlos, K.; Säily, M.; Pääkö, 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.

Van Niekerk, C. C.; Jap, P. H.; Ramaekers, F.; Van De Molengraft, F.; Poels, L. G. 1991. Immunohistochemical Demonstration Of Keratin 7 In Routinely Fixed Paraffin-Embedded Human Tissues. *Journal Of Pathology*, 165:145-52.

Vos, J. H.; Van Den Ingh, T. S. G. A. M.; Misdorp, W.; Molenbeek, R. F.; Van Mil, F. N.; Rutteman, G.R.; Ivanyi, D.; Ramaekers, F.C. 1993. Immunohistochemistry With Keratin, Vimentin, Desmin And A-Smooth Muscle Actin Monoclonal Antibodies In Canine Mammary Gland: Malignant Mammary Tumours. *Veterinary Quarterly*, 14:96-102.

Wang, N. P.; Zee, S.; Zarbo, R. J.; Bacchi, C. E.; Gown, A. M. 1995. Coordinate Expression Of Cytokeratins 7 And 20 Defines Unique Subsets Of Carcinomas. *Applied Immunohistochemistry*, 3:99-107.

CAPÍTULO 2 Expressão coordenada de ceratinas 7 e 20 em carcinomas mamários de gatos

Boccia,¹ JP; Kleeb,² SR; Silveira, LMG;³ Lallo, MA;¹ Xavier,^{1,2} JG.

¹ Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental; ² Docente do curso de Medicina Veterinária -UMESP; ³ Docente do curso de Medicina Veterinária-UNIP.

ABSTRACT - Boccia, J. P.; Kleeb, S. R.; Silveira, L.M.G.; Lallo, M. A.; Xavier, J. G. 2016 [Coordinated expression of keratins7 and 20 in feline breast carcinomas]

ABSTRACT: Mammary gland neoplasia corresponds near to 17% of feline tumors being approximately 85% malignant with tubular carcinoma, papillary, solid and cribriform in highlight. Regional lymph nodes and lung metastasis are frequent, with eventual diagnosis from metastatic tumor without mammary gland primary lesion evidence. For therapeutic purposes in this situations it is important the metastatic lesion histogenic identification. Keratins (K) expression research can be useful in this condition. Keratins are members of the cytoskeleton intermediate filament group, expressed mainly by epithelial cells in different locations of the organism, being recognized at least 20 different polypeptides. Particularly the expression of K 7 and 20 is suitable for the histogenic screening of epithelial tissues, contributing to the identification of the tissue origin. The aim of this study was to characterize the K 7 and 20 expression pattern in feline mammary carcinomas. To this end, 20 primary mammary neoplasms and 4 nodal metastases were submitted to immunostaining with anti-human mouse monoclonal antibodies for K 7 and 20, respectively, OV-TL clone 12/30 and clone Ks20-8, with amplification by the system LSAB (DAKO). The predominance of the K7 + /K20 profile was present in 60.0% of the cases in the primary tumors, with double negativity in 30% of samples and double positivity in 10%. These findings reinforce the adequacy of feline mammary carcinoma as a model in comparative mammary carcinogenesis. In the nodal lesions, immunophenotypic divergence was observed in relation to the primary tumor in 50% of the samples, indicating the possibility of divergence between the immunohistochemical profile of primary and secondary lesions. These findings corroborate a previous study, and

contribute to the efficacy of the primary site survey in metastatic tumors of unknown origin, also warning of the complexity of the process, with the possibility of immunophenotypic variations between primary and secondary lesions, suggesting the use of complementary techniques for the histogenic distinction of tumors.

Index terms: Mammary gland carcinoma, Feline, Immunohistochemistry, Keratin 7, Keratin 20.

RESUMO: Os neoplasmas mamários correspondem a aproximadamente 17% dos tumores em gatos, sendo cerca de 85% dos casos malignos, destacando-se os carcinomas tubulares, papilíferos, sólidos e cribriformes. Metástases para linfonodos regionais e pulmão são frequentes, com eventual diagnóstico a partir do tumor metastático, sem evidência de lesão mamária primária. Nessas situações é importante, para fins terapêuticos a identificação histogênica da lesão metastática. A pesquisa da expressão de ceratinas (K) teoricamente pode ser útil nessa condição. As K compreendem um grupo de filamentos intermediários integrantes do citoesqueleto, expressos principalmente por células epiteliais em diferentes localizações do organismo, sendo reconhecidos ao menos 20 polipeptídeos distintos. Particularmente, a expressão das K 7 e 20 mostra-se adequada para a triagem histogênica de tecidos epiteliais, contribuindo para a identificação da origem tecidual. Neste estudo, buscou-se, a partir da pesquisa da expressão das K 7 e 20, caracterizar o padrão de expressão de K em carcinomas mamários de gatas. Para tanto, vinte neoplasmas mamários primários, e quatro metástases nodais foram submetidas à imunomarcação com anticorpos monoclonais de camundongo anti-humano, para K 7 e 20, respectivamente, clone OV-TL 12/30 e clone K_s20-8, com amplificação pelo sistema LSAB (DAKO). Evidenciou-se, nos tumores primários, o predomínio do perfil K7+/K20-, presente em 60,0% dos casos, identificando-se dupla negatividade em 30% das amostras e dupla positividade em 10%. Tais achados reforçam a adequação do carcinoma mamário felino como modelo em carcinogênese mamária comparada. Nas lesões nodais houve divergência imunofenotípica em relação ao tumor primário em 50% das amostras, indicando a possibilidade de divergência entre o perfil imuno-histoquímico de lesões primárias e secundárias. Tais achados corroboram estudo anterior, e contribuem para a eficácia da pesquisa de sítio primário em tumores metastáticos de origem desconhecida, alertando

ainda para a complexidade do processo, com a possibilidade de variações imunofenotípicas entre lesões primárias e secundárias, sugerindo o emprego de técnicas complementares para a distinção histogênica de tumores.

Termos de indexação: Carcinoma mamário, Gato, Imuno-Histoquímica, Ceratina 7, Ceratina 20.

Introdução

Os tumores mamários correspondem a aproximadamente 17% dos neoplasmas em gatas, sendo a terceira condição oncológica em incidência na espécie superados apenas pelos tumores hemopoéticos e cutâneos (Carpenter *et al.*, 1987; Hayes *et al.*, 1981). Predomina o acometimento de fêmeas com média etária entre 10 e 12 anos de idade (Hayes *et al.*, 1981), havendo amplo predomínio dos processos malignos, correspondendo a pelo menos 85% das formações, destacando-se os carcinomas (Bostock, 1986). As variantes mais relatadas são tubulares, papilíferas, sólidas e cribriformes, com frequente combinação entre esses padrões (Misdorp *et al.*, 1999). Tais formações também são identificadas em machos, porém com frequência bem inferior, totalizando entre 1% e 5% dos tumores mamários (Skorupski *et al.*, 2005). Influências endócrinas estão envolvidas na gênese desses processos, havendo importante redução no risco de desenvolvimento tumoral em fêmeas castradas antes dos seis meses de idade (Overly *et al.*, 2005). Rastreando-se a expressão de receptores hormonais em neoplasmas mamários de gatas evidenciou-se baixa expressão de receptores estrogênicos, e intermediária expressão de receptores para a progesterona em processos benignos, com redução nos casos de malignidade (Rutteman *et al.*, 1991). Nesse sentido, o tumor de mama felino tem sido considerado um modelo para os carcinomas mamários humanos independentes de hormônios (Cardazzo *et al.*, 2005). Corroborando esses achados foi identificada a expressão de HER2 em carcinomas mamários de felinos, em uma proporção de 59% dos casos estudados por Millanta *et al.* (2005), implicando redução de sobrevida dos animais, à semelhança do observado na espécie humana (De Maria *et al.*, 2005). Rasotto *et al.* (2011), no entanto, não

identificaram relação entre prognóstico e expressão de HER2, em estudo com 78 animais.

Classicamente o meio mais empregado para o diagnóstico desses processos é a biópsia local sucedida por avaliação histopatológica da formação, identificando-se sua natureza com base em características morfológicas da área lesada. Embora um grande número de sistemas classificatórios para tumores mamários tenha sido desenvolvido, o mais empregado é o preconizado pela Organização Mundial de Saúde (Misdorp *et al.*, 1999).

Com frequência esses neoplasmas metastatizam, principalmente para linfonodos regionais e parênquima pulmonar (Meuten, 2002), sendo eventualmente identificado o tumor metastático sem diagnóstico anterior de neoplasma mamário (tumor mamário silencioso ou excisão cirúrgica remota), o que corresponde, na espécie humana, em centros industrializados, a cerca de 5% a 10% de todos os neoplasmas diagnosticados (Van De Wouw *et al.*, 2002). Nessas situações é importante, para fins terapêuticos, a identificação do território de origem do carcinoma metastático. Um recurso ainda pouco aplicado à oncologia veterinária, a partir de seu emprego em oncologia humana, é a pesquisa da expressão de ceratinas (K) nas células neoplásicas. As ceratinas compreendem um grupo de filamentos intermediários integrantes do citoesqueleto, expressos principalmente por células epiteliais em diferentes localizações do organismo, sendo reconhecidos ao menos 20 polipeptídeos distintos, particularizados por diferenças no peso molecular e no ponto isoelettrico, sendo numerados consecutivamente de 1 a 20 (Moll *et al.*, 1982). Em estudo prévio evidenciou-se a possibilidade da determinação do sítio primário tumoral a partir de neoplasias metastáticas de cães e gatos considerando-se a expressão das ceratinas 7 e 20, à semelhança do usado em patologia humana (Wang *et al.*, 1995; Espinosa De Los Monteros *et al.*, 1999). A K7 é um polipeptídeo de 54kDa

encontrado em vários epitélios simples, incluindo cérvix, pulmão, mama, ducto biliar e ductos coletores renais, epitélio transicional da bexiga e mesotélio, estando ausente no epitélio do trato gastrointestinal, túbulos contorcidos proximais e distais renais e epitélio escamoso (Ramaekers *et al.*, 1990; Van Niekerk *et al.*, 1990). Já a K20 é uma proteína de 46 kDa expressa pelo epitélio intestinal, foveolar, urotélio e células de Merkel (Moll *et al.*, 1992).

O presente estudo visa, com o emprego de técnica imuno-histoquímica, ampliar o conhecimento acerca dos carcinomas mamários de gatas, avaliando-se a expressão das K7 e K20 nesses tumores, averiguando a adequação e a abrangência do emprego dessa combinação de marcadores para a identificação desses neoplasmas, em sítios primários e focos metastáticos.

Material e métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, da Universidade Metodista de São Paulo, sob o protocolo 099/2012. Foram levantados os casos de carcinomas mamários em felinos arquivados junto aos Serviços de Patologia dos hospitais veterinários da Universidade Paulista, da Universidade Metodista de São Paulo e do Laboratório de Patologia Animal, reavaliando-se morfologicamente os casos para classificação histológica e graduação. A classificação seguiu o sistema proposto pela Organização Mundial de Saúde (Misdorp *et al.*, 1999), baseando-se na avaliação de ao menos dois observadores, sendo a graduação baseada em método proposto por Elston & Ellis, 1991, para neoplasmas mamários humanos. Associou-se procedimento imuno-histoquímico, seguindo a metodologia descrita por Hsu *et al.* (1981). Cortes histológicos de 4 μm foram dispostos em lâminas silanizadas e submetidos à recuperação antigênica pelo calor úmido, em solução tampão de citrato de sódio a 0,01M, pH 6,5, por 5 minutos em ebulação. Após resfriamento da solução realizou-se lavagem das lâminas em PBS. Seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena através da incubação por 30 minutos em solução contendo 80% de álcool metílico e 20% de peróxido de hidrogênio 30 volumes, seguindo-se lavagem das lâminas por três vezes em PBS. A etapa seguinte foi a incubação com o anticorpo primário, diluído em solução composta por 0,5 ml de azida sódica a 5%, 0,25 ml de albumina bovina fração V (Sigma) a 5% e 12 ml de PBS. As lâminas permaneceram em câmara úmida por 12 horas a 4 °C. Seguiu-se a incubação com anticorpo secundário e complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, DAKO). Para a revelação foi empregada solução contendo cromógeno diaminobenzidina em 20 ml de PBS e mantida em freezer a 20 °C. Antes da utilização foi acrescentado 5 μl de peróxido de hidrogênio 30 volumes

para cada 2 ml da solução cromógena, aplicando-se sobre a lâmina deixando reagir por um minuto. Procedeu-se a lavagem em água destilada, contracorando-se pela hematoxilina, seguindo-se desidratação, diafanização e montagem em resina sintética e lamínula. Os anticorpos utilizados foram: anticorpo monoclonal de camundongo anticeratina 7 humana, clone OV-TL 12/30, DAKO®; diluição 1:100; o anticorpo monoclonal de camundongo anticeratina 20 humana, clone K_s20-8, DAKO®; diluição 1:100. Estruturas lobulares íntegras foram utilizadas como controles internos.

Durante todo o procedimento foram utilizados controles positivos externos e internos, estes representados por glândulas apócrinas cutâneas.

A mensuração da imunomarcação foi procedida com o uso de método de escores mistos, a partir da determinação qualitativa (intensidade de coloração) e semiquantitativa (porcentagem de células positivas) à objetiva de 40 aumentos, segundo as seguintes escalas que, somadas, originam os escores abaixo descritos (Soini *et al.*, 2001; Sampaio-Góes *et al.*, 2005):

- Escala qualitativa:

0 = marcação ausente

1 = fraca

2 = moderada

3 = intensa

4 = muito intensa

- Escala semiquantitativa:

0 = marcação ausente

1 = < 25% de células apresentando citoplasma positivo

2 = 25-50% de células apresentando citoplasma positivo

3 = 50-75% de células apresentando citoplasma positivo

4 => 75% de células apresentando citoplasma positivo

- Escores mistos:

0 = marcação ausente

1 = imunorreatividade fraca (soma de escalas de 0 a 4)

2 = imunorreatividade intensa (soma de escalas de 5 a 8).

Resultados

Foram revisados e submetidos à avaliação imuno-histoquímica vinte casos de carcinomas mamários primários de gatas, sendo 4 casos acompanhados de lesões metastáticas nodais. Na Tabela 1 encontram-se relacionadas às amostras, acompanhadas das características raciais e etárias, diagnóstico e graduação histológicos e padrão de imunomarcação para K7 e K20. Predominaram animais sem raça definida, com média etária de 11 anos. Entre os padrões histológicos predominaram os carcinomas tubulares (12/20) e sua variante papilífera (3/20). Completaram a amostragem 2 tumores cribriformes, 2 sólidos e 1 carcinoma mucinoso. Quanto à graduação, foram 8 amostras de grau I, 10 de grau II e 2 de grau III (Tabela 1).

Foi identificada imunopositividade para K7 em 14 dos 20 tumores primários, e em 2 das 4 lesões metastáticas, todos envolvendo carcinomas de graus I ou II. Nenhum dos casos de lesões de grau III exibiu positividade para o marcador. Já a imunoexpressão de K20 foi identificada em dois carcinomas primários, sempre em associação com K7, estando ausente em lesões metastáticas. Os perfis de imunoexpressão encontrados nos carcinomas mamários primários de gatas foram K7+/K20- (Tabelas 1 e 2/Figura 1A), identificado em 60% dos casos (12/20), a dupla negatividade, presente em 30% das amostras (6/20) e dupla positividade em 10% dos casos (2/20) (Tabelas 1 e 2/Figura 1B). Nas lesões metastáticas o perfil imunofenotípico do tumor primário foi comum, K7+/K20-, evidenciando-se a reprodução do padrão de expressão da lesão primária em 50% das amostras (2/4) (Tabelas 1 e 2/Figuras 1C/D), com perda da expressão de K7 em relação à formação original nas 2 outras (2/4).

Considerando-se o padrão histológico, dos 12 carcinomas tubulares, 8 foram K7+/K20-, e 4 apresentaram dupla negatividade. Nos papilíferos 2 foram K7+/K20- e 1 exibiu dupla positividade. De forma análoga, entre os carcinomas cribriformes, 1

apresentou K7+/K20- e 1 dupla positividade. Em ambos os carcinomas sólidos não ficou identificada imunoexpressão das ceratinas testadas.

Relacionando-se grau histológico e o perfil de imunoexpressão, dentre os 10 casos de tumores de grau II de malignidade, 80% (8/10) apresentaram o perfil K7+/K20-, e 2 dupla positividade. Já entre as amostras de baixo grau, 50% (4/8) foram K7+/K20- e 50% (4/8) exibiram dupla negatividade, achado presente em todos os carcinomas de alto grau de malignidade (Tabela 1).

Quanto à intensidade da marcação, observou-se, tanto em lesões primárias quanto em metástases, o predomínio de marcação citoplasmática de fraca intensidade para K7(9/20), porém com distribuição variável, abrangendo, em geral, até 50% das células (12/20). Nos casos em que houve expressão de K20, esta se apresentou de fraca intensidade, com distribuição alcançando até 25% das células em uma amostra, e até 50% em outra (Tabela 2).

Tabela 1. Características etárias, raciais, classificação e graduação histológicas e padrão de imunoexpressão de ceratinas 7 e 20 em gatas portadoras de carcinomas. As amostras grafadas com linhas correspondem às lesões metastáticas.

caso	raça	idade (a)	carcinoma	grau	K7	K20
01	SRD	10	mucinoso	II	(+)	(-)
02	siamês	13	tubular	II	(+)	(-)
03	SRD	13	sólido	III	(-)	(-)
04	SRD	15	tubular	II	(+)	(-)
05	SRD	15	tubular	I	(+)	(-)
06	siamês	12	tubular	II	(+)	(-)
07	siamês	12	tubular	II	(+)	(-)
08	SRD	10	tubular	I	(+)	(-)
09	siamês	9	tubular	I	(-)	(-)
10	siamês	9	tubular	I	(-)	(-)
11	SRD	9	tubular	I	(-)	(-)
12	SRD	10	sólido	III	(-)	(-)
13	persa	9	tubular	I	(-)	(-)
14	SRD	10	tubular	II	(+)	(-)
14'			metástase		(+)	(-)
15	SRD	10	papilífero	II	(+)	(+)
15'			metástase		(-)	(-)
16	SRD	12	papilífero	II	(+)	(-)
17	SRD	7	cribriforme	II	(+)	(+)
17'			metástase		(-)	(-)
18	SRD	--	tubular	I	(+)	(-)
18'			metástase		(+)	(-)
19	SRD	14	cribriforme	II	(+)	(-)
20	SRD	10	papilífero	I	(+)	(-)

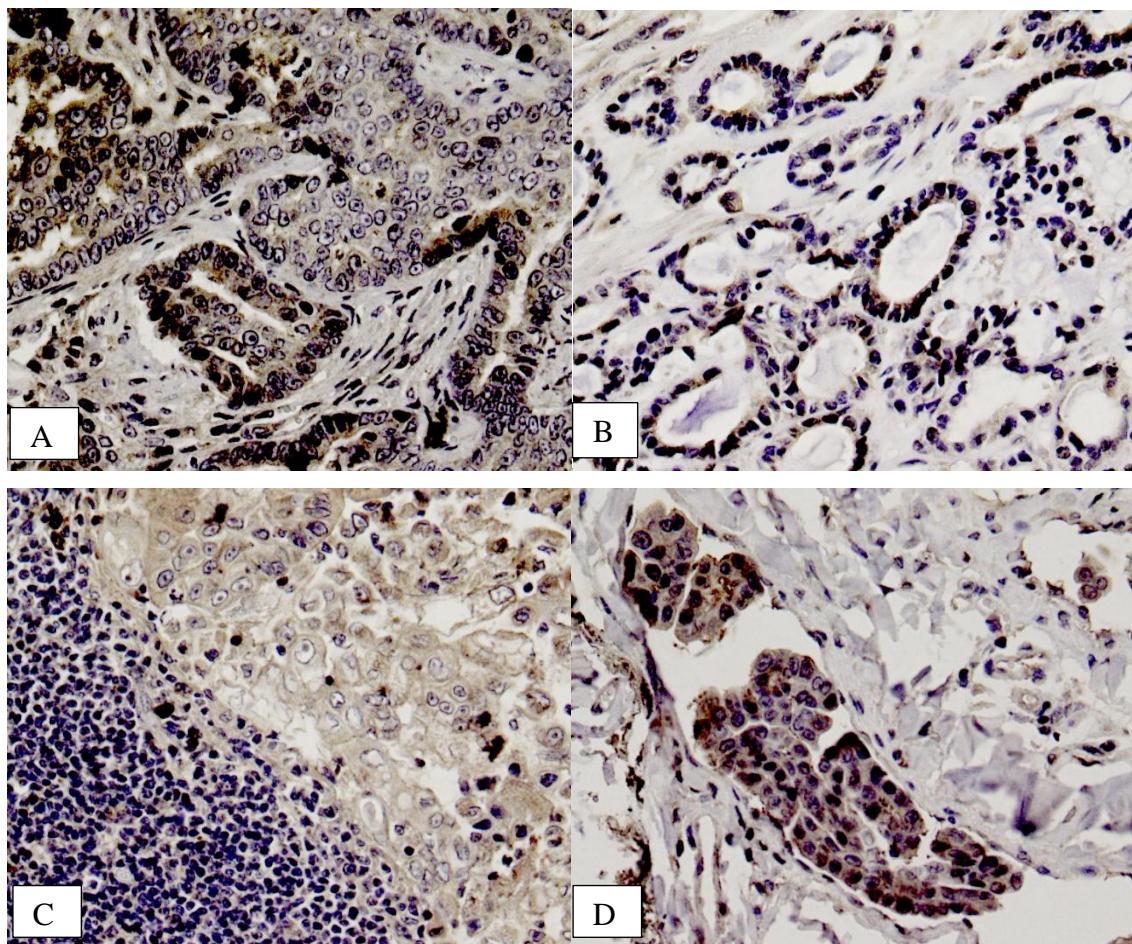


Figura 1. A. Fotomicrografia de corte histológico de tecido mamário de gata, apresentando imunopositividade para K7 em área carcinomatosa (LSAB, 40X). B. Fotomicrografia evidenciando área de lesão carcinomatosa mamária de gata composta por células epiteliais com frequente expressão de K20 (LSAB, 40x). C. Fotomicrografia de crescimento metastático em linfonodo exibindo imunoexpressão de K7 (LSAB, 40X). D. Detalhe de êmbolo neoplásico em vaso linfático (LSAB, 40x).

Tabela 2. Perfil de imunorreatividade dos carcinomas mamários de gatas às ceratinas 7 e 20, considerando-se aspectos qualitativos e quantitativos, sendo EQL: escore qualitativo, com 0: marcação ausente, 1: fraca, 2: moderada, 3: intensa, 4: muito intensa; EQT: escore quantitativo com 0: marcação ausente, 1: < 25% das células marcadas, 2: de 25-50% das células marcadas, 3: de 50-75% de células marcadas, 4: > 75% das células marcadas; e EM: escore misto com 0: marcação ausente, 1: imunorreatividade fraca, 2: imunorreatividade intensa. As amostras grafadas com linhas correspondem às lesões metastáticas.

AMOSTR	EQLK	EQLK2	EQTK	EQTK20	EMK	EMK2
A	7	0	7		7	0
1	1	0	1	0	1	0
2	1	0	2	0	1	0
3	0	0	0	0	0	0
4	1	0	1	0	1	0
5	2	0	2	0	1	0
6	1	0	1	0	1	0
7	1	0	1	0	1	0
8	1	0	2	0	1	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0
14	2	0	3	0	2	0
14'	2	0	3	0	2	0
15	2	0	3	0	2	0
15'	0	0	0	0	0	0
16	1	1	2	2	1	1
17	1	1	1	1	1	1
17'	0	0	0	0	0	0
18	2	0	2	0	1	0
18'	2	0	2	0	1	0
19	2	0	1	0	1	0
20	1	0	1	0	1	0

Discussão

Os tumores mamários são neoplasmas comuns em diversas espécies, incluindo cães, gatos, ratos, camundongos e humanos, sendo raros em outras espécies domésticas (Misdorp *et al.*, 1999). Nos felinos apresentam-se como processos altamente infiltrativos assemelhando-se em termos epidemiológicos, morfológicos e prognósticos com carcinomas mamários humanos negativos para receptores estrogênicos, tendo sido sugerido seu estudo como um modelo biológico para a neoplasia mamária humana (Zappulli *et al.*, 2005). Nesse sentido, dimensões tumorais, presença de metástase em linfonodos, grau histológico, expressão de marcadores de proliferação e de receptores hormonais constituem informações relevantes em termos prognósticos (Castagnaro *et al.*, 1998; Milanta *et al.*, 2002; Preziosi *et al.*, 2002; Milanta *et al.*, 2006). A presença de metástase é frequente no momento da cirurgia devido à elevada invasividade, com frequente infiltração estromal, determinando um prognóstico reservado para o processo. Estudos evidenciam um intervalo entre a detecção tumoral e o óbito do animal entre 10 e 12 meses (Weijer & Hart, 1983; Hayes *et al.*, 1981). O tratamento cirúrgico seguido de quimioterapia com doxorubicina possibilitou uma sobrevida média de 331 dias em animais com metástase pulmonar e até superior a 1.500 dias em animais com metástase em linfonodos (Novosad *et al.*, 2005).

As características morfológicas em carcinomas frequentemente são comuns, independentemente do sítio primário de origem, evidenciando-se agregados de células coesas, com frequente paliçamento, e, no caso de neoplasmas glandulares, amiúde com delimitação luminal (Moulton, 1978). Em condições em que o sítio primário não é visualizado, avaliações complementares com finalidade diagnóstica devem ser somadas ao exame histopatológico convencional, constituindo-se a pesquisa de filamentos intermediários, em particular das ceratinas, uma potencial alternativa (Cooper *et al.*,

1985). Diferentes estratégias podem ser utilizadas, destacando-se a pesquisa de ceratinas de alto e baixo peso molecular, das ceratinas 7 e 20, e a coexpressão de vimentina e de marcadores neuroendócrinos (Bacchi, 1999). Espinosa de los Monteros *et al.*, 1999, pesquisaram a expressão combinada das K7/K20 para rastrear os diferentes neoplasmas epiteliais de cães e gatos, identificando quatro perfis básicos de expressão, as duplas positividade e negatividade, K7+/K20- e K7-/K20+. A expressão de K7 characteristicamente relaciona-se a epitélios glandulares, sendo esperada sua positividade em adenocarcinomas não gastrointestinais (Wang *et al.*, 1995). Em nosso estudo, avaliando-se 20 carcinomas mamários de gatas, o perfil de imunoexpressão predominante foi o K7+/K20-, seguido pela dupla negatividade, corroborando os achados de avaliação anterior, realizada em oito casos, no qual os dois perfis corresponderam a 50% dos casos cada (Espinosa De Los Monteros *et al.*, 1999). Ainda nesse estudo, Espinosa de Los Monteros *et al.* indicaram o perfil K7+/K20- em felinos como o preferencial, exclusivamente, para os carcinomas de mama, fortalecendo o uso da estratégia da pesquisa de coexpressão de ceratinas 7 e 20 na pesquisa histogênica de carcinomas nessa espécie. O emprego de anticorpos monoclonais anti-humano mostrou-se útil, sendo caracterizada uma elevada reatividade cruzada em anticorpos contra filamentos intermediários (Vos *et al.*, 1993). A ausência de imunopositividade para as ceratinas testadas foi identificada em alguns tumores de baixo grau de malignidade, mas preferencialmente em neoplasmas pouco diferenciados, como os carcinomas sólidos, e as amostras de alto grau de malignidade, sugerindo uma relação inversamente proporcional entre o grau de anaplasia celular e a expressão das ceratinas. Merece destaque a presença de expressão de K20 em 2 amostras de grau II de malignidade, sendo um carcinoma papilífero e um cribriforme. Tal achado sugere diferenciação apócrina e associa-se a mau prognóstico em carcinomas de mama na espécie humana

(Shao *et al.*, 2012). O carcinoma mucinoso de mama em gatas é infrequente, existindo um estudo indicando a frequente imunopositividade para a K19 (Sarli *et al.*, 2006). Em nossa amostragem o único caso representado apresentou o perfil K7+/K20-, semelhante à maioria das amostras.

Comparando o processo metastático nodal ao primário, evidenciou-se a reprodução do perfil imunofenotípico em duas amostras, com a perda de expressão de K7 nas outras 2. A maioria dos estudos comparativos entre a composição genética da lesão primária e do foco metastático de crescimento, identifica uma proximidade clonal entre as populações celulares (Marusyk & Polyak, 2010). No entanto, a heterogeneidade entre as populações neoplásicas está bem caracterizada em alguns tumores, entre os quais se encontram os carcinomas mamários (Shipitsin *et al.*, 2007), sendo identificada, intrinsecamente na própria lesão primária, e entre esta e os focos metastáticos (Torres *et al.*, 2007). Esse fato pode ser interpretado como uma diversidade entre clones tumorais na origem dos processos primário e secundário, coerente com a heterogeneidade clonal postulada durante o processo carcinogênico, porém, pode também ser compreendida como a resultante da interação entre as colônias neoplásicas e microambientes distintos (Kim *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2011). Essa divergência genética entre as populações primária e metastática torna mais complexa a caracterização do sítio primário em carcinomas metastáticos, e reforça a necessidade de abordagens complementares para o êxito no procedimento. Já o perfil de expressão de ceratinas predominante no carcinoma mamário de gatos, análogo ao identificado nessas neoplasias em humanos, corrobora o uso da lesão em felinos como um modelo biológico adequado para a compreensão da condição na espécie humana.

Conclusões

Mediante a pesquisa da expressão de ceratinas 7 e 20 em carcinomas mamários de gatas foi identificado como perfil preferencial ceratina 7+ e ceratina 20-, considerando-se a possibilidade de perda da expressão de ceratina 7 em lesões metastáticas nodais, características particularmente úteis na pesquisa histogênica em carcinomas metastáticos de origem desconhecida.

Referências bibliográficas

- Bostock, D. E. 1986. Canine And Feline Mammary Neoplasms. *British Veterinary Journal*, 142: 506-15.
- Cardazzo, B.; Zappulli, V.; Frassineti, F; Patarnello, T.; Castagnaro, M.; Bargelloni, L. 2005. Full-Length Sequence And Expression Analysis Of Estrogen Receptor Alpha mRNA In Feline Mammary Tumors. *Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology*, 96: 109-18.
- Carpenter, J. L.; Andrews, L. K.; Holzworth, J. Tumors And Tumor-Like Lesions. In: Holzworth, J. (Ed.) *Diseases Of The Cat: Medicine And Surgery*, Philadelphia, 1987, WB Saunders.
- Castagnaro, M.; Casalone, C.; Bozetta, E.; De Maria, R.; Biolatti, B.; Caramelli, M. 1998. Tumor Grading And Postsurgical Prognosis In Feline Mammary Carcinomas. *Journal Of Comparative Pathology*, 119: 263-75.
- De Maria, R.; Olivero, M.; Iussich, S.; Nakaichi, M.; Murata, T.; Biolatti, B.; Di Renzo, M.F. 2005. Spontaneous Feline Mammary Carcinoma Is A Model Of HER2 Overexpressing Poor Prognosis Human Breast Cancers. *Cancer Research*, 65: 907-12.
- Elston, C. W. & Ellis, I. O. 1991. Pathological Prognostic Factors In Breast Cancer. I. The Value Of Histological Grade In Breast Cancer: Experience From A Large Study With Long-Term Follow-Up. *Histopathology*, 19: 403-10.
- Espinosa De Los Monteros, A.; Fernandez, A.; Millán, M. Y.; Rodriguez, F.; Herráez, P.; Martin De Las Mulas, J. 1999. Coordinate Expression Of Cytokeratins 7 And 20 In Feline And Canine Carcinomas. *Veterinary Pathology*, 36: 179-90.

Hayes, H. M. Jr.; Milne, K. L.; Mandell, C. P. 1981. Epidemiological Features Of Feline Mammary Carcinomas. *Veterinary Record*, 108: 476-79.

Hsu, S. M.; Raine, L.; Fanger, H. 1981. Use Of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) In Immunoperoxidase Techniques: A Comparison Between ABC And Unlabeled Antibody (PAP) Procedures. *Journal Of Histochemistry And Cytochemistry*, 29: 577-80.

Kim, H. M.; Ju, W. H.; Koo, J. S. 2014. Site-Specific Metabolic Phenotypes In Metastatic Breast Cancer. *Journal Of Translational Medicine*, 12: 354.

Lu, X.; Mu, E.; Wei, Y.; Riethdorf, S.; Yang, Q.; Yuan, M.; Yan, J.; Hua, Y.; Tiede, B.J.; Lu, X.; Haffty, B.G.; Pantel, K.; Massagué, J.; Kang, Y. 2011. VCAM-1 Promotes Osteolytic Expansion Of Indolent Bone Micrometastasis Of Breast Cancer By Engaging Alpha4beta1-Positive Osteoclast Progenitors. *Cancer Cell*, 20: 701-14.

Marusyk, A. & Polyak, K. 2010. Tumor Heterogeneity: Causes And Consequences. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1805: 105-17.

Meuten, D. J., Tumors In Domestic Animals, 4th Ed, Iowa, 2002, Iowa State Press.

Millanta, F.; Calandrella, M.; Citi, S.; Della Santa, D.; Poli, A. 2005. Overexpression Of HER-2 In Feline Invasive Mammary Carcinomas: An Immunohistochemical Survey And Evaluation Of Its Prognostic Potential. *Veterinary Pathology*, 42: 30-34.

Millanta, F.; Calandrella, M.; Vanozzi, I.; Poli, A. 2006. Steroid Hormone Receptors In Normal, Dysplastic And Neoplastic Feline Mammary Tissues And Their Prognostic Significance. *Veterinary Record*, 158: 821-24.

Millanta, F.; Lazzeri, G.; Vannozzi, I.; Viacava, P.; Poli A. 2002. Correlation Of Vascular Endothelial Growth Factor Expression To Overall Survival In Feline Invasive Mammary Carcinomas. *Veterinary Pathology*, 39: 690-96.

Misdorp, W.; Else, R. W.; Hellmén, E.; Lipscomb, T.P. World Health Organization International Histological Classification Of Tumors Of Domestic Animals, Washington, 1999. Armed Forces Institute Of Pathology.

Moll, R.; Franke, W. W.; Schiller, D. L.; Geiger, B.; Krepler, R. 1982. The Catalog Of Human Cytokeratins: Patterns Of Expression In Normal Epithelia, Tumors And Cultured Cells. *Cell*, 31: 11-24.

Moll, R.; Lowe, A.; Laufer, J.; Franke, W. W. 1992. Cytokeratin 20 In Human Carcinomas. A New Histodiagnostic Marker Detected By Monoclonal Antibodies. *American Journal Of Pathology*, 140:427-47.

Novosad, C. A.; Bergman, P. J.; O'Brien, M. G.; McKnight, J. A.; Charney, S. C.; Selting, K. A.; Graham, J. C.; Correa, S. S.; Rosenberg, M. P.; Gieger, T. L. 2005. Retrospective Evaluation Of Adjunctive Doxorubicin For The Treatment Of Feline Mammary Gland Adenocarcinoma: 67 Cases. *Journal Of The American Animal Hospital Association*, 42: 110-20.

Overly, B.; Shofer, F. S.; Goldschmidt, M. H.; Sherer D, Sorenmo K. U. 2005. Association Between Ovariectomy And Feline Mammary Carcinoma. *Journal Of Internal Medicine*, 19: 560-63.

Patnaik, A. K.; Liu, S. K.; Hurvitz, A. L.; McClelland, A. J. 1975. Nonhematopoietic Neoplasms In Cats. *Journal Of The National Cancer Institute*, 54: 855-60.

Preziosi, R.; Sarli, G.; Benazzi, C.; Mandrioli, L.; Marcato, P. S. 2002. Multiparametric Survival Analysis Of Histological Stage And Proliferative Activity In Feline Mammary Carcinomas. *Research In Veterinary Science*, 73: 53-60.

Ramaekers, F.; Van Niekerk, C. C.; Poels, L.; Schaafma, E.; Huijsmann, A.; Robben, H.; Schaart, G.; Vooijs, P. 1990. Use Of Monoclonal Antibodies To Keratin 7 In the Differential Diagnosis Adenocarcinomas. *American Journal Of Pathology*, 136:641-55.

Rasotto, R.; Caliari, D.; Castagnaro, M.; Zanetti, R.; Zappulli, V. 2011. An Immunohistochemical Study Of HER-2 Expression In Feline Mammary Tumours, *Journal Of Comparative Pathology*, 144: 170-79.

Rutteman, G. R.; Blankenstein, M. A.; Minke, J.; Misdorp, W. 1991. Steroid Receptors In Mammary Tumours Of The Cat. *Acta Endocrinologyca*, 125: 32-37.

Sampaio-Góes, F. C. G.; 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.

Sarli, G.; Brunetti, B.; Benazzi, C. 2006. Mammary Mucinous Carcinoma In The Cat. *Veterinary Pathology*, 43: 667-73.

Shao, M. M.; Chan, S. K.; Yu, A. M.; Lam, C. C.; Tsang, J. Y.; Lui, P. C.; Law, B. K.; Tan, P. H.; Tse, G.M. 2012. Keratin Expression In Breast Cancers. *Virchows Archives*, 461: 313-22.

Shipitsin, M.; Campbell, L. L.; Argani, P.; Weremowicz, S.; Bloushtain-Qimron, N.; Yao, J.; Nikolskaya, T.; Serebryiskaya, T.; Beroukhim, R.; Hu, M.; Halushka, M. K.; Sukumar, S.; Parker, L. M.; Anderson, K. S.; Harris, L. N.; Garber, J. E.; Richardson, A. L.; Schmitt, S. J.; Nikolsky, Y.; Gelman, R. S.; Polyak, K. 2007. Molecular Definition Of Breast Tumor Heterogeneity. *Cancer Cell*, 11: 259-73.

Skorupski, K. A.; Overly, B.; Shofer, F. S.; Goldschmidt, M. H.; Miller, C. A.; Sørenmo, K. U. 2005. Clinical Characteristics Of Mammary Carcinoma In Male Cats. *Journal Of Veterinary Internal Medicine*, 19: 52-55.

Soini, Y.; Puhakka, A.; Kahlos, K.; Säily, M.; Pääkö, 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.

Torres, L.; Ribeiro, F. R.; Pandis, N.; Andersen, J. A.; Heim, S.; Teixeira, M. R. 2007. Intratumor Genomic Heterogeneity In Breast Cancer With Clonal Divergence Between Primary Carcinomas And Lymph Node Metastases. *Breast Cancer Treatment*, 102: 143-55.

Van De Wouw, A. J.; Janssen-Heijnen, M. L.; Coebergh, J. W.; Hillen, H. F. 2002. Epidemiology Of Unknown Primary Tumours; Incidence And Population Based Survival Of 1285 Patients In Southeast Netherlands. *European Journal Of Cancer*, 38: 409-13.

Van Niekerk, C. C.; Jap, P. H.; Ramaekers, F.; Van De Molengraft, F.; Poels, L. G. 1991. Immunohistochemical Demonstration Of Keratin 7 In Routinely Fixed Paraffin-Embedded Human Tissues. *Journal Of Pathology*, 165:145-52.

Vos, J. H.; Van Den Ingh, T. S. G. A. M.; Misdorp, W.; Molenbeek, R. F.; Van Mil, F. N.; Rutteman, G.R.; Ivanyi, D.; Ramaekers, F.C. 1993. Immunohistochemistry With Keratin, Vimentin, Desmin And A-Smooth Muscle Actin Monoclonal Antibodies In Canine Mammary Gland: Malignant Mammary Tumours. *Veterinary Quarterly*, 14:96-102.

Wang, N. P.; Zee, S.; Zarbo, R. J.; Bacchi, C. E.; Gown, A. M. 1995. Coordinate Expression Of Cytokeratins 7 And 20 Defines Unique Subsets Of Carcinomas. *Applied Immunohistochemistry*, 3: 99-107.

Weijer, K. & Hart, A. A. M. 1983. Prognostic Factors In Feline Mammary Carcinoma. *Journal Of The National Cancer Institute*, 70: 709-10.

Zappulli, V.; De Zan, G.; Cardazzo, B.; Bargelloni, L.; Castagnaro, M. 2005. Feline Mammary Tumours In Comparative Oncology. *Journal Of Dairy Research*, 72: 98-106.