



Universidade de Aveiro
Ano 2010

Departamento de Química

**Rui Pedro Meireles
de Sousa**

**A expressão da COX-2 em patologias da glândula
mamária da gata**



Universidade de Aveiro
Ano 2010

Departamento de Química

**Rui Pedro Meireles
de Sousa**

**A expressão da COX-2 em patologias da glândula
mamária da gata**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica Professora Doutora Maria de Fátima Moutinho Gärtner Professora Catedrática do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto e da Doutora Maria do Rosário Gonçalves Reis Marques Domingues Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

o júri

Presidente

Professor Doutor António José Brito Fonseca Mendes Calado

Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Professor Doutor Augusto José Ferreira de Matos (Arguente)

Professor Auxiliar do Departamento de Clínicas Veterinárias do ICBAS da Universidade do Porto

Professora Doutora Maria de Fátima Moutinho Gärtner (Orientador)

Professora Catedrática do Departamento de Patologia e Imunologia Molecular do ICBAS da
Universidade do Porto

Professora Doutora Maria Do Rosário G. R. M. Domingues (Co-orientador)

Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

À Professora Fátima Gärtner pela orientação deste projecto, sua persistência, dedicação, pelo incentivo em terminar esta dissertação e por todos os conhecimentos transmitidos.

À Professora Rosário Domingues pela ajuda na forma de apresentação da dissertação e pelo acesso a ferramentas de trabalho da qual me ajudaram na realização desta tese.

Quero, igualmente, agradecer à Professora Patrícia Pereira pela experiência transmitida, nomeadamente na visualização dos cortes histológicos e forma de avaliação dos vários marcadores imunológicos.

Agradeço também, todos elementos integrantes do Laboratório de Patologia Veterinária, por todos os conselhos, momentos partilhados, amizade, e ajuda na elaboração deste projecto no âmbito pratico e teórico.

À Marcela Marcondes que por pouco tempo que estive no laboratório sempre se dedicou e ajudou em tudo o que podia dentro da elaboração, tanto prática como teórica desta dissertação e pela amizade.

Deixo um agradecimento pela ajuda inicial da parte estatística à Professora Corália Vicente e ao Marco Rego meu amigo que me ajudou na finalização da análise estatística.

Aos meus Pais, Família e namorada, Alla, por toda a força, motivação que me transmitiram e o apoio em todos os sentidos, profissional, académico e pessoal

palavras-chave COX-2, mama da gata, Ki-67, E-Cad; Tumores mamários de gatas, Imunohistoquímica

resumo Pelo menos 80-85% dos tumores da glândula mamária dos felídeos são malignos. Estes tumores ocorrem em média entre os 10-11 anos de idade e são o terceiro tumor mais frequente nesta espécie, precedidos dos tumores hematopoiéticos e cutâneos. A incidência destes tumores nos felídeos é inferior em cerca de metade aos dos canídeos e humanos. Contudo, as neoplasias mamárias correspondem a 17% de todos os tumores que ocorrem na gata, que metastizam com frequência, principalmente para o pulmão e gânglios linfáticos.

Com este projecto foi utilizada a ciclooxigenase-2 (COX-2), que é uma proteína enzimática que medeia a produção de prostoglandinas e tromboxano a partir do ácido araquidónico, estando a COX-2 envolvida no processo inflamatório, de forma a estudar a sua expressão no epitélio luminal de várias patologias da glândula mamária da gata. Há evidências que a COX-2 tem um papel importante na tumorigénese através da estimulação da proliferação celular, inibição da apoptose, indução da angiogénese, invasão celular, imunossupressão e aumento de factores mutagénicos. Está também descrito que a expressão aumentada da COX-2 em linhas celulares de cancro da mama da mulher aumenta a migração e invasão celular.

Posto isto, foi avaliado o comportamento da COX-2 em várias neoplasias mamárias da gata, do arquivo de lâminas de 1998 a 2009 do laboratório de Patologia Veterinária do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, desde mama sem qualquer alteração, passando por hiperplasias e displasias e neoplasias benignas e malignas. Foram feitas correlações entre o índice proliferativo, para o qual foi utilizado o Ki-67 (MIB) que é detectado em várias fases de proliferação celular (G1,S,G2 e Mitose). Com a Caderina Epitelial (E-Cad) também foram realizadas correlações visto esta proteína estar presente nas junções das células, sendo que a falta desta entre os espaços inter-celulares poderá promover a migração celular provocando metastização. Para este trabalho foi utilizado o método de imunohistoquímica em tecidos parafinados utilizando anticorpos anti-COX-2, anti-Ki67 e anti-E-Cad.

Foi verificado neste estudo, que a E-Cad, proteína de adesão celular, apresenta uma grande escassez de imunoreactividade em neoplasias malignas, nomeadamente em Carcinomas Sólidos, contudo o Carcinoma Tubulopapilar apresentou uma conservação desta proteína devido a necessidade deste carcinoma se organizar em estruturas tubulosas e papilares conferindo assim uma conservação da E-Cad. Foi observado que algumas neoplasias apresentaram uma localização aberrante da E-Cad no Citoplasma, em carcinomas sólidos, carcinomas tubulopapilares e de salientar a neoplasia benigna, o fibroadenoma papilar.

A relação obtida desta proteína com a COX-2 e o Ki-67, quando há uma perda de expressão da Caderina Eptelial, há um aumento da imunomarcção tanto da COX-2 como da expressão do Ki-67, revelando ser um mau prognóstico. No Ki-67 foi verificado que o Carcinoma Sólido apresentava um maior índice proliferativo, demonstrando que pode ser uma característica de pior prognóstico. Quanto à COX-2 foi observado uma maior intensidade em neoplasias malignas, relativamente a estas, as neoplasias benignas apresentaram uma menor percentagem e intensidade, o que pode demonstrar uma evolução no processo neoplásico, revelando assim que COX-2 poderá estar envolvida na carcinogénese da mama de gata.

keywords COX-2, female cat breast, Ki-67, E-Cad; feline mammary tumors, Immunohistochemistry

abstract At least 80-85% of tumors of the mammary gland of cats are malignant. These tumors occur on average between 10-11 years of age and are the third most common tumor in this species, followed by hematopoietic and skin tumors. The incidence of these tumors in cats is lower by about half those of canines and humans. However, this type of tumors represents a 17% of all tumors that occur in the cat that frequently metastasize, and in a short time, especially for lung and lymph nodes.

With this project we analyze the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) which is a protein enzyme that mediates the production of prostoglandines and thromboxane from arachidonic acid, COX-2 is known to be involved in the inflammatory process. There is evidence that COX-2 has an important role in tumorigenesis by stimulating cell proliferation, inhibition of apoptosis, induction of angiogenesis, cell invasion, immunosuppression and increase of mutagenic factors. Is also described that the increased expression of COX-2 in cell lines of breast cancer in women increases migration and cell invasion.

We evaluated the behavior of COX-2 in several mammary tumors of the cat, with slides archive since 1998 to 2009 from the Laboratory of Veterinary Pathology at the Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar, with normal breast tissue, through hyperplasia, dysplasia, benign and malignant neoplasms. For proliferative index was used Ki-67 (MIB) that is detected at various stages of cell proliferation (G1, S, G2 and Mitosis). With Epithelial Cadherin (E-Cad) were also performed comparisons, since this protein is present at the junctions of the cells, and lack thereof between the inter-cellular spaces can promote cell migration causing metastasis. For this work we used the method of immunohistochemistry in paraffin embedded tissues using anti-COX-2, anti-Ki67 and anti-E-Cad.

It was considered that E-Cad, cell adhesion protein, showed a lack of immunoreactivity in malignant neoplasms, particularly in Solid Carcinomas, however tubulo papillary carcinoma showed a conservation of this protein due to carcinoma organization in tubular and papillary structures giving thus conservation of E-Cad in 68.42%. It was observed that some tumors showed an aberrant localization of E-Cad in the cytoplasm, in solid carcinomas, carcinomas tubulopapilares and to emphasize the papillary fibroadenoma a benign tumor.

The comparison of this protein with COX-2 and Ki-67, when a loss of expression of Epithelial Cadherin, there is an increase in both immunostaining of COX-2 as the expression of Ki-67, proving to be a poor prognosis. In Ki-67 was found that the solid carcinoma had a higher proliferative index, indicating that it can be a feature of poor prognosis. As for COX-2 was observed a greater intensity in malignant neoplasms, for these, benign tumors had a lower percentage and intensity, which can demonstrate an evolution in the neoplastic process, thus revealing that COX-2 may be involved in carcinogenesis of female cat breast tumors.

Índice de Figuras

FIG. 1 ALTERAÇÃO FIBROADENOMATOSA. IMUNOEXPRESSÃO MEMBRANAR DA E-CADERINA NO EPITÉLIO LUMINAL. 200x ..	17
FIG. 2 DOENÇA FIBROQUÍSTICA. IMUNOMARCAÇÃO DO TIPO MEMBRANAR NO EPITÉLIO LUMINAL. SÃO IDENTIFICÁVEIS ÁREAS QUÍSTICAS COM SEPTOS FIBROSOS (SETA). 200x.....	19
FIG. 3 A -FIBROADENOMA PAPILAR COM EPITÉLIO LUMINAL MARCADO PARA O ANTICORPO E-CAD; B - ADENOMA SIMPLES COM MARCAÇÃO MEMBRANAR DO EPITÉLIO LUMINAL (200x)	20
FIG. 4 CARCINOMA SÓLIDO. IMUNOMARCAÇÃO CITOPLASMÁTICA E MEMBRANAR NO EPITÉLIO LUMINAL . 200x	23
FIG. 5 DOENÇA FIBRO-QUÍSTICA IMUNOMARCAÇÃO NUCLEAR PARA O ANTICORPO MIB-1 200x	34
FIG. 6 CARCINOMA SÓLIDO. IMUNOMARCAÇÃO NUCLEAR PARA O ANTICORPO MIB-1. 400x.....	36
FIG. 7 ALTERAÇÃO FIBROADENOMATOSA COM MARCAÇÃO EM CÉLULAS EPITELIAIS LUMINAIS. FORTE MARCAÇÃO DA ZONA APICAL. 200x.....	45
FIG. 8 DOENÇA FIBROQUÍSTICA COM MARCAÇÃO MODERADA E DESCONTÍNUA EM TODO O EPITÉLIO LUMINAL E SECREÇÃO. 200x	46
FIG. 9 FIBROADENOMA PAPILAR COM MARCAÇÃO APICAL PARA A COX-2 NO EPITÉLIO LUMINAL EM ÁREAS TUBULOALVEOLARES. 400x	48
FIG. 10 CARCINOMA TUBULOPAPILAR COM CÉLULAS COM PLEOMORFISMO CELULAR E DENOTADA MARCAÇÃO DA COX-2 NO EPITÉLIO LUMINAL ALVEOLAR. 200x	53

Índice de Tabelas

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE TECIDO MAMÁRIO FELINO SELECIONADAS PARA ESTUDOS IMUNOHISTOQUÍMICOS.	15
TABELA 2 - PADRÃO E GRAU DE EXPRESSÃO DA E-CADERINA NO TECIDO MAMÁRIO NORMAL.....	16
TABELA 3 - PADRÃO E GRAU DE EXPRESSÃO DA E-CADERINA NA ALTERAÇÃO FIBROADENOMATOSA DA GLÂNDULA MAMÁRIA.	18
TABELA 4 - PADRÃO E GRAU DE EXPRESSÃO DA E-CADERINA NA DOENÇA FIBROQUÍSTICA.....	18
TABELA 5 - PADRÃO E GRAU DE EXPRESSÃO DA E-CADERINA EM NEOPLASIAS BENIGNAS DA GLÂNDULA MAMÁRIA.	20
TABELA 6 - PADRÃO E GRAU DE EXPRESSÃO DA E-CADERINA EM CARCINOMAS TUBULOPAPILARES (CTP) E METÁSTASES GANGLIONARES.....	22
TABELA 7 - PADRÃO E GRAU DE EXPRESSÃO DA E-CADERINA EM CARCINOMAS SÓLIDOS E METÁSTASES GANGLIONARES.	24
TABELA 8 - PADRÃO DE EXPRESSÃO DA E-CADERINA NOS CARCINOMAS CRIBRIFORMES DA GLÂNDULA MAMÁRIA E METASTASES GÂGLIONARES.....	25
TABELA 9 - DIFERENÇA E SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA ENTRE A ACTIVIDADE PROLIFERATIVA (PERCENTAGEM MÉDIA DE CÉLULAS MARCADAS COM ANTICORPO MIB-1) NOS DIFERENTES TIPOS HISTOLÓGICOS DE TECIDO MAMÁRIO FELINO.....	37
TABELA 10 - CLASSIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO (PERCENTAGEM E INTENSIDADE) IMUNOHISTOQUÍMICA DO ANTI CORPO COX-2 EM MAMA NORMAL DE GATA.	45
TABELA 11 - CLASSIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO (PERCENTAGEM E INTENSIDADE) IMUNOHISTOQUÍMICA DO ANTI CORPO COX-2 EM ALTERAÇÕES FIBROADENOMATOSAS (AF) E DOENÇA FIBROQUÍSTICA (DFQ).	47
TABELA 12 - CLASSIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO (PERCENTAGEM E INTENSIDADE) IMUNOHISTOQUÍMICA DO ANTI CORPO COX-2 EM NEOPLASIAS BENIGNAS.	49
TABELA 13 - CLASSIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO (PERCENTAGEM E INTENSIDADE) IMUNOHISTOQUÍMICA DO ANTICORPO COX-2 EM CARCINOMAS TUBULO PAPILARES.	50
TABELA 14 - CLASSIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO (PERCENTAGEM E INTENSIDADE) IMUNOHISTOQUÍMICA DO ANTI CORPO COX-2 EM CARCINOMAS SÓLIDOS.	52
TABELA 15 - CLASSIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO (PERCENTAGEM E INTENSIDADE) IMUNOHISTOQUÍMICA DO ANTI CORPO COX-2 EM CARCINOMAS CRIBRIFORMES.	52

Índice Geral

ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE TABELAS.....	XII
ÍNDICE GERAL.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XV
NOTA INTRODUTÓRIA.....	1
1. GLÂNDULA MAMÁRIA.....	2
1.1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1.1. NEOPLASIAS MAMÁRIAS FELINAS.....	5
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	8
2. E-CADERINA.....	9
2.1 INTRODUÇÃO.....	10
2.1.1. <i>E-caderina</i>	11
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.2. RESULTADOS.....	16
2.2.1. <i>Glândula Mamária Normal</i>	16
2.2.2. <i>Alterações Hiperplásicas/Displásicas</i>	17
2.2.2.1. <i>Alterações Fibroadenomas</i>	17
2.2.2.2. <i>Doença fibroquística</i>	18
2.2.3. <i>Neoplasias Benignas</i>	19
2.2.4. NEOPLASIAS MALIGNAS.....	21
2.2.4.1. Carcinoma Tubulopapilar.....	21
2.2.4.1.1. Metástases ganglionares.....	21
2.2.4.2. Carcinoma Sólido.....	23
2.2.4.2.1. Metástases ganglionares.....	24
2.2.4.3. Carcinoma Cribriforme.....	25
2.2.4.3.1. Metástase ganglionar.....	25
2.3. DISCUSSÃO.....	27
3. KI-67.....	29
3.1 INTRODUÇÃO.....	30
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.3 RESULTADOS.....	34
3.3.1. <i>Tecido mamário normal</i>	34
3.3.2. <i>Alterações Hiperplásicas/Displásicas</i>	34

3.3.3	<i>Neoplasias benignas</i>	35
3.3.4	<i>Neoplasias Malignas</i>	36
3.4	DISCUSSÃO	38
4.	COX-2	40
4.1	INTRODUÇÃO.....	41
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.3	RESULTADOS	45
4.3.1	<i>Glândula Mamária Normal</i>	45
4.3.2	<i>Alterações Hiperplásicas/Displásicas</i>	45
4.3.3	<i>Neoplasias benignas</i>	48
4.3.4	<i>Neoplasias Malignas</i>	50
4.3.4.1.	<i>Metástases Ganglionares</i>	53
4.4	Discussão	55
5.	CONCLUSÕES	57
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

Lista de abreviaturas

ADC – Adenoma Complexo

ADS – Adenoma Simples

AF – Alterações Fibroadenomas

APES – 3 – AminoPropyltriethoxysilano

CC – Carcinoma Cribriforme

COX-2 – Ciclooxygenase 2

CS – Carcinoma Sólido

CTP – Carcinoma Tubulopapilar

DFQ – Doença Fibro-Quística

E-Cad – Caderina Epitelial

FAP - Fibroadenoma

TMB – Tumor Misto Benigno

Nota introdutória

Os tumores mamários nas gatas são as neoplasias mais comuns a seguir aos linfomas e tumores da pele. Numa população de gatas com idades compreendidas entre 2,5 e os 13 anos de idade existem evidências na literatura de que as neoplasias mamárias correspondem a 12% de todos os tumores nos felídeos, com maior incidência de carcinomas mamários entre os 10 e os 11 anos de idade.

Tendo em atenção a complexidade deste tema, o objectivo deste trabalho é estudar a actividade proliferativa das células neoplásicas, os mecanismos de adesão célula-a-célula, tendo como base a molécula de adesão E-caderina (E-Cad), a prostaglandina cicloxigenase-2 (COX-2) na mama normal, nas lesões hiperplásicas, neoplásicas benignas e malignas, assim como em metástases glândula mamária de felídeos, numa abordagem sistemática.

O tema escolhido, após uma pesquisa bibliográfica no sentido de desenvolver e aperfeiçoar conhecimentos no âmbito da Patologia Mamária Felina, teve como propósito efectuar a dissertação conducente ao Mestrado em Métodos Biomoleculares do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, em parceria com o Laboratório de Patologia Veterinária do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto, onde foi desenvolvida a vertente prática do trabalho.

1. Glândula mamária

1.1 Introdução

A mama é uma glândula sudorípara modificada, altamente especializada, cuja função é a secreção de leite (BANKS 1993).

A glândula mamária no estadio embrionário tem um desenvolvimento igual em ambos os sexos, no entanto, após este estadio só nas fêmeas é que a glândula mamária se desenvolve completamente, sendo esta uma das características sexuais secundárias. Nos machos as glândulas mamárias apenas apresentam um aspecto rudimentar, sendo pequenas e não funcionais (BARONE, 1978, DYCE KM, 1997). Os factores hormonais são necessários para que haja desenvolvimento da glândula mamária, tendo repercussão a nível das várias alterações cíclicas que estão relacionadas com as diferentes fases do ciclo éstrico (RUSSO et al., 1987).

São observáveis variações inter-espécie relativas ao número, forma, dimensão e posição do órgão. Na gata contam-se 4 pares de glândulas, duas em posição torácica (uma próxima da zona cranial e na zona superior ao diafragma) e as outras duas em posição abdominal (uma na zona inferior ao diafragma e outra próxima da zona caudal) (BEVIER, 1993).

A pele que reveste a glândula mamária é fina, flexível, macia e rica em glândulas sudoríparas e sebáceas, que se encontram mais desenvolvidas na base do teto; a pele do teto é igualmente fina e delicada mas fortemente aderente à camada adiposa (BARONE, 1978).

Histologicamente a glândula mamária possui três componentes fundamentais: o corpo glandular, que inclui o parênquima glandular, o segundo componente o estroma conjuntivo fibro-elástico e o último o teto (BARONE, 1978).

A forma de suporte estrutural da glândula mamária é um estroma conjuntivo, matriz rica em fibras de elastina e colagénico, observando-se ainda como parte constituinte da glândula populações celulares de linfócitos e plasmócitos, que apresentam um aumento durante os períodos de secreção activa. Esta estrutura fibro-

elástica é responsável pela divisão da glândula mamária em lobos e lóbulos, que permite o suporte ao sistema de ductos, vasos sanguíneos e nervos que irrigam todo o órgão, resultando numa forma granular que se observa macroscopicamente na superfície de corte (BARONE, 1978, MONTEIRO-RIVIERE et al., 1993).

O parênquima mamário é formado por glândulas de estruturas tubuloalveolares que apresentam uma configuração ramificada veiculando e promovendo a secreção de leite. Esta ramificação e os alvéolos são constituídos por duas populações celulares com diferentes características: células epiteliais luminais (responsáveis pela produção láctea), duplamente estratificadas e de forma regular; e células mioepiteliais que formam uma bainha externa descontínua em volta das porções alveolares e contínua em ductos mamários, com propriedades contrácteis para promoverem a excreção láctea (BANKS 1993, MONTEIRO-RIVIERE et al., 1993, YOUNG et al., 2000).

A unidade funcional da glândula mamária, denominada por alvéolo, apresenta-se em forma de tubulos dilatados, tendo como revestimento um epitélio cúbico simples. Normalmente, todas as células epiteliais luminais que são parte constituinte dos alvéolos mamários estão no mesmo estágio funcional, tendo os alvéolos de um mesmo lóbulo apresentarem igual estágio funcional. Contudo, acontece que a actividade secretora em vários lóbulos de um mesmo lobo se apresenta em fases diferentes (MONTEIRO-RIVIERE et al., 1993).

Os ductos alveolares remetem a ductos intralobulares, que são constituídos por epitélio cúbico simples e que têm como função a produção de leite, afunilando para vias denominadas ductos interlobulares, não secretores, revestidos por um epitélio cúbico biestratificado que drenam leite dos vários lóbulos mamários. (BACHA et al., 2000, BANKS 1993, MONTEIRO-RIVIERE et al., 1993). Na extremidade final de cada lobo os ductos interlobulares convergem para ductos galactóforos, que apresentam revestimento idêntico ao dos ductos interlobulares. (DYCE et al., 1997, MONTEIRO-RIVIERE et al., 1993). Verifica-se que os ductos galactóforos a nível do desenvolvimento morfológico apresentam um aumento em diâmetro, diminuindo desta forma o seu número, fazendo com que apenas alguns deles convirjam para o seio galactóforo. As áreas glandulares e papilar são partes constituintes da mucosa do seio galactóforo, que é revestida por epitélio colunar biestratificado, cuja função é o armazenamento de uma grande quantidade de leite, formando pregas com grande poder

de distensão. Os ductos papilares curtos são parte constituinte da porção papilar do seio galactóforo e estabelecem comunicação com o exterior, com revestimento epitelial pavimentoso estratificado, que finaliza no ápex do teto através de orifícios papilares (BANKS 1993, MONTEIRO-RIVIERE et al., 1993).

Os lóbulos mamários são separados por tecido conjuntivo intralobular moderadamente denso, enquanto o tecido de suporte interlobular é mais vascularizado e menos colagenoso. Os septos que separam os lobos mamários são constituídos por tecido conjuntivo interlobular denso e fibroso, com uma grande quantidade de tecido adiposo. (YOUNG et al., 2000)

Segundo estudos efectuados, no decorrer dos ciclos éstricos, o parênquima glandular e o estroma mamário apresentam alterações consoante o período do ciclo em que se encontram (NELSON et al., 1974, RUSSO et al., 1987, WILCOCK, 1993). Quando o ciclo reprodutivo se encontra numa fase de produção de leite, verifica-se histologicamente uma proliferação da glândula mamária que é fundamentalmente constituído por estroma conjuntivo (BACHA et al., 2000, RUSSO et al., 1987). Por outro lado, verifica-se que no anestro há uma diminuição da quantidade de alvéolos em fase secretora que são substituídos por tecido adiposo e conjuntivo fibroso (BANKS 1993, MONTEIRO-RIVIERE et al., 1993, RUSSO et al., 1987).

1.1.1. Neoplasias Mamárias Felinas

Aproximadamente 80-85% dos tumores da glândula mamária das gatas são malignos (MACVEAN et al., 1978). Os tumores malignos ocorrem em média entre os 10 e 11 anos de idade e são o terceiro tumor mais frequente nesta espécie, precedidos dos tumores hematopoiéticos e cutâneos (DORN et al., 1968, MACVEAN et al., 1978).

Existe uma maior prevalência de carcinomas mamários em gatas entre os 8 e 12 anos de vida, (HAMILTON, 1974, MOULTON, 1990, WEIJER et al., 1972), já em gatas jovens os tumores benignos são mais frequentes (MISDORP et al., 1991).

Estudos epidemiológicos têm evidenciado efeito protector da ovariectomia no desenvolvimento de carcinomas mamários em gatas jovens (MISDORP et al., 1991, 1992). Outro estudo demonstra que as fêmeas inteiras têm sete vezes maior probabilidade de desenvolverem neoplasias mamárias, relativamente a gatas castradas (DORN et al., 1968). Estudos onde foi realizada a mastectomia juntamente com a ovariectomia, de carácter terapêutico, não foram verificados efeitos significativos na prevenção de recorrência nas gatas (BLOOM, 1954, HAMILTON, 1974), contrariamente ao que está descrito na espécie humana (MCGUIRE et al., 1982), sendo que nas cadelas a ovariohisterectomia revelou ser um complemento eficaz na remoção de tumores mamários de cadelas, tendo influência o momento da ovariohistectomia no tempo de sobrevivência da cadela (SORENMO et al., 2000).

Conforme o padrão histológico, quase todos os casos de neoplasias malignas da gata têm origem no epitélio ductal ou alveolar, cujos tipos, segundo os critérios da OMS são classificados em: não infiltrativo (*in situ*), cribriforme, tubulopapilar e sólido (MISDORP et al., 1999).

Misdorp *et al* (1999) citam as alterações displásicas e hiperplásicas, devido à sua predominância neste grupo, nomeadamente a alteração fibroadenomatosa, composta por um complexo de lesões proliferativas denominada doença fibroquística.

Os trabalhos realizados no âmbito de factores etiológicos demonstram que em neoplasias mamárias felinas foram identificadas partículas A e C associadas a vírus, antígenos de vírus da leucemia felina (30,6%) e RD-114 (55,5%) em carcinomas mamários felinos, enquanto em neoplasias benignas e mama normal não foram detectados estes mesmos vírus (MISDORP, 2002)

As hormonas ováricas, têm sido estudados e revelam ter um papel importante no desenvolvimento de neoplasias mamárias caninas e felinas (MISDORP et al., 1991, RUTTEMAN et al., 1993). Nestes estudos, foi avaliado o grau de dependência hormonal através da presença de receptores de estrogéneo e progesterona. Concluindo que a perda da dependência dos esteróides hormonais ocorre numa fase precoce da formação tumoral, comparativamente com resultados obtidos em cancro de mama de mulher. (DE LAS MULAS et al., 2000, HAMILTON et al., 1976, MISDORP, 1991, RUTTEMAN et al., 1991, WEIJER, 1980). No entanto, Rutteman *et al.* 1991 justificam os baixos níveis de expressão dos receptores esteróides nas gatas, devido aos animais serem ovariectomizados muito antes de alguma evidência clínica de neoplasias (RUTTEMAN et al., 1991). Outros estudos têm revelado a diminuição dos receptores hormonais em estadios neoplásicos avançados, tanto nas cadelas (GERALDES et al., 2000), como nas gatas (RUTTEMAN et al., 1993).

A avaliação de factores com significado prognóstico nos carcinomas mamários de gata, tem sido alvo de estudos recentes, constatando-se que o tamanho da lesão tumoral e o tempo de sobrevida do animal têm uma forte correlação em gatas (WEIJER et al., 1983). Nos tumores mamárias com menor tamanho tendem a aumentar o intervalo de tempo livre de doença (MACEWEN et al., 1984). A metastização para os gânglios linfáticos regionais, está associado à diminuição do tempo de sobrevida nas gatas (WEIJER et al., 1983).

A utilização de contraceptivos progestagéneos em gatas, de uma forma regular e recorrendo a doses elevadas, contendo estrogénios e progestinas, sugerem promover o desenvolvimento de neoplasias mamárias (MISDORP, 2002, RUTTEMAN et al., 2003, WITHROW et al., 2007). Está descrito que as gatas apresentam um risco 3 vezes maior de desenvolver neoplasias mamárias (benignas e malignas) após administração de contraceptivos (RUTTEMAN et al., 2003, WITHROW et al., 2007).

Por sua vez o pleomorfismo nuclear, a invasão linfática (WEIJER et al., 1972) e o elevado índice mitótico (WEIJER et al., 1983, WEIJER et al., 1972) são factores reveladores de mau prognóstico em neoplasias mamárias malignas nas gatas. Em que o grau de diferenciação tubuloalveolar (WEIJER et al., 1972) e mioepitelial (CASTAGNARO et al., 1998b) estão relacionados com o tempo de sobrevida dos animais. Um estudo realizado por Castagnaro *et al.* (1998b), dá ênfase ao anticorpo que detecta a proteína Ki-67, conhecido como um marcador de proliferação, sendo relevante

no prognóstico de carcinomas mamários de gata (CASTAGNARO et al., 1998c).

Certos aspectos clínicos, morfológicos e patológicos são comuns às espécies felina e humana, não sendo contudo suficiente a exérese cirúrgica da lesão tumoral para o tratamento eficaz da doença (MISDORP et al., 1980). Histologicamente observa-se, nos carcinomas de gatas, estrutura arquitectónica muito semelhante à das neoplasias mamárias da mulher, isto comparando com lesões tumorais de cadelas e roedores de laboratório (MISDORP et al., 1980, WEIJER et al., 1983). De facto, trata-se de neoplasias agressivas, com crescimento infiltrativo (MISDORP, 1991, MISDORP et al., 1992), que frequentemente invadem vasos sanguíneos e linfáticos, causando o desenvolvimento de metástases em gânglios linfáticos regionais e pulmões (MACEWEN, 1990).

A importância do estudo dos carcinomas mamários felinos, devido à aparente independência de receptores de estrogénios, revela interesse em termos comparativos com a espécie humana, na avaliação de regimes terapêuticos alternativos em mulheres, que não respondem à manipulação hormonal no tratamento de neoplasias malignas (HAYES et al., 1981).

Nas cadelas, os tumores mamários têm uma incidência múltipla, atingindo diversas glândulas em simultâneo (BLOOM, 1954). Num estudo realizado por Wiejer *et al* (1972) foi concluído que, no primeiro e quarto pares de glândulas, em gatas, apresentavam-se com maior incidência de neoplasias mamárias, sendo que as glândulas mais afectadas foram as caudais e as menos afectadas as craniais (WEIJER et al., 1983).

Um dos factores etiológicos mais estudado é a susceptibilidade hereditária com evidência para os genes BRCA 1 e BRCA 2, como sendo responsáveis pela predisposição aumentada para adquirir lesões tumorais mamárias (STEFANSSON et al., 2009). Em gatas, ainda não foram realizados estudos relevantes que demonstrassem efectivamente uma associação destes genes a uma predisposição familiar.

1.2 Material e Métodos

O material foi seleccionado do arquivo do Laboratório de Patologia Veterinária do Instituto de Ciências Biológicas Abel Salazar (ICBAS) da Universidade do Porto, no período de 1998 a 2009. Foram obtidas 86 amostras de tecido mamário de gatas.

Inicialmente, no registo foram seleccionados casos previamente diagnosticados por dois patologistas (Prof. Dra. Fátima Gartner e Dra Patricia Pereira), de acordo com os critérios de classificação da OMS para as neoplasias mamárias em canídeos e felídeos (MISDORP et al., 1999), como critério de selecção também foi tido em conta tecidos com poucos adipócitos e com pouco tecido necrosado

Após os quais foram levantados todos os blocos correspondentes a cada caso previamente seleccionados. Foram realizados cortes de 3 μ m e corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE).

Para a análise microscópica foi utilizado um microscópio Nikon Eclipse E600, com diâmetro de campo de observação de 0,55mm na ampliação de 40x.

2. E-CADERINA

2.1 Introdução

As moléculas de adesão celular são importantes para a organização estrutural das células em tecidos tridimensionais, responsáveis pelas distintas formas arquitectónicas e pelas várias funções biológicas destas moléculas nos tecidos e órgãos. Reconhecem-se 4 grandes grupos: as integrinas, as imunoglobulinas, selectinas e caderinas (ELANGBAM et al., 1997)

As Caderinas são uma superfamília de proteínas transmembranares agrupadas pela presença de uma ou várias repetições de caderinas nos seus domínios extracelulares, localizadas entre junções de tipo aderente, que dependem do cálcio para conferir adesão entre as células de um órgão ou tecido. São moléculas que interagem com uma rede complexa do citoesqueleto e moléculas de sinalização para transferirem informação de célula para célula, que dependem de cálcio para promoverem a adesão intercelular (ANGST et al., 2001, KNUDSEN et al., 2005, MATOS et al., 2006, PETTITT, 2005)

As caderinas subdividem-se em quatro subclasses: Caderina Epitelial (E-caderina, E-Cad), Caderina Neural (N-caderina), Caderina Placentária (P-Caderina) e moléculas de adesão de hepatócitos (Liver Cell Adhesion Molecules, L-CAM), sendo estas expressas de formas diferentes nas células e órgãos.

A E-caderina é responsável por dois mecanismos de redução. O primeiro é o da inibição da mitose celular devido à interacção com o receptor do factor de crescimento epitelial (EGFR), que regula desta forma os níveis dependentes da ciclina que por sua vez regulam a interrupção do ciclo celular de forma a bloquearem a transição da fase G1 para a Fase S (TOYOSHIMA et al., 1994). O segundo mecanismo é mediado pela β -catenina que quando livre actua na transcrição celular. A quantidade desta catenina livre pode ser originada pela redução da expressão da E-caderina ou da mutação de genes (BRUNETTI et al., 2005)

A β -catenina tem uma função importante na organogénese e no cancro na espécie humana devido à sua dupla função, pois actua tanto no complexo de adesão como na regulação da transdução ou transcrição (HATSELL et al., 2003).

A actividade das caderinas é regulada por múltiplos mecanismos, incluindo a interacção com as cateninas, eventos de fosforilação e glicosilação do tipo-N (SOLER

et al., 2002). Outro estudo mostrou que os estrogénios também regulam as caderinas, sabendo-se que uma alteração na expressão do estrogénio pode estar envolvida no aumento da transcrição do gene da E-caderina, o que demonstra que os estímulos hormonais exercem um importante papel na manutenção de estruturas tecidulares (ROWLANDS et al., 2000).

O gene da E-Cad é considerado um gene supressor tumoral e com um papel fundamental no processo de invasão, facilitando a migração celular e promove a metastização numa grande variedade de carcinomas (BREMM et al., 2008, POTTER et al., 1999, VAN AKEN et al., 2001). A expressão reduzida da E-Cad, bem como a progressão tumoral e a metastização estão associados à metilação do promotor genético da E-Cad, durante a carcinogénese. A perda de expressão da E-Cad e a reduzida transcrição do gene da E-Cad, promovem a perda de adesão celular (SARRIO et al., 2009)

A perda de expressão da E-Cad, tanto no homem como nos animais, está associada à migração celular e/ou formação de metástases no cancro da mama, estômago, cólon e recto e prostata (TAKAUJI et al., 2007). Esta molécula parece também ser essencial para a diferenciação e sobrevivência da célula epitelial alveolar, bem como para a função da glândula, pois está descrito que a perda de expressão da E-Cad no epitélio mamário em lactação resulta numa acentuada apoptose com concomitante perda da produção de leite (BOUSSADIA et al., 2002).

2.1.1. E-caderina

A redução de expressão é causada pelo silenciamento epigenético através da repressão de promotores da hipermetilação ou transcrição. Porém, a complexidade das vias intracelulares que regulam o desempenho das caderinas ainda não é completamente conhecida, mas factores chave da transcrição com significativa acção no cancro de mama têm sido identificados, nomeadamente a perda de expressão de cateninas como localização das caderinas em tumores com perda de expressão mesmas (COWIN et al., 2005). A expressão da E-Cad, em carcinomas mamários de mulher, é inversamente proporcional ao grau histológico e à diferenciação celular, mas desconhece-se o tempo de sobrevivência se correlaciona de igual forma (KNUDSEN et al., 2005). Por outro lado, estudos efectuados na espécie humana demonstraram que a redução da E-Cad está

directamente relacionada com a redução da sobrevida em dois tipos de carcinomas: carcinoma ductal infiltrativo de grau I e carcinoma ductal mamário de grau III (GILLET et al., 2001, TAN et al., 1999).

No estudo do gene da E-Cad indicou que a perda da E-Cad contribui para a disseminação de metástases, devido à indução de alterações como funcionais. (ONDER et al., 2008). Outro autor terá demonstrado que a diminuição da expressão da E-Cad numa lesão neoplásica poderá estar associado a um mau prognóstico (YOSHIDA et al., 2001).

Apesar de todos estes estudos, existem ainda registos de neoplasias de carácter mais agressivo, tais como cancro inflamatório da mama e carcinoma invasivo micropapilar que na maioria das vezes apresentam uma sobre-expressão da E-Cad (KNUDSEN et al., 2005).

Parece existir uma relação importante entre a perda da expressão da E-caderina e factores conhecidos de mau prognóstico em tumores mamários caninos, tais como: o tipo histológico, o tipo de crescimento, o tamanho do tumor, ulceração, metástases para os gânglios linfáticos e necrose (MATOS et al., 2006). Num outro estudo, a diminuição da expressão da E-caderina e da β -catenina está significativamente associadas a um maior poder de infiltração do tumor primário, contudo, não associados com a proliferação. Além disso, são igualmente variáveis de mau prognóstico tendo em conta os resultados relativos ao tempo de sobrevida (BRUNETTI et al., 2005).

Num estudo efectuado pelo nosso grupo, 11 de 14 carcinomas da gata, apresentaram diminuição ou ausência de expressão da E-Cad e alterações no padrão de imunomarcagem existindo marcação citoplasmática conjuntamente com membranas, sendo que estas alterações foram mais acentuadas nos carcinomas do tipo cribriforme e sólido (DIAS PEREIRA et al., 2003).

Ainda não está completamente esclarecida a função das caderinas e das cateninas na glândula mamária. Sabe-se que elas actuam no desenvolvimento e função da glândula mamária normal e que parecem influenciar o cancro de mama e sua evolução clínica. Contudo, novos trabalhos são necessários para se compreender o uso destas proteínas como indicadores de prognóstico.

2.2 Material e métodos

Os casos utilizados na Tabela1 foram submetidos a estudos imunohistoquímicos com o objectivo de avaliar a expressão do marcador da E-Cad (marcador de adesão celular epitelial luminal).

Para as técnicas de imunohistoquímica, realizadas segundo o método do complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (ABC) desenvolvido por Hsu et al (1981), foram utilizadas lâminas de vidro revestidas com APES (3-AMINOPROPYLTRIETHOXYSILANE), que funciona como meio de adesão, evitando-se deste modo o arrastamento do material ao longo das sucessivas lavagens e tratamentos a que é submetido.

Os cortes histológicos utilizados para a avaliação da imunoexpressão da E-Cad foram desparafinados, hidratados e seguidamente submetidos a recuperação antigénica. Foram colocados em solução de Extran (Merck) diluída a 0,05% em água destilada e posteriormente colocadas no microondas (Worten, modelo MWK618D) a 900W, onde permaneceram em ebulição durante 10 minutos.

As amostras foram submetidas ao bloqueio da actividade da peroxidase endógena através da incubação, durante 10 minutos, em peróxido de hidrogénio a 30% (Merck) diluído a 1:50 numa solução de Metanol (Merck). Foram seguidamente lavadas em TBS e incubadas (em câmara húmida durante 5 minutos) no Protein-Block (Novocastra). Este procedimento permite evitar possíveis ligações inespecíficas dos anticorpos primários e do polímero.

As lâminas foram então incubadas com o anticorpo primário (E-caderina, Zymed clone 4A2C7) diluído a 1:50 em BSA a 5%, durante 1h 30m em câmara húmida. De seguida, foram realizadas duas lavagens (de 5 minutos cada) em TBS, e foi feita a incubação com o Post-primary Block (NovoLink) durante 30 minutos, sendo este um activador da penetração do polímero.

Em seguida as amostras foram novamente lavadas duas vezes (5 minutos cada) em TBS, e incubadas com NovoLink Polymer, que reconhece imunoglobulinas de rato e coelho e detecta quaisquer anticorpos primários ligados ao tecido, durante 30 minutos.

Procedeu-se a duas novas lavagens em TBS (5 minutos em cada).

Por fim foi efectuada a revelação da reacção com Diaminobenzidina (DAB) a 1mg/ml, em tampão TRIS 0,05M a pH7,6 (Dako), ao qual se adicionou peróxido de hidrogénio a 30% (Merck) na diluição de 0,075%, durante 5 a 7 minutos, de acordo com os marcadores.

Por fim, procedeu-se a lavagem em água corrente, seguido de utilização em Hematoxilina (Merck), como contrastante, por um período de 30 segundos, desidratação e montagem com Entellan (Merck). Foi incluído um controlo positivo de cólon humano e o controlo negativo foi efectuada substituindo o anticorpo primário por PBS

A avaliação da expressão da E-Cad foi realizada tendo em conta um precipitado acastanhado, tanto na membrana como no citoplasma celular, sendo utilizado um método semi-quantitativo para esta análise, que consiste no **padrão (M – Membranar ; C - Citoplasmático)** e **percentagem (0, negativo; - , <10%; +/-, 10 – 90%; ++, >90%)** das células marcadas por este anticorpo.

Tabela 1 - Classificação histológica das amostras de tecido mamário felino seleccionadas para estudos imunohistoquímicos.

Diagnostico histológico	Nº de casos	Metástases ganglionares
Glândula mamária normal	3	NA
Hiperplasias/ Displasias		
Doença fibroquística	10	NA
Alteração fibroadenomatosa	9	NA
Tumores Benignos:		
Tumor misto benigno	1	NA
Adenoma simples	4	NA
Adenoma complexo	1	NA
Fibroadenoma	3	NA
Tumores Malignos:		
Carcinoma tubulopapilar	19	5
Carcinoma sólido	15	5
Carcinoma cribriforme	12	1

NA – Não existem casos

2.2. Resultados

Para avaliar os resultados imunohistoquímicos, teve-se em conta, como controlo interno foi utilizada a marcação da epiderme assim como dos anexos cutâneos, apenas nos casos de cortes histológicos de tecido mamário.

A expressão de tipo membranar caracterizou-se pela presença de uma marcação acastanhada na membrana celular. A expressão citoplasmática caracterizou-se por um granulado acastanhado disperso pelo citoplasma celular.

2.2.1. Glândula Mamária Normal

No epitélio luminal observou-se marcação de tipo membranar nos 3 casos analisados, tendo sido registado em 2 deles uma marcação da quase totalidade da população celular (>90%); no entanto, no outro caso a percentagem de células epiteliais marcadas varia entre 10% a 90%. Não foi observada imunoreactividade da componente mioepitelial.

Tabela 2 - Padrão e grau de expressão da E-Caderina no tecido mamário normal.

Caso nº	Epitélio luminal	
	Padrão	Percentagem (%)
1	M	10 a 90
2	M	>90
3	M	>90

(M) Membranar

2.2.2. Alterações Hiperplásicas/Displásicas

2.2.2.1. Alterações Fibroadenomas

Em 4 casos verificou-se marcação de padrão membranar, sendo que 1 dos casos apresentava 10% a 90% da população celular do epitélio luminal marcada e os remanescentes 3 casos apresentavam >90% das células marcadas. Nos restantes 5 casos verificou-se marcação tanto na componente membranar como citoplasmática numa proporção de >90% da população celular do epitélio luminal apenas na membranar. Na análise do mioepitélio apenas três casos apresentavam imunoreactividade entre 10% a 90% da população celular.e um caso com marcação citoplasmática menor de 10% da população mioepitelial.

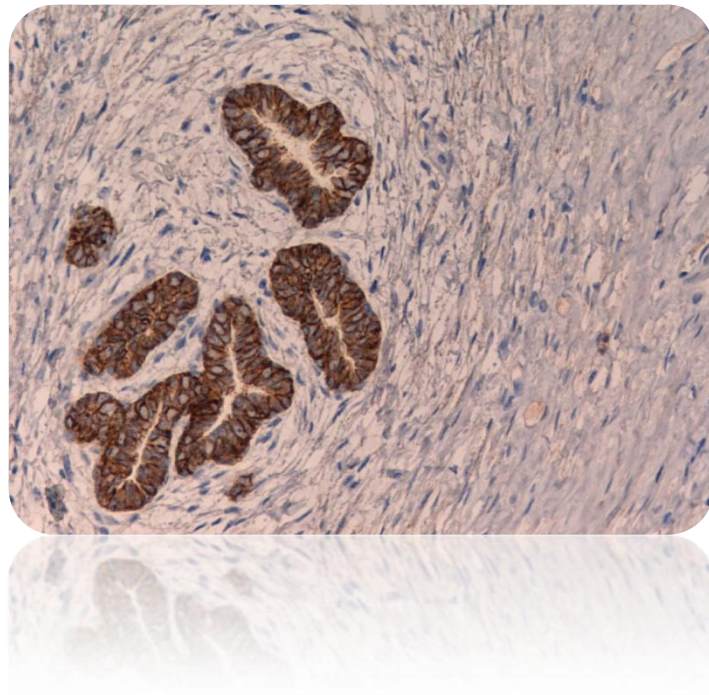


Fig. 1 Alteração fibroadenomatosa. Imunoexpressão membranar da E-caderina no epitélio luminal. 200x

Tabela 3 - Padrão e grau de expressão da E-caderina na Alteração Fibroadenomatosa da glândula mamária.

Caso n°	Epitélio Luminal		Mioepitélio	
	Padrão	Percentagem (%)	Padrão	Percentagem (%)
4	M	10 a 90	—	—
5	M	>90	—	—
6	M	>90	C	10 a 90
7	M	>90	—	—
8	M+C	>90	C	10 a 90
9	M+C(p)	>90	C	<10
10	M+C (p)	>90	—	—
11	M+C (p)	>90	M	10 a 90
12	M+C (p)	>90	—	—

(M) Membranar; (C) Citoplasmática; (—) sem qualquer marcação; (p) marcação pontual

2.2.2.2. Doença fibroquística

Nos 10 casos de doença fibroquística foi observado que em 8 (n=10) deles o padrão membranar da imunomarcção era compreendido em 6(n=8) casos de 10% a 90% da população celular. 4 casos com >90% , sendo que 2 casos apresentavam coexistência de imunomarcção membranar e citoplasmática na quase totalidade do epitélio luminal e outros 2 apenas com imunomarcção membranar. No caso 20 foi registada imunomarcção no mioepitélio, tanta marcação citoplasmática como membranar em mais de 90% da população celular.

Tabela 4 - Padrão e grau de expressão da E-caderina na Doença Fibroquística.

Caso n°	Epitélio Luminal		Mioepitélio	
	Padrão	Percentagem (%)	Padrão	Percentagem (%)
13	M	10 a 90	—	—
14	M+C	>90	—	—

15	M	>90	—	—
16	M	>90	—	—
17	M	10 a 90	—	—
18	M	10 a 90	—	—
19	M+C (p)	>90	—	—
20	M	10 a 90	M+C	>90
21	M	10 a 90	—	—
22	M	10 a 90	—	—

(M) Membranar; (C) Citoplasmática; (—) sem qualquer marcação; (p) marcação pontual

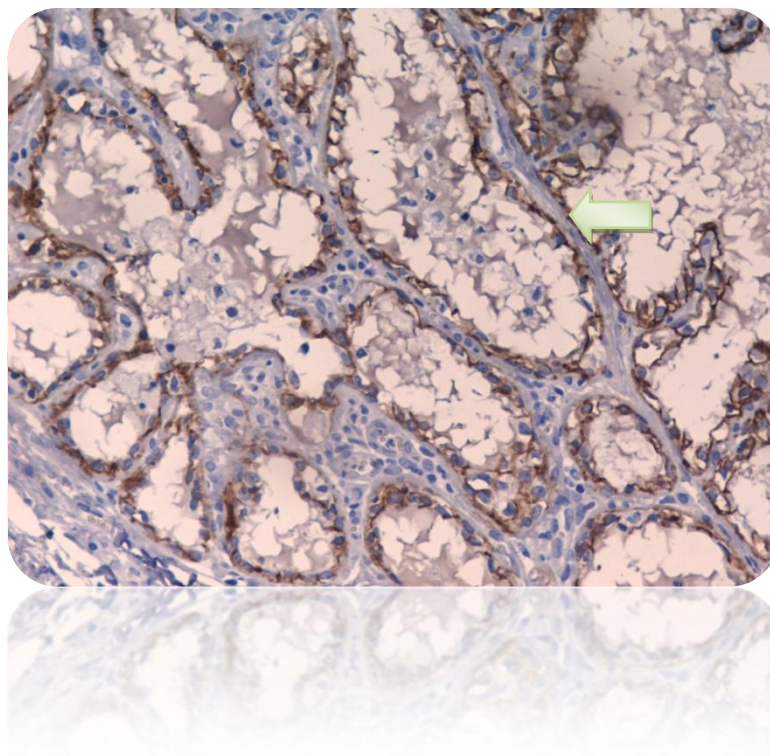


Fig. 2 Doença fibroquística. Imunomarcação do tipo membranar no epitélio luminal. São identificáveis áreas quísticas com septos fibrosos (seta). 200x

2.2.3. Neoplasias Benignas

Em 9 neoplasias benignas, 3 eram fibroadenomas, dos quais 1 apresentava marcação membranar e citoplasmática do epitélio luminal e os restantes 2 apenas marcação membranar. Os 3 casos referidos apresentavam mais de 90% das células epiteliais

luminais marcadas, 2 apresentavam marcação citoplasmática na população celular do mioepitélio e o caso 25 com marcação membranar e citoplasmática. Nos dois primeiros verificou-se que um apresentava uma percentagem acima dos 90% e o outro de 10 a 90% da população celular mioepitelial marcada. O caso remanescente de marcação mioepitelial tinha uma percentagem de 10 a 90% de células marcadas.

Em 4 casos de adenoma simples registou-se uma marcação apenas da membrana citoplasmática do epitélio luminal, em que 2 casos apresentavam 10% a 90% de marcação, nos restantes (n=2) identificou-se marcação em mais de 90% das células do epitélio luminal. No único adenoma complexo foi observada marcação membranar do epitélio luminal em 10 a 90% da população celular.

No último caso de neoplasia benigna, diagnosticado como Tumor Misto Benigno foi observada marcação da membrana celular do epitélio luminal na quase totalidade da componente neoplásica (> 90%).

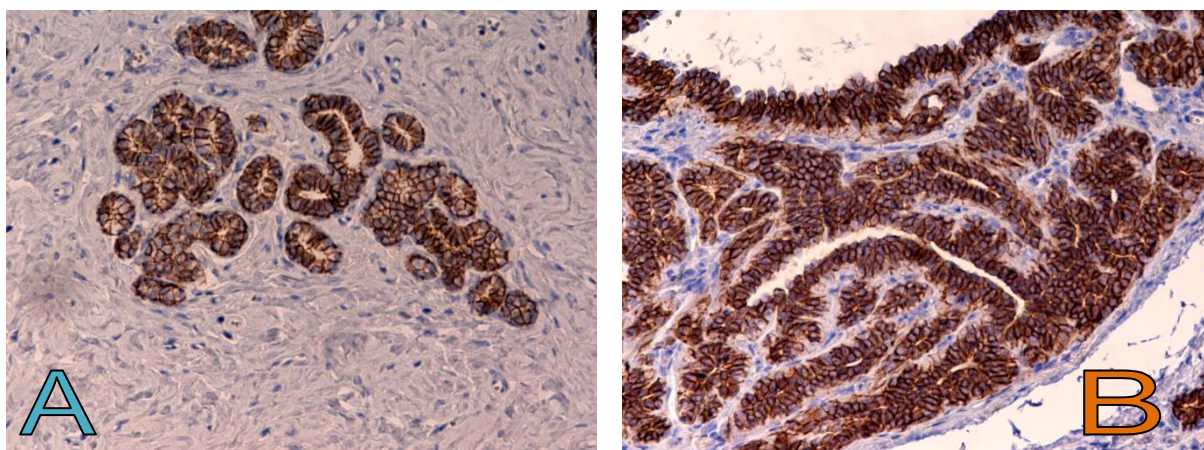


Fig. 3 A -Fibroadenoma papilar com epitélio luminal marcado para o anticorpo E-cad; B - Adenoma Simples com marcação membranar do epitélio luminal (200x)

Tabela 5 - Padrão e grau de expressão da E-caderina em neoplasias benignas da glândula mamária.

Caso nº	Diagnóstico ¹	Epitélio Luminal		Mioepitélio	
		Padrão *	Percentagem (%)	Padrão *	Percentagem (%)
23	FAP	M	>90	C	10 a 90
24	FAP	M+C	>90	C	>90
25	FAP	M	>90	M+C	10 a 90

26	ADS	M	>90	—	—
27	ADS	M	>90	—	—
28	ADS	M	10 a 90	—	—
29	ADS	M	10 a 90	—	—
30	ADC	M	10 a 90	—	—
31	TMB	M	>90	—	—

* (M) Membranar; (C) Citoplasmática; (—) sem qualquer marcação

¹ (FAP) Fibroadenoma papilar; (ADS) Adenoma simples; (ADC) Adenoma complexo; (TMB) Tumor misto benigno

2.2.4. Neoplasias malignas

2.2.4.1. Carcinoma Tubulopapilar

Em 13/19 carcinomas tubulopapilares observou-se imunomarcção do tipo membranar no epitélio luminal, apresentando um caso percentagem de marcação inferior a 10%, 7 casos imunomarcção entre 10% a 90% e 5 casos imunomarcção em >90% da população celular. Nos casos em que a imunomarcção se observa tanto a nível membranar como citoplasmático (n=6), 4 deles apresentam 10% a 90% do epitélio luminal marcado enquanto que nos restantes 2 casos a marcação se apresenta na sua quase totalidade (>90%). Pode-se observar de uma forma geral diminuição de marcação da E-Cad nas lesões primárias em que o epitélio luminal apresentava um pleomorfismo acentuado.

2.2.4.1.1. Metástases ganglionares

Foram analisados 5 casos com lesão primária e gânglios metastisados. Assim, em 2 destes casos, os gânglios mantiveram o padrão membranar já existente na lesão principal, havendo num deles o aumento da percentagem da marcação do epitélio luminal de menos de 10% para 10 a 90% da população celular marcada, e no outro de 10% a 90% para a quase totalidade da marcação do epitélio luminal (> 90%). Nas metástases ganglionares que divergiram no padrão de marcação, um caso adquiriu marcação citoplasmática que não se verificou na lesão primária, mantendo apenas a proporção de células do epitélio luminal marcadas na sua quase totalidade (>90%). Outros dois casos perderam o padrão de marcação, comparativamente à lesão original

para o gânglio metastisado, membranar num dos casos e citoplasmática no restante, tendo permanecido a percentagem de células do epitélio luminal no primeiro caso e diminuído no segundo caso de 10 a 90% para menos de 10%.

Tabela 6 - Padrão e grau de expressão da E-caderina em Carcinomas tubulopapilares (CTP) e metástases ganglionares.

Caso nº	Diagnóstico	Epitélio Luminal	
		Padrão	Percentagem (%)
32	CTP	M	10 a 90
33	CTP	M	10 a 90
34	CTP	M	10 a 90
35	CTP	M	10 a 90
36	CTP	M	10 a 90
37	CTP	M	10 a 90
38	CTP	M	>90
39	CTP	M	>90
40	CTP	M	>90
41	CTP	M	>90
42	CTP	M+C	10 a 90
43	CTP	M+C	10 a 90
44	CTP	M+C	10 a 90
45	CTP	M+C	>90
46	CTP	M	10 a 90
	Metástase ganglionar	M+C	>90
47	CTP	M	>90
	Metástase ganglionar	M	10 a 90
48	CTP	M	>90
	Metástase ganglionar	C	>90
49	CTP	M+C	10 a 90
	Metástase ganglionar	M	>90
50	CTP	M+C	>90
	Metástase ganglionar	M	<10

(M) Membranar; (C) Citoplasmática; (CTP) Carcinoma tubulopapilar lesão original

2.2.4.2 Carcinoma Sólido

Nos carcinomas sólidos observa-se que o padrão membranar está presente em 9 casos, em que a imunomarcagem do epitélio luminal em 5 deles foi de 10% a 90% e os restantes casos (n=4) uma marcação maior de 90% da população celular do epitélio luminal. Os casos que apresentam coexistência de imunomarcagem membranar e citoplasmática (n=6), 4 casos registaram uma percentagem de 10% a 90% do epitélio luminal e nos remanescentes a quase totalidade da marcação do epitélio luminal. Nos carcinomas sólidos foi identificada perda de expressão da E-Cad.

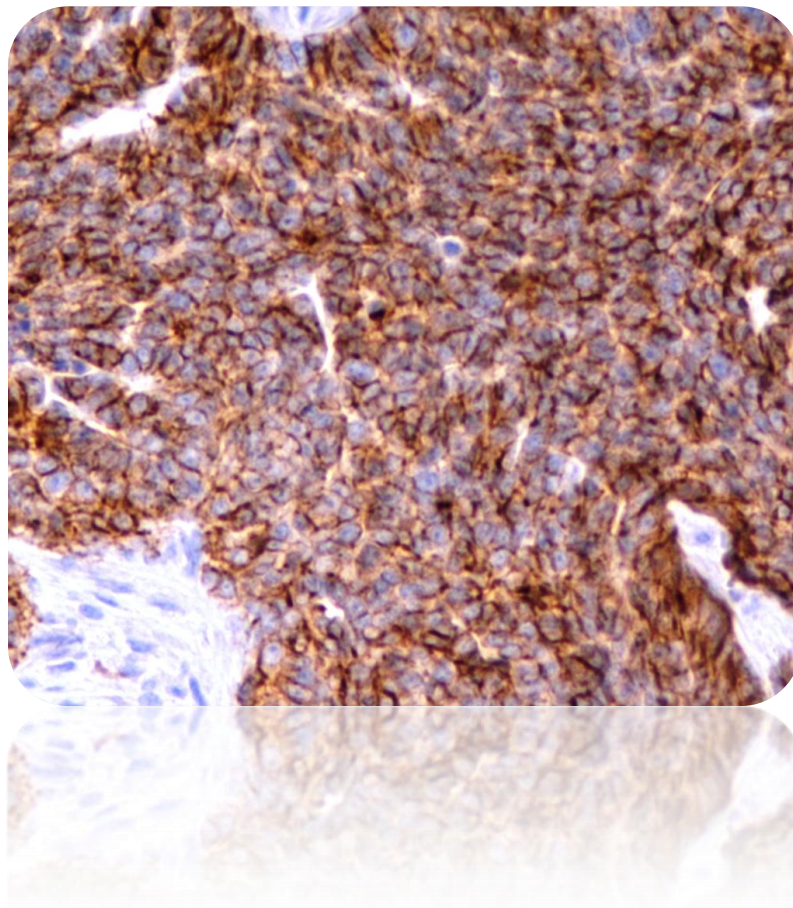


Fig. 4 Carcinoma sólido. Imunomarcagem citoplasmática e membranar no epitélio luminal . 200x

2.2.4.2.1. Metástases ganglionares

Nas metástases ganglionares dois casos não conservaram o padrão citoplasmático presente no tumor primário, mas apenas um destes casos manteve a percentagem de marcação no epitélio luminal que invadiu o gânglio linfático (10% a 90%) e outro diminuiu, relativamente à lesão primária, de mais de 90% para 10 a 90% da população de células do epitélio luminal. Nas restantes metástases ganglionares verificou-se 1 caso com marcação membranar, que apresentou uma diminuição da percentagem de marcação de mais de 90% na lesão primária e de 10 a 90% da população celular epitelial metastáticas do gânglio linfático, outro manteve uma percentagem de 10% a 90% da marcação e manteve a marcação citoplasmática e membranar.

Tabela 7 - Padrão e grau de expressão da E-caderina em Carcinomas sólidos e metástases ganglionares.

Caso n°	Diagnóstico	Epitélio Luminal	
		Padrão	Percentagem (%)
51	Carcinoma Sólido	M	10 a 90
52	Carcinoma Sólido	M	10 a 90
53	Carcinoma Sólido	M	10 a 90
54	Carcinoma Sólido	M	10 a 90
55	Carcinoma Sólido	M	10 a 90
56	Carcinoma Sólido	M	>90
57	Carcinoma Sólido	M	>90
58	Carcinoma Sólido	M	>90
59	Carcinoma Sólido	M+C	10 a 90
60	Carcinoma Sólido	M+C	10 a 90
61	Carcinoma Sólido	M+C	>90
62	Carcinoma Sólido	M	>90
	Metástase ganglionar	M	10 a 90
63	Carcinoma Sólido	M+C	10 a 90
	Metástase ganglionar	M	10 a 90
64	Carcinoma Sólido	M+C	10 a 90
	Metástase ganglionar	M+C	10 a 90

65	Carcinoma Sólido	M+C	>90
	Metástase ganglionar	M	10 a 90

(M) Membranar; (C) Citoplasmática

2.2.4.3. Carcinoma Cribriforme

Nos carcinomas cribriformes 8/12 apresentaram marcação membranar, mas apenas 6 destes apresentavam marcação entre os 10% a 90% das células epiteliais, enquanto que os restantes 2 marcavam a população celular quase na totalidade (>90%).

Os casos em que se observou a dupla marcação (n=4), tanto membranar como citoplasmática, 3 casos marcavam o epitélio luminal entre 10% a 90% e o quarto caso mais de 90% da marcação. Nestes casos de dupla marcação a componente citoplasmática apresentava marcação pontual (p).

2.2.4.3.1. Metástase ganglionar

Na metástase ganglionar a marcação membranar apresentou padrão semelhante ao tumor primário, tendo mantido a percentagem de marcação do epitélio luminal que metastizou para o gânglio linfático (10% a 90%).

Tabela 8 - Padrão de expressão da E-caderina nos carcinomas cribriformes da glândula mamária e metastases gânglionares.

Caso nº	Diagnóstico	Epitélio Luminal	
		Padrão	Percentagem (%)
66	Carcinoma Cribriforme	M	>90
67	Carcinoma Cribriforme	M	10 a 90
68	Carcinoma Cribriforme	M	10 a 90
69	Carcinoma Cribriforme	M+C(p)	10 a 90
70	Carcinoma Cribriforme	M	>90
71	Carcinoma Cribriforme	M	10 a 90
72	Carcinoma Cribriforme	M	10 a 90

73	Carcinoma Cribriforme	M+C(p)	10 a 90
74	Carcinoma Cribriforme	M+C(p)	10 a 90
75	Carcinoma Cribriforme	M+C(p)	>90
76	Carcinoma Cribriforme	M	10 a 90
77	Carcinoma Cribriforme	M	10 a 90
	Metástase Ganglionar	M	10 a 90

(p) marcação pontual

2.3. Discussão

Em tecido mamário normal observou-se o padrão membranar em todas as amostras analisadas, o que demonstra a forma regular e padronizada de marcação da E-Cad. A percentagem de células numa das amostras foi menor, no entanto poderá se justificar consoante a altura do ciclo éstrico em que a gata se encontrava no momento da exérese mamária.

Nas alterações fibroadenomas (AF) verificou-se que 44,44% mantiveram o padrão membranar, tal como descrito no tecido mamário normal. Nos restantes 55,56% observou-se marcação citoplasmática para além da membranar, que demonstra alguma alteração no comportamento da E-Cad neste tipo histológico (Tabela 3)

Nos casos de doença fibro-quística (DFQ), contrariamente à AF, apenas 20% apresentavam o padrão citoplasmático, enquanto que nos restantes 80% mantiveram, tal como no tecido mamário normal, a marcação membranar. O comportamento que se revelou diferente da AF e da mama normal, foi que em 60% da totalidade dos casos de DFQ registou-se diminuição de marcação de população celular epitelial.

Em todos os casos de neoplasia benigna apenas um apresentou uma marcação citoplasmática para além da marcação membranar, o fibroadenoma papilar. A marcação citoplasmática, como recentemente estudado por LAPYCKYJ et al. 2010, poderá ser um indicio de malignidade. No entanto, em dois casos de adenoma simples e num caso de adenoma complexo observou-se uma marcação de 10 a 90% do epitélio luminal o que indica a perda de alguma adesão celular, com provável evolução para uma lesão com características de malignidade.

Em carcinomas tubulopapilares a diminuição da E-cad foi menor comparativamente com o carcinoma sólido, ocorrendo na maioria dos casos de CTP conservação da expressão e padrão da E-Cad, em que 68,42% mantiveram a marcação membranar e 31,58% apresentaram uma localização aberrante da E-Cad no seu citoplasma. Estes resultados terão sido observados em cadelas no estudo realizado por MATOS et al. (2006), este resultado poderá ter alguma relação com facto do CTP apresentar algum grau de organização morfológica, dependendo na sua maioria de moléculas de adesão (GUMBINER, 1996).

Em 9/15 casos de carcinomas sólidos a perda de expressão da E-Cad no epitélio luminal, em que se verificou zona de necrose na maioria destes casos , tendo já sido analisado o mesmo tipo de resultado em cadelas (MATOS et al., 2006, RESTUCCI et al., 1997). Em 6/15 casos apresentam a mesma marcação aberrante da E-Cad no citoplasma. Com a diminuição da imunomarcação da E-cad e a marcação aberrante no citoplasma poderá mostrar que esta progressão tenha algum envolvimento no processo de carcinogénese.

No carcinoma cribriforme 70% dos casos analisados, observou-se uma redução da população de células marcadas pelo anticorpo E-Cad, o que demonstra comparativamente com outras neoplasias malignas alguma semelhança no que revela a perda de expressão desta proteína, isto vem de encontro com um estudo realizado por Mastropasqua *et al*, 2005, em carcinomas mamários de mulher, que indica haver pouco diferenciação entre neoplasias malignas.

3. Ki-67

3.1 Introdução

A avaliação da proliferação tumoral é um importante factor para o diagnóstico do cancro da mama, visto o índice proliferativo fornecer informações úteis sobre o prognóstico e agressividade de carcinomas. Motivo pelo qual têm sido desenvolvidos vários métodos para avaliar a taxa de proliferação de células tumorais (ESTEVA et al., 2004).

A citometria de fluxo nem sempre é um método eficaz de quantificação da proliferação celular, pela quantidade necessária de tecido por este motivo tem sido utilizado o método imunohistoquímico na medição da proliferação tumoral. O facto da proteína Ki-67 estar presente durante as fases activas do ciclo celular (G1, S, G2 e Mitose) e ausente durante a fase de repouso celular (G0) faz dela um excelente marcador para a determinação da chamada fracção de crescimento duma população celular (VERONESE et al., 1993). A fracção de células tumorais positivas para Ki-67 está frequentemente relacionada com o curso clínico da doença. Os melhores exemplos estudados neste contexto são os carcinomas da próstata e da mama. Nestes tipos tumorais, o valor prognóstico no que respeita ao tempo de sobrevida e recorrência tumoral têm sido repetidamente comprovadas em análises uni e multivariada (DE MATOS et al., 2006, SCHOLZEN et al., 2000).

Existe uma fosfoproteína nuclear, o anticorpo MIB-1 monoclonal, que é capaz de detectar na fase activa do ciclo celular o antigénio (Ki-67), através de uma reacção cruzada em secções de tecidos da gata congelados e embebidos em parafina (MILLANTA et al., 2002).

O MIB-1 medido em secções de parafina é um método útil para avaliar a proliferação num ambiente de rotina laboratorial. No entanto, como factor de prognóstico para a sobrevida em carcinomas mamários de felinos, tem produzido resultados conflituosos, sendo ainda bastante discutível o seu papel como marcador de prognóstico (MILLANTA et al., 2002).

Sobre este anticorpo, existem estudos que demonstram uma correlação com vários factores, nomeadamente o grau histológico, o índice mitótico, o intervalo livre de doença e o tempo de sobrevida, sendo que o grupo de patologias estudado foi o de

carcinomas mamários infiltrativos da espécie Humana (BERESFORD et al., 2006). Outros estudos na mulher, estabeleceram correlação entre a imunoreactividade do Ki-67, em neoplasias mamárias malignas, com a idade do indivíduo (MIRECKA et al., 1993), o tamanho da massa tumoral (OSTROWSKI et al., 1995) e a capacidade metastática (STUMPP et al., 1992).

A proteína Ki-67 é amplamente utilizada na medição do índice proliferativo e está associada ao processo de malignidade, mesmo em espécimes de citologia aspirativa por agulha fina. Além disso, a sua relação intrínseca com a apoptose e p53 parece ser de importância no diagnóstico e prognóstico dos precursores tumorais e lesões mamárias pré-invasivas : baixa expressão de Ki-67 /bcl- 2 positivo e p53 negativo são uma característica de hiperplasia ductal atípica e de carcinomas bem diferenciados. (ZAGOURI et al., 2007).

Os estudos realizados em Patologia Veterinária em cadela revelam de igual forma a correlação em aspectos histológicos, nomeadamente, o tipo histológico, o grau de diferenciação (PEREZ ALENZA et al., 2000), o grau de pleomorfismo nuclear (PENA et al., 1998), a inexistente expressão de receptores hormonais (GERALDES et al., 2000), a metastização (PENA et al., 1998) e o tempo de sobrevivência dos animais (PENA et al., 1998). Em gatas os estudos realizados não demonstram qualquer relação entre a imunoreactividade do Ki-67 e a idade ou o tipo histológico em neoplasias mamárias(MILLANTA et al., 2002). Contudo, um estudo clínico revelou que a reactividade ao marcador de proliferação, Ki-67, constitui um factor de prognóstico a considerar no diagnóstico de neoplasias mamárias felinas (CASTAGNARO et al., 1998c).

3.2 Material e Métodos

Neste estudo de índice proliferativo foram usadas as mesmas amostras que para o estudo da E-caderina, com excepção das metástases ganglionares.

No anticorpo Ki-67 foi realizado segundo o método do complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (ABC), foram utilizadas lâminas de vidro revestidas com APES (3-AMINOPROPYLTRIEHOXYSILANE), que funciona como meio de adesão, evitando-se deste modo o arrastamento do material ao longo das sucessivas lavagens e tratamentos a que é submetido.

Os cortes histológicos utilizados para a avaliação da imunexpressão do Ki-67 foram desparafinados, hidratados e seguidamente submetidos a recuperação antigénica. Foram colocados em solução retrievevel (Dako) em banho-Maria, durante 20 minutos a fim de desmascarar os epítomos.

Posteriormente, as amostras foram submetidas ao bloqueio da actividade da peroxidase endógena através da incubação, durante 10 minutos, em peróxido de hidrogénio a 30% (Merck) diluído a 1:50 numa solução de Metanol (Merck). Foram seguidamente lavadas em TBS e a incubadas (em câmara húmida durante 5 minutos) no Protein-Block (Novocastra). Este procedimento permite evitar possíveis ligações inespecíficas dos anticorpos primários e do polímero.

As lâminas foram então incubadas com o anticorpo primário (Ki-67, Dako clone MIB-1) diluído a 1:40 em BSA a 5%, durante 1h 30m em câmara húmida. De seguida, foram realizadas duas lavagens (de 5 minutos cada) em TBS, e foi feita a incubação com o Post-primary Block (NovoLink) durante 30 minutos, sendo este um activador da penetração do polímero.

Em seguida as amostras foram novamente lavadas duas vezes (5 minutos cada) em TBS, e incubado com NovoLink Polymer, que reconhece imunoglobulinas de ratinho e coelho e detecta quaisquer anticorpos primários ligados ao tecido, durante 30 minutos. Procedeu-se a duas novas lavagens em TBS (5 minutos em cada).

A revelação foi realizada com Diaminobenzidina (DAB) a 1mg/ml, em tampão

TRIS 0,05M a pH7,6 (Dako), ao qual se adicionou peróxido de hidrogénio a 30% (Merck) na diluição de 0,075%, durante 5 a 7 minutos, de acordo com os marcadores.

Por fim, procedeu-se a lavagem em água corrente, seguido de utilização em Hematoxilina (Merck), como contrastante, por um período de 30 segundos, desidratação e montagem com Entellan (Merck).

A imunoreactividade foi considerada positiva na presença de uma coloração nuclear acastanhada, independentemente da sua intensidade. Na análise das amostras foram efectuados os procedimentos habituais no diagnóstico do Ki-67, usado o método quantitativo, com base na contagem de 100 células em 10 campos de grande ampliação (X400), perfazendo um total de 1000 células por caso. Foram seleccionados campos histológicos da periferia das lesões, associados a uma actividade proliferativa mais intensa, tendo sido evitadas as áreas de necrose e inflamação. A contagem foi realizada com o auxílio de uma ocular com retículo e obedecendo a uma sequência sistematizada pré-definida. A actividade proliferativa das diversas amostras, determinada como número de células positivas por 1000 células contadas, foi expressa sob a forma de percentagem.

A análise estatística dos resultados foi realizada com a aplicação de técnicas de análise de variância (Anova). As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

3.3 Resultados

3.3.1. Tecido mamário normal

Nas amostras de tecido mamário normal, verificou-se que a imunorreactividade ao anticorpo MIB-1 era muito reduzida, variando entre 0,4 e 2,3% com um valor médio de 1,73% ($\pm 1,16$ DP).

3.3.2. Alterações Hiperplásicas/Displásicas

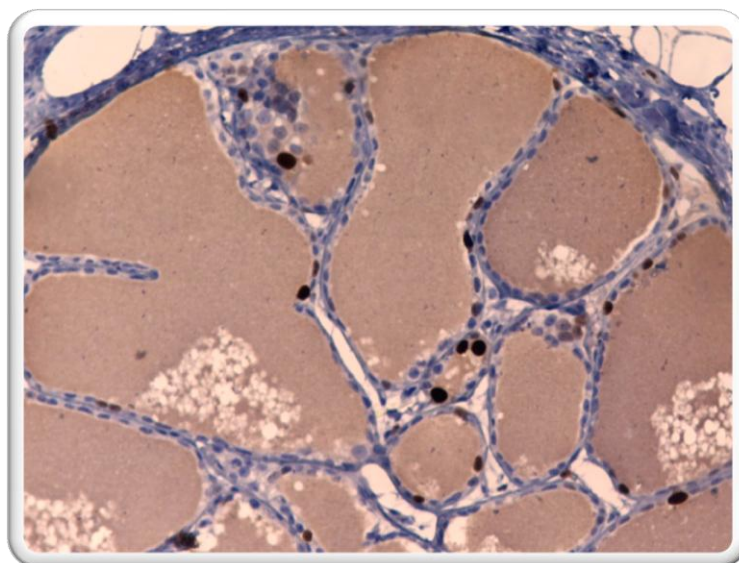


Fig. 5 Doença Fibro-quística Imunomarcção nuclear para o anticorpo MIB-1 200x

A nível das alterações hiperplásicas e displásicas foram estudadas a imunorreactividade do marcador MIB-1 entre doença fibroquística e as alterações fibroadenomas, havendo uma grande discrepância. Nas alterações fibroadenomas a marcação da população celular epitelial, presente tanto nas estruturas alveolares como nas ductais, apresentou valores de positividade que oscilaram entre 8,8 e 41,4%, com uma média de 23,8% ($\pm 9,9$ DP). Em relação à componente do estroma, verificou-se que a imunorreactividade ao MIB-1 variou entre os 8,3 e 31,6%, com um valor médio de

18,3% ($\pm 7,6$ DP). Com esta análise foi possível verificar uma diferença a nível da marcação no tecido conjuntivo intralobular laxo , visto estar em maior quantidade que no tecido conjuntivo interlobular denso. A nível da marcação do MIB-1 na população celular, na lesão denominada doença fibroquística, variou entre os 3,8 e 16,1%, com uma média de 7,6% ($\pm 4,3$ DP).

3.3.3 Neoplasias benignas

Nos adenomas simples o MIB-1 apresentou imunoreactividade numa percentagem de células tumorais compreendida entre 12,7 a 21,4%, com uma média de 17,1% ($\pm 4,2$ DP).

Nos casos de fibroadenoma papilar obtiveram-se índices de proliferação de 5,5 a 9,3%, com uma média de 7,1% ($\pm 1,9$ DP). Na componente mesenquimatosa a marcação abrangeu entre 1,7 a 8,5%, com um valor médio de 4,1% ($\pm 3,7$ DP). Em lesões benignas denominadas de tumor misto benigno em que apresentava uma zona de metaplasia condróide, a actividade proliferativa era muito baixa(12,9% células do epitélio luminal marcadas).

3.3.4 Neoplasias Malignas

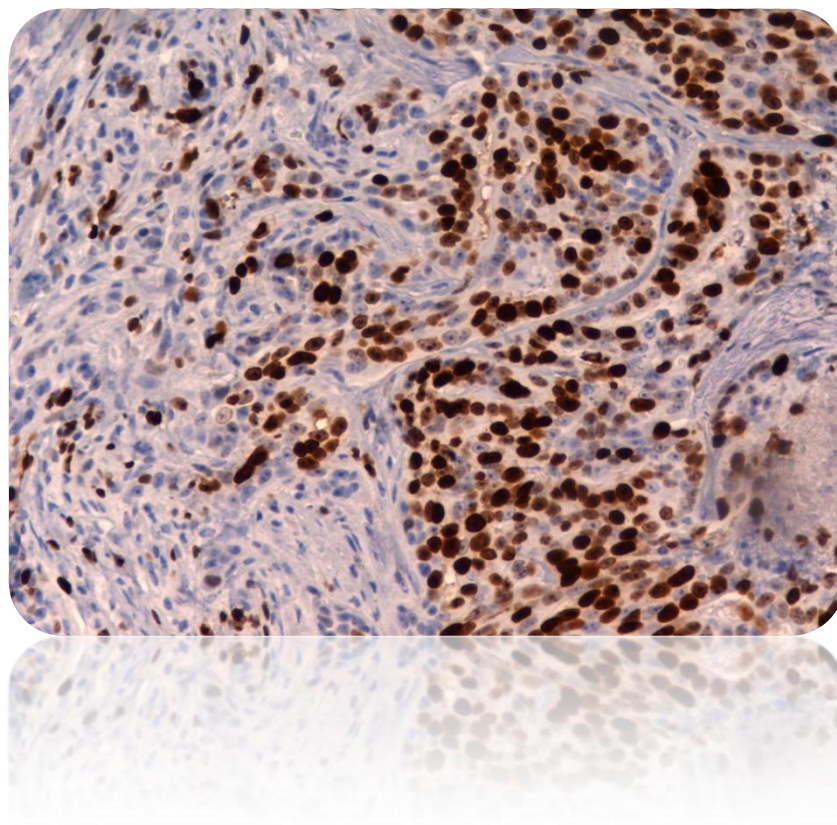


Fig. 6 Carcinoma sólido. Imunomarcação nuclear para o anticorpo MIB-1. 400x

Nos carcinomas, a marcação positiva estava associada à componente epitelial luminal. Verificou-se que a imunorreactividade ao anticorpo MIB-1 variava de 10,9 a 68,2%, tendo-se registado um valor médio de 37,7% ($\pm 16,7$ DP). As diferenças na actividade proliferativa dos diversos tipos histológicos de carcinoma foram muito ténues; efectivamente, nos carcinomas tubulopapilares obteve-se um valor médio de 32,5% ($\pm 14,2$ DP), nos cribriformes de 32,8% ($\pm 13,7$ DP) e nos sólidos de 47,5% ($\pm 14,2$ DP).

Tabela 9 - Diferença e significância estatística entre a actividade proliferativa (percentagem média de células marcadas com anticorpo MIB-1) nos diferentes tipos histológicos de tecido mamário felino.

Parâmetro	Médias %	Desvio Padrão
Alterações hiperplásicas vs Glândula normal (<i>ns</i>)	17,52 vs 1,73	15,73
Neoplasia benigna vs Mama normal *	12,01 vs 1,73	6,85
Neoplasia maligna vs Mama normal *	37,76 vs 1,73	18,44
Neoplasia maligna vs Neoplasia benigna *	37,76 vs 12,01	18,20
Neoplasia maligna vs Alterações hiperplásicas *	37,76 vs 17,52	18,83
Alterações fibroadenomas vs Doença fibroquística **	28,51 vs 7,62	15,90
Carcinoma tubulopapilar vs Carcinoma sólido **	33,76 vs 47,54	17,31
Carcinoma tubulopapilar vs Carcinoma cribriforme (<i>ns</i>)	33,76 vs 32,36	15,98
Carcinoma sólido vs Carcinoma cribriforme **	47,54 vs 32,36	15,94

* $p < .001$; ** $p < .05$; *ns* = sem significância

3.4 Discussão

Na avaliação do índice proliferativo através da imunomarcagem pelo anticorpo Ki-67 verificou-se que no tecido mamário normal de gata, o índice era bastante baixo (1,73% ($\pm 1,16DP$)), como já foi descrito em outros estudos da glândula mamária de gata, em que o valor demonstrado para o índice proliferativo era menor que 1% (MILLANTA et al., 2002).

Entre neoplasias benignas e mama normal há uma maior percentagem de células marcadas em neoplasias benignas do que na mama normal. A neoplasia benigna apresenta alterações morfológicas tanto a nível estrutural como a nível celular, comparativamente à mama normal.

Há uma relação de progressão da neoplasia benigna (média de 12,01%) para neoplasia maligna (média de 37,76%), em que o aumento do Ki-67 pode ser um factor de prognóstico (CASTAGNARO et al., 1998c), considerando objectivamente os seguintes factores: tipo histológico, grau de diferenciação celular, grau de pleomorfismo nuclear e tempo de sobrevivência, que tende a diminuir quanto maior for a percentagem do índice proliferativo (GERALDES et al., 2000, PENA et al., 1998, PEREZ ALENZA et al., 2000). Estes factores foram também constatados em estudos de carcinomas mamários da mulher (JENSEN et al., 1997, KUNZ et al., 1993).

Na sequência desta análise verificou-se a progressão dos grupos de alteração hiperplásica (média de 17,52%) para o grupo de neoplasias maligna (média de 37,76%), demonstrando que o aumento do índice proliferativo poderá estar envolvido na carcinogénese.

No grupo das hiperplasias, as alterações fibroadenomas (média de 28,51 %) apresentaram um índice proliferativo mais elevado comparativamente aos casos de doença fibroquística (média de 7,62%). A alteração fibroadenomatosa verifica-se através da análise microscópica, por esta apresentar uma hiperplasia celular tanto no epitélio luminal, mioepitélio e porção mesenquimatosa.

No grupo de neoplasias malignas em gata, o carcinoma sólido destaca-se por ser o tumor mamário com o maior índice proliferativo (47,54%), sendo o carcinoma sólido,

em mulheres, uma das principais causas de morte em tumores mamários (VAN DIEST et al., 2004).

4. Cox-2

4.1 Introdução

A ciclooxigenase (COX) é uma enzima que faz parte da conversão do ácido araquidónico em prostaglandinas pro-inflamatórias (DANNHARDT et al., 2001, DAVIES, 2003, DEMPKE et al., 2001).

O sistema da enzima COX contém duas isoformas: COX-1, que é uma proteína expressa em quase todos os tecidos e participa em algumas actividades da fisiologia normal de organismos vivos; a COX-2 na qual este trabalho se debruça, apresenta-se de forma escassa em tecidos normais, mas com grande expressão por indução de estímulos hormonais, inflamatórios ou neoplásicos (DANNHARDT et al., 2001).

A prostaglandina E2 (PGE2) é um lípido pró-inflamatório bioactivo derivado da biosíntese a partir da COX-2, que é a mais importante prostaglandina produzida na maior parte dos tumores sólidos dos seres humanos, incluindo cancro de cólon, estômago e cancro da mama. Os inibidores selectivos da COX2 suprimem a produção de PGE2, sendo que a inibição das células endoteliais derivadas da actividade da COX-2 e subsequentemente da produção da PGI2 podem promover a agregação plaquetária e assim aumentar o risco de trombo-embolia com consequência de ataque cardíaco (WANG et al., 2006).

Foi demonstrado que a COX-2 atenua a resposta apoptótica em células tumorais, induz a angiogénese *in vitro* e promove a diminuição da funcionalidade das células T Natural Killer, actuando assim a COX-2 como imunossupressor (CHU et al., 2004).

Nos últimos anos a COX-2 tem sido identificada como um dos elementos no processo tumoral. A sobre-expressão da COX-2 em variados tipos de tumores sólidos em Humanos, da qual se destaca o cancro da mama, demonstra a importância desta enzima na tumorigénese (BRUEGGEMEIER et al., 1999, HALF et al., 2002). Estudos em cancro de mama humano têm mostrado a relação da COX-2 com variáveis clinicopatológicas, tais como, tempo de sobrevivência e período livre de doença, sugerindo que a expressão de COX-2 constitui um importante factor de diagnóstico (DENKERT et al., 2003, RISTIMAKI et al., 2002). Um estudo realizado em ratinhos transgénicos revela que a sobre expressão da COX-2 é um factor potenciador no desenvolvimento de neoplasias mamárias.

Com cadelas foi demonstrado por M.Doré *et al* (2003) que a COX-2 tem uma elevada importância na génese tumoral maligna; daí em diante foram realizados estudos

que revelaram que tanto em gatas como em cadelas existem estádios pré-neoplásicos e neoplásicos com expressão da COX-2 (DORE et al., 2003, MOHAMMED et al., 2004, QUEIROGA et al., 2007). Sobre a expressão da COX-2 foi estudado que a internalização desta molécula no citoplasma pode representar um evento precoce na oncogénese mamária de cadelas. Para além disso, a expressão da COX-2 em metástases tumorais sugere que os metabolitos da COX-2 podem ter um papel promotor na angiogénese e invasão no processo de metastização(DIAS PEREIRA et al., 2009).

Recentemente, foi realizado um estudo para caracterizar geneticamente a COX-2, em carcinomas mamários da gata, que foi comparada com outras espécies, nomeadamente a Humana e Canina, entre outras. Neste estudo comparou-se a sequenciação genética da COX-2 da gata com a da espécie humana (89% homóloga), no entanto com maior relevância para o facto de esta molécula ter uma maior proximidade genética à COX-2 expressa em neoplasias mamárias de cadela (96% de aproximação genética) (SAYASITH et al., 2009).

4.2 Material e Métodos

Em todos os casos utilizados na E-Cad foram realizadas marcações com o anticorpo COX-2 pelo método de imunohistoquímica.

No anticorpo COX-2 foi realizado segundo o método do complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (ABC), foram utilizadas lâminas de vidro revestidas com APES (3-AMINOPROPYLTRIEHTHOXYSILANE), que funciona como meio de adesão, evitando-se deste modo o arrastamento do material ao longo das sucessivas lavagens e tratamentos a que é submetido.

Os cortes histológicos utilizados para a avaliação da imunoexpressão da COX-2 foram desparafinados, hidratados e seguidamente submetidos a recuperação antigénica em solução de tampão citrato (pH 6,0) numa panela de pressão, durante 3 minutos à pressão máxima, arrefecendo de forma gradual a panela em água corrente até arrefecimento total fim de desmascarar os epítomos.

Posteriormente, as amostras foram submetidas ao bloqueio da actividade da peroxidase endógena através da incubação, durante 10 minutos, em peróxido de hidrogénio a 30% (Merck) diluído a 1:50 numa solução de Metanol (Merck). Foram seguidamente lavadas em TBS e incubadas (em câmara húmida durante 5 minutos) no Protein-Block (Novocastra). Este procedimento permite evitar possíveis ligações inespecíficas dos anticorpos primários e do polímero.

As lâminas foram então incubadas com o anticorpo primário (COX-2, clone SP21, Neomarkers/Labvision, Freemont, USA) diluído a 1:75 em BSA a 5%, durante 1h 30m em câmara húmida. De seguida, foram realizadas duas lavagens (de 5 minutos cada) em TBS, e foi feita a incubação com o Post-primary Block (NovoLink) durante 30 minutos, sendo este um activador da penetração do polímero.

Em seguida as amostras foram novamente lavadas duas vezes (5 minutos cada) em TBS, e incubado com NovoLink Polymer, que reconhece imunoglobulinas de rato e coelho e detecta quaisquer anticorpos primários ligados ao tecido, durante 30 minutos. Procedeu-se a duas novas lavagens em TBS (5 minutos em cada).

A revelação foi realizada com Diaminobenzidina (DAB) a 1mg/ml, em tampão

TRIS 0,05M a pH7,6 (Dako), ao qual se adicionou peróxido de hidrogénio a 30% (Merck) na diluição de 0,075%, durante 5 a 7 minutos, de acordo com os marcadores.

Por fim, procedeu-se a lavagem em água corrente, seguido de utilização em Hematoxilina (Merck), como contrastante, por um período de 30 segundos, desidratação e montagem com Entellan (Merck).

A avaliação da expressão da COX-2 foi realizada tendo em conta um precipitado acastanhado, tanto na membrana como no citoplasma celular, sendo utilizado um método semi-quantitativo para esta análise, que consiste na percentagem (1, <25%; 2, 25-50%; 3, 51-75%; 4, >75%) e intensidade (0, negativo; \pm , fraca; +, moderada; ++, forte) das células marcadas por este anticorpo.

4.3 Resultados

4.3.1 Glândula Mamária Normal

Nas amostras de glândula mamária de gatas foram observados 3 casos, em que dois apresentam uma percentagem de 25 a 50% da população celular marcada, com intensidade variável de fraca a moderada. No terceiro caso observou-se uma baixa percentagem de células marcadas no epitélio luminal (<25%) com fraca intensidade.

Tabela 10 - Classificação da expressão (percentagem e intensidade) imunohistoquímica do anti corpo COX-2 em mama normal de gata.

Caso nº	Epitélio luminal	
	Percentagem	Intensidade
1	25–50 %	+/-
2	51–75%	+/-
3	51–75%	+/- a +

4.3.2 Alterações Hiperplásicas/Displásicas

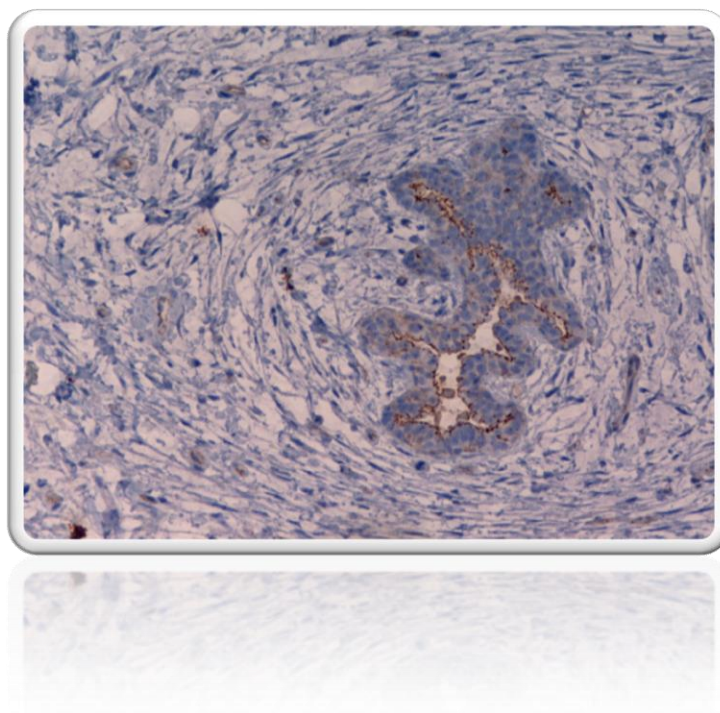


Fig. 7 Alteração Fibroadenomatosa com marcação em células epiteliais luminiais. Forte marcação da zona apical. 200x

Em lesões de carácter hiperplásico e displásico foram analisadas duas patologias. Nas Alterações Fibroadenomas foram avaliados com marcação de mais de 75% da população celular do epitélio luminal, em áreas apicais das células, 6 casos com intensidades diferentes (2 casos com intensidade fraca, 3 de fraca a moderada e apenas 1 com intensidade moderada). Neste grupo histológico observou-se uma lesão com 51 a 75% do epitélio luminal marcado de intensidade moderada, enquanto os restantes casos (n=2) apresentaram uma população celular de 25 a 50% das células marcadas, mas com fraca intensidade.

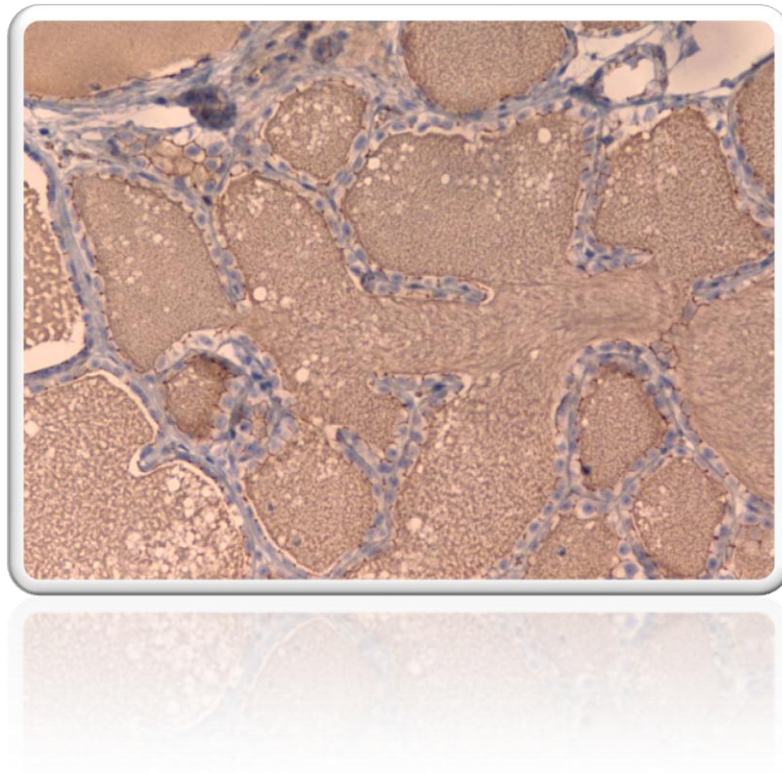


Fig. 8 Doença Fibroquística com marcação moderada e descontínua em todo o epitélio luminal e secreção. 200x

Na doença fibroquística verificou-se uma predominância na percentagem de população marcada entre 51 a 75% das células epiteliais tendo variado a intensidade entre fraca (n=1), fraca a moderada (n=2) e moderada (n=2). Houve casos (n=4) nesta patologia em que se observou a marcação na quase totalidade da população celular (>75%), em que cada caso apresentava diferentes intensidades que variavam de fraca a forte. Apenas foi analisada uma amostra com 25 a 50% da população do epitélio luminal marcado e com fraca intensidade.

Tabela 11 - Classificação da expressão (percentagem e intensidade) imunohistoquímica do anti corpo COX-2 em Alterações Fibroadenomas (AF) e Doença Fibroquística (DFQ).

Caso nº	Diagnóstico	Epitélio luminal	
		Percentagem	Intensidade
4	AF	>75%	+/- a +
5	AF	>75%	+/-
6	AF	>75%	+/-
7	AF	25-50 %	+/-
8	AF	>75%	+/- a +
9	AF	>75%	+/- a +
10	AF	>75%	+
11	AF	25-50 %	+/-
12	AF	51-75%	+
13	DFQ	51-75%	+
14	DFQ	25-50 %	+/-
15	DFQ	51-75%	+/-
16	DFQ	>75%	+
17	DFQ	51-75%	+/- a +
18	DFQ	>75%	+/-
19	DFQ	>75%	+/- a +
20	DFQ	51-75%	+/- a +
21	DFQ	51-75%	+
22	DFQ	>75%	+ a ++

4.3.3 Neoplasias benignas

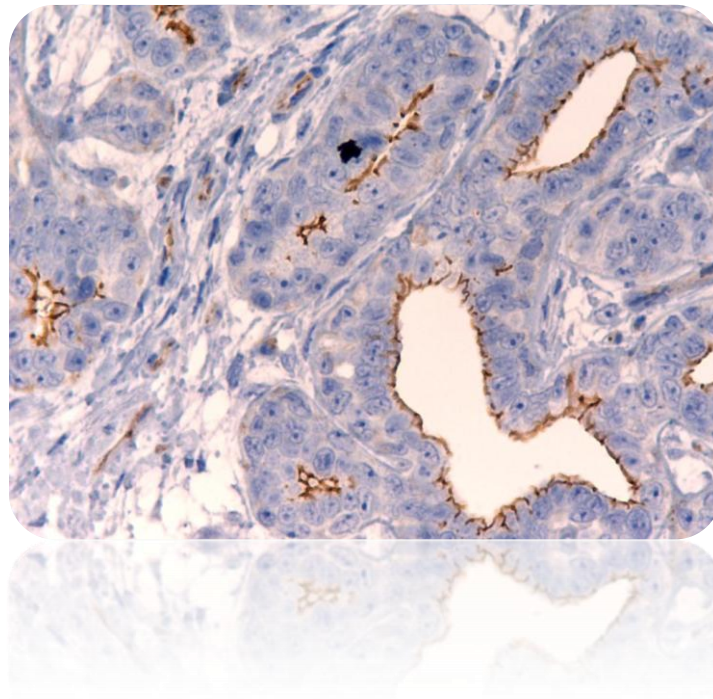


Fig. 9 Fibroadenoma papilar com marcação apical para a COX-2 no epitélio luminal em áreas tubuloalveolares. 400x

Em neoplasias benignas, apesar da escassez de casos, foi possível observar vários tipos histológicos e caracterizar desta forma a expressão da COX-2 em que se pôde evidenciar um Tumor Misto Benigno com uma marcação citoplasmática pontilhada em todo o citoplasma das células mesenquimatosas, com uma percentagem de 25 a 50% da população epitelial luminal, com fraca intensidade. Um Adenoma Complexo foi observado igualmente com marcação citoplasmática nas células do mesênquima, com uma percentagem inferior a 25% na população celular luminal e com fraca intensidade. No Fibroadenoma papilar observou-se marcação em dois dos três casos nas células pertencentes à componente mesenquimatoso, sendo que nos Fibroadenomas papilares 2 casos revelam 51 a 75% das células do epitélio luminal marcadas, ambas com intensidade moderada, enquanto no terceiro caso existe uma quase total marcação deste mesmo epitélio e com intensidade forte. Por último, nas neoplasias benignas os Adenomas simples apresentam 2 casos (n=4) com população celular luminal marcada acima de 75%, um com intensidade moderada e outro forte; os restantes dois casos diminuiram (51 a 75%) a nível da marcação do epitélio luminal, tal como na sua intensidade (ambos com intensidades de marcação fraca a moderada).

Tabela 12 - Classificação da expressão (percentagem e intensidade) imunohistoquímica do anti corpo COX-2 em neoplasias benignas.

Caso n°	Diagnóstico	Epitélio Luminal	
		Percentagem	Intensidade
23	TMB	25–50 %	+/-
24	ADC	<25%	+/-
25	FAP	51–75%	+
26	FAP	51–75%	+
27	FAP	>75%	++
28	ADS	>75%	+
29	ADS	51–75%	+/- a +
30	ADS	51–75%	+/- a +
31	ADS	>75%	++

tmb → Tumor misto benigno ; adc → Adenoma complexo ;
 fap → fibroadenoma; ads → Adenoma simples

4.3.4 Neoplasias Malignas

Tabela 13 - Classificação da expressão (percentagem e intensidade) imunohistoquímica do anticorpo COX-2 em carcinomas tubulo papilares.

Caso n°	Epitélio Luminal	
	Percentagem	Intensidade
32	>75%	+/-
33	>75%	+ a ++
34	>75%	+
35	>75%	+ a ++
36	0	0
37	>75%	+ a ++
38	>75%	+
39	25%-50%	+/-
40	>75%	+/-
41	51%-75%	+/-
42	>75%	+ a ++
43	51%-75%	+/-
44	>75%	+ a ++
45	>75%	+/- a +
46	>75%	+ a ++
47	>75%	+ a ++
48	51%-75%	+ a ++
49	>75%	+
50	>75%	+ a ++

Em 34 dos carcinomas dum total de 45, com tipos histológicos diferentes (Carcinoma tubulopapilar (n=14), Carcinoma sólido (n=13) e Carcinoma cribriforme (n=7)) apresentavam mais de 75% da população celular luminal marcada de forma intermitente na membrana celular e por vezes com marcação no interior do citoplasma. Neste grupo a intensidade no Carcinoma tubulopapilar apresentou-se fraca (n=2), fraca a moderada (n=1), moderada a forte (n=3) e forte (n=8); nos Carcinomas Sólidos a intensidade

variou de moderada (n=6), moderada a forte (n=6) e forte (n=1). No Carcinoma cribriforme a intensidade foi de fraca a moderada (n=2), moderada (n=3) e moderada a forte (n=2). Em todos os outros casos apresentavam uma proporção da população celular luminal marcada de 51 a 75% (n=9) com intensidade de fraca em dois casos de carcinoma tubulo papilar e outros dois no carcinoma cribriforme, fraca a moderada e um caso de carcinoma sólido e dois com esta intensidade no carcinoma cribriforme e de moderada a forte em apenas um caso de carcinoma tubulopapilar e num outro caso de carcinoma sólido.

Tabela 14 - Classificação da expressão (percentagem e intensidade) imunohistoquímica do anti corpo COX-2 em Carcinomas Sólidos.

Caso n°	Epitélio Luminal	
	Percentagem	Intensidade
51	>75%	+ a ++
52	>75%	+
53	>75%	++
54	>75%	+
55	>75%	+ a ++
56	>75%	+ a ++
57	>75%	+
58	>75%	+
59	>75%	+
60	>75%	+ a ++
61	>75%	+ a ++
62	51–75 %	+/- a +
63	>75%	+
64	51–75 %	+ a ++
65	>75%	+ a ++

Pôde-se registar nos carcinomas sólidos a existência de marcação citoplasmática adjacente a zonas de necrose. Nos carcinomas tubulopapilares verificou-se uma marcação em todo o epitélio luminal de forma apical nas células por ele constituídas.

Tabela 15 - Classificação da expressão (percentagem e intensidade) imunohistoquímica do anti corpo COX-2 em carcinomas cribriformes.

Caso n°	Epitélio Luminal	
	Percentagem	Intensidade
66	25–50 %	+/-
67	>75%	+
68	51–75%	+/-
69	>75%	+ a ++
70	>75%	+ a ++
71	>75%	+/- a +

72	51-75%	+/-
73	51-75%	+/- a +
74	51-75%	+/- a +
75	>75%	+
76	>75%	+/- a +
77	>75%	+

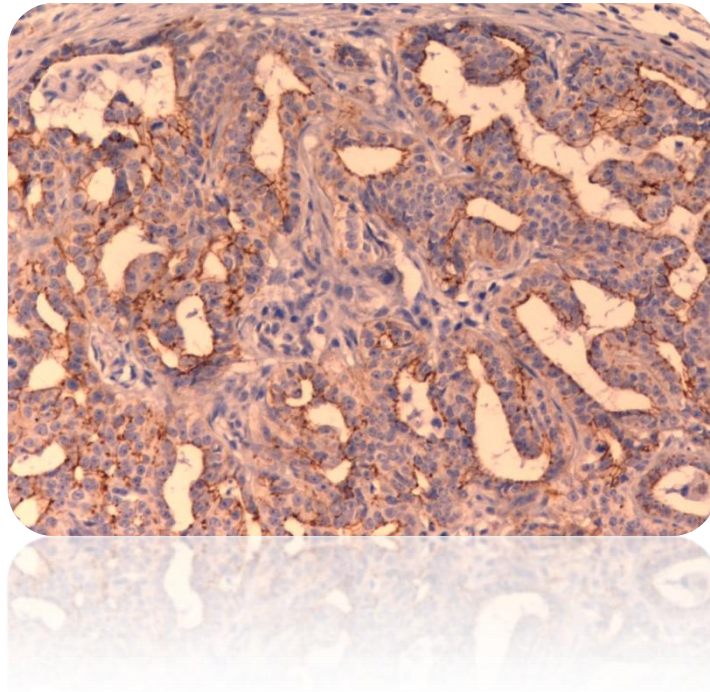


Fig. 10 Carcinoma tubulopapilar com células com pleomorfismo celular e denotada marcação da COX-2 no epitélio luminal alveolar. 200x

4.3.4.1. Metástases Ganglionares

Em todas as metástases ganglionares observadas, com origem em Carcinomas Tubulopapilares foi possível analisar que apenas um gânglio metastizado diminuiu a marcação do epitélio luminal invasivo (51 a 75%) comparativamente com a lesão primária (>75%), tendo desta forma diminuído a intensidade de marcação do anticorpo COX-2 (na lesão primária de moderado a forte e gânglio de fraca a moderada). Nos restantes casos de Carcinoma Tubulopapilar mantiveram-se as mesmas percentagens de células marcadas do epitélio luminal (3 casos com percentagem de >75% e um caso apenas de 51 a 75%). Contudo, a intensidade diminuiu em 3 dos gânglios em relação à lesão primária, todos eles de moderada a forte para moderada, enquanto no último caso

aumentou a intensidade da marcação de fraca para fraca a moderada.

4.4 Discussão

No estudo realizado por Millanta *et al*, demonstrou que em 81% dos casos observados se verificou uma variação da intensidade de marcação de moderado a forte da enzima COX-2. No estudo agora efectuado, foram encontrados valores de 42.2% de com intensidade compreendida entre moderada e forte da expressão da COX-2. Comparativamente ao estudo de Sayasith *et al* 2009 em que os resultados se assemelham, divergindo nos valores do estudo de Millanta *et al*. A diferença nos valores encontrados reside eventualmente nos diferentes tipos de classificação e clones dos anticorpos utilizados.

Na análise estatística das neoplasias, pôde-se verificar que em tumores benignos e malignos estes apresentam diferenças significativas na percentagem de população de células neoplásicas marcadas pela COX-2 ($P = .004$).

Entre grupos de hiperplasias/displasias e neoplasias benignas não houve diferenças significativas ($P > .05$). Poderá ter como fundamento serem lesões de mama com características morfológicas e funcionais semelhantes (CLARKE *et al.*, 2005).

No grupo de neoplasias malignas foi realizada uma análise estatística para se estabelecer diferenças entre parâmetros, intensidade e percentagem de células marcadas, comparativamente com o grupo de hiperplasias/displasias, de que se evidencia a maior diferença na intensidade ($P = .002$) do anticorpo COX-2 entre estes dois grupos do que na percentagem de células marcadas ($P = .047$). A diferença entre estes dois grupos é o facto de existir uma maior quantidade da enzima COX-2 nas neoplasias malignas do que nas hiperplasias. Esta análise está em pé de igualdade com estudos realizados anteriormente em Mama de mulher, em que se identificou uma progressão da COX-2 desde a mama normal até às neoplasias malignas, tal como no carcinoma ductal invasivo (CHO *et al.*, 2006).

Por estatística foi analisado dentro dos grupos histológicos diferenças na marcação da enzima COX-2 tanto na percentagem de células marcadas e na intensidade, sendo que a associação com maior relevo destaca-se entre o carcinoma sólido e o carcinoma cribriforme que apresentam uma intensidade diferente, sendo que nos carcinomas sólidos se verificou uma maior intensidade. Pode dever-se ao facto do

carcinoma sólido ter um maior poder de malignidade, comparativamente ao do carcinoma cribriforme, daí uma maior concentração desta proteína no primeiro tipo neoplásico.

Com os restantes parâmetros analisados não houve qualquer valor estatisticamente significativo.

5. Conclusões

Com este trabalho pode-se verificar uma evolução de 3 proteínas em vários tipos histológicos.

Na E-Cad observou-se que consoante o tipo histológico, desde a mama normal até às neoplasias malignas, a perda de expressão desta proteína associa-se a um pior prognóstico, no que respeita ao tempo de sobrevivência da gata. Apesar do carcinoma tubulopapilar pertencer ao grupo das neoplasias malignas, observou-se neste estudo uma conservação desta proteína devido a necessidade deste carcinoma se organizar em estruturas tubulosas e papilares conferindo assim uma conservação da E-Cad. Registou-se ainda uma marcação citoplasmática em neoplasias benignas e malignas, o que demonstra que esta internalização da E-Cad no citoplasma pode ter alguma influência no desenvolvimento do carcinoma mamário de gata, visto que a perda desta proteína pode levar a um aumento da migração celular, conseqüentemente à metastização.

Nas comparações efectuadas estatisticamente verificou-se que quanto menor era a expressão da E-Cad maior a intensidade e marcação da Cox-2 e do índice proliferativo, representado pela análise do Ki-67 ($P=0.023$), revelando ser um mau prognóstico.

Com a análise do índice proliferativo através do Ki-67 observou-se que quanto maior a agressividade tumoral, maior o número de células marcadas no epitélio luminal. Em destaque, verifica-se que o carcinoma sólido tem maior índice proliferativo comparativamente a todas as lesões mamárias, descritas neste trabalho, podendo desta forma o Ki-67 demonstrar alguma diferença no ciclo celular, da qual poderá estar relacionado com a progressão e evolução deste tipo de carcinomas.

Na análise estatística em que se comparou tanto a intensidade como a percentagem da população celular marcada pela Cox-2, com o índice proliferativo, observou-se que quando há aumento de um dos parâmetros o outro aumentava proporcionalmente, indicando assim que a proteína Cox-2 num tecido mamário pode ser um dos elementos responsáveis pela carcinogénese mamária de gatas.

6. Referências Bibliográficas

ANGST, B. D.; MARCOZZI, C.; MAGEE, A. I. - The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci.* 114: 629-41, 2001.

BACHA, W. J.; BACHA, L. M. - *Color Atlas of Veterinary Histology*. In: ED., N. - Philadelphia: Lippincott William & Wilkins, 2000. p. pp 86-7, 102-5.

BANKS, W. - *Applied Veterinary Histology*, 3rd ed. In: 1993.

BARONE, R. - *Anatomie Comparée des Mammifères Domestiques*. In: 1978. p. 215-24.

BERESFORD, M. J.; WILSON, G. D.; MAKRIS, A. - Measuring proliferation in breast cancer: practicalities and applications. *Breast Cancer Res.* 8: 216, 2006.

BEVIER, D. - Integumentary system In: *Atlas of Feline Anatomy for Veterinarians*. In Hudson LC, Hamilton WP: Philadelphia: WB Saunders Company, 1993. p. 19 - 21.

BLOOM, F. - Pathology of the dog and cat: the genitourinary system with clinical considerations. In: PUBL., A. V. - Illinois: 1954.

BOUSSADIA, O.; KUTSCH, S.; HIERHOLZER, A.; DELMAS, V.; KEMLER, R. - E-cadherin is a survival factor for the lactating mouse mammary gland. *Mech Dev.* 115: 53-62, 2002.

BREMM, A.; WALCH, A.; FUCHS, M.; MAGES, J.; DUYSER, J.; KELLER, G.; HERMANNSTADTER, C.; BECKER, K. F.; RAUSER, S.; LANGER, R.; VON WEYHERN, C. H.; HOFER, H.; LUBER, B. - Enhanced activation of epidermal growth factor receptor caused by tumor-derived E-cadherin mutations. *Cancer Res.* 68: 707-14, 2008.

BRUEGGEMEIER, R. W.; QUINN, A. L.; PARRETT, M. L.; JOARDER, F. S.; HARRIS, R. E.; ROBERTSON, F. M. - Correlation of aromatase and cyclooxygenase gene expression in human breast cancer specimens. *Cancer Lett.* 140: 27-35, 1999.

BRUNETTI, B.; SARLI, G.; PREZIOSI, R.; MONARI, I.; BENAZZI, C. - E-cadherin and beta-catenin reduction influence invasion but not proliferation and survival in canine malignant mammary tumors. *Vet Pathol.* 42: 781-7, 2005.

CASTAGNARO, M.; CASALONE, C.; BOZZETTA, E.; DE MARIA, R.; BIOLATTI, B.; CARAMELLI, M. - Tumour grading and the one-year post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *J Comp Pathol.* 119: 263-75, 1998b.

CASTAGNARO, M.; DE MARIA, R.; BOZZETTA, E.; RU, G.; CASALONE, C.; BIOLATTI, B.; CARAMELLI, M. - Ki-67 index as indicator of the post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Res Vet Sci.* 65: 223-6, 1998c.

CHO, M. H.; YOON, J. H.; JAEGAL, Y. J.; CHOI, Y. D.; LEE, J. S.; LEE, J. H.; NAM, J. H.; CHOI, C.; LEE, M. C.; PARK, C. S.; WOO JUHNG, S.; MIN, K. W. -

Expression of cyclooxygenase-2 in breast carcinogenesis and its relation to HER-2/neu and p53 protein expression in invasive ductal carcinoma. *Breast*. 15: 390-8, 2006.

CHU, A. J.; CHOU, T. H.; CHEN, B. D. - Prevention of colorectal cancer using COX-2 inhibitors: basic science and clinical applications. *Front Biosci*. 9: 2697-713, 2004.

CLARKE, R. B.; BUNDRED, N. J. - Do early premalignant changes in normal breast epithelial cells predict cancer development? *Breast Cancer Res*. 7: 18-20, 2005.

COWIN, P.; ROWLANDS, T. M.; HATSELL, S. J. - Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 17: 499-508, 2005.

DANNHARDT, G.; KIEFER, W. - Cyclooxygenase inhibitors--current status and future prospects. *Eur J Med Chem*. 36: 109-26, 2001.

DAVIES, G. L. - Cyclooxygenase-2 and chemoprevention of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 86: 495-9, 2003.

DE LAS MULAS, J. M.; VAN NIEL, M.; MILLAN, Y.; BLANKENSTEIN, M. A.; VAN MIL, F.; MISDORP, W. - Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in feline mammary gland benign and malignant lesions: comparison with biochemical assay. *Domest Anim Endocrinol*. 18: 111-25, 2000.

DE MATOS, A. J.; LOPES, C. C.; FAUSTINO, A. M.; CARVALHEIRA, J. G.; DOS SANTOS, M. S.; RUTTEMAN, G. R.; GARTNER MDE, F. - MIB-1 labelling indices according to clinico-pathological variables in canine mammary tumours: a multivariate study. *Anticancer Res*. 26: 1821-6, 2006.

DEMPKE, W.; RIE, C.; GROTHEY, A.; SCHMOLL, H. J. - Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol*. 127: 411-7, 2001.

DENKERT, C.; WINZER, K. J.; MULLER, B. M.; WEICHERT, W.; PEST, S.; KOBEL, M.; KRISTIANSEN, G.; RELES, A.; SIEGERT, A.; GUSKI, H.; HAUPTMANN, S. - Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma. *Cancer*. 97: 2978-87, 2003.

DIAS PEREIRA, P.; GARTNER, F. - Expression of E-cadherin in normal, hyperplastic and neoplastic feline mammary tissue. *Vet Rec*. 153: 297-302, 2003.

DIAS PEREIRA, P.; LOPES, C. C.; MATOS, A. J.; SANTOS, M.; GARTNER, F.; MEDEIROS, R.; LOPES, C. - COX-2 expression in canine normal and neoplastic mammary gland. *J Comp Pathol*. 140: 247-53, 2009.

DORE, M.; LANTHIER, I.; SIROIS, J. - Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Vet Pathol*. 40: 207-12, 2003.

DORN, C. R.; TAYLOR, D. O.; FRYE, F. L.; HIBBARD, H. H. - Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. I. Methodology and description of cases. *J Natl Cancer Inst*. 40: 295-305, 1968.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. - Tratado de Anatomia Veterinária 2ª ed. In: 1997. p. 289-91.

DYCE KM, S. W., WENSING CJG - Tratado de Anatomia Veterinária 2ª ed. 289-91, 1997.

ELANGBAM, C. S.; QUALLS, C. W., JR.; DAHLGREN, R. R. - Cell adhesion molecules--update. *Vet Pathol.* 34: 61-73, 1997.

ESTEVA, F. J.; HORTOBAGYI, G. N. - Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res.* 6: 109-18, 2004.

GERALDES, M.; GARTNER, F.; SCHMITT, F. - Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. *Vet Rec.* 146: 403-6, 2000.

GILLET, C. E.; MILES, D. W.; RYDER, K.; SKILTON, D.; LIEBMAN, R. D.; SPRINGALL, R. J.; BARNES, D. M.; HANBY, A. M. - Retention of the expression of E-cadherin and catenins is associated with shorter survival in grade III ductal carcinoma of the breast. *J Pathol.* 193: 433-41, 2001.

GUMBINER, B. M. - Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell.* 84: 345-57, 1996.

HALF, E.; TANG, X. M.; GWYN, K.; SAHIN, A.; WATHEN, K.; SINICROPE, F. A. - Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res.* 62: 1676-81, 2002.

HAMILTON, J. M. - Comparative aspects of mammary tumors. *Adv Cancer Res.* 19: 1-45, 1974.

HAMILTON, J. M.; ELSE, R. W.; FORSHAW, P. - Oestrogen receptors in feline mammary carcinomas. *Vet Rec.* 99: 477-9, 1976.

HATSELL, S.; ROWLANDS, T.; HIREMATH, M.; COWIN, P. - Beta-catenin and Tcfs in mammary development and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 8: 145-58, 2003.

HAYES, H. M., JR.; MILNE, K. L.; MANDELL, C. P. - Epidemiological features of feline mammary carcinoma. *Vet Rec.* 108: 476-9, 1981.

JENSEN, V.; JENSEN, M. L.; KIAER, H.; ANDERSEN, J.; MELSEN, F. - MIB-1 expression in breast carcinomas with medullary features. An immunohistological study including correlations with p53 and bcl-2. *Virchows Arch.* 431: 125-30, 1997.

KNUDSEN, K. A.; WHEELLOCK, M. J. - Cadherins and the mammary gland. *J Cell Biochem.* 95: 488-96, 2005.

KUNZ, J.; SCHMIDT, A. - [Ki 67 growth fraction in carcinomas and benign lesions of

the breast]. *Zentralbl Pathol.* 139: 201-5, 1993.

MACEWEN, E. G. - Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer Metastasis Rev.* 9: 125-36, 1990.

MACEWEN, E. G.; HAYES, A. A.; HARVEY, H. J.; PATNAIK, A. K.; MOONEY, S.; PASSE, S. - Prognostic factors for feline mammary tumors. *J Am Vet Med Assoc.* 185: 201-4, 1984.

MACVEAN, D. W.; MONLUX, A. W.; ANDERSON, P. S., JR.; SILBERG, S. L.; ROSZEL, J. F. - Frequency of canine and feline tumors in a defined population. *Vet Pathol.* 15: 700-15, 1978.

MATOS, A. J.; LOPES, C.; CARVALHEIRA, J.; SANTOS, M.; RUTTEMAN, G. R.; GARTNER, F. - E-cadherin expression in canine malignant mammary tumours: relationship to other clinico-pathological variables. *J Comp Pathol.* 134: 182-9, 2006.

MCGUIRE, W. L.; OSBORNE, C. K.; CLARK, G. M.; KNIGHT, W. A., 3RD - Steroid hormone receptors and carcinoma of the breast. *Am J Physiol.* 243: E99-102, 1982.

MILLANTA, F.; LAZZERI, G.; MAZZEI, M.; VANNOZZI, I.; POLI, A. - MIB-1 labeling index in feline dysplastic and neoplastic mammary lesions and its relationship with postsurgical prognosis. *Vet Pathol.* 39: 120-6, 2002.

MIRECKA, J.; KORABIOWSKA, M.; SCHAUER, A. - Correlation between the occurrence of Ki-67 antigen and clinical parameters in human breast carcinoma. *Folia Histochem Cytobiol.* 31: 83-6, 1993.

MISDORP, W. - Progestagens and mammary tumours in dogs and cats. *Acta Endocrinol (Copenh).* 125 Suppl 1: 27-31, 1991.

MISDORP, W. - Tumors of the Mammary Gland. In: ED., D. J. M. T. - Tumors in domestic animals. Ames, Iowa: Iowa State University Press, c2002, 2002. p. pp. 575-78.

MISDORP, W.; WEIJER, K. - Animal model of human disease: breast cancer. *Am J Pathol.* 98: 573-6, 1980.

MISDORP, W.; ROMIJN, A.; HART, A. A. - Feline mammary tumors: a case-control study of hormonal factors. *Anticancer Res.* 11: 1793-7, 1991.

MISDORP, W.; ROMIJN, A.; HART, A. A. - [The significance of ovariectomy and progestagens in the development of mammary carcinoma in cats]. *Tijdschr Diergeneeskd.* 117: 2-4, 1992.

MISDORP, W.; ELSE R.W.; HELLMEN E.; LIPSCOMB T.P. - *Histological classification of mammary tumours of the dog and the cat* In: ED., N. - Washington Armed Forces Institute, 1999. p. pp 11-55.

MOHAMMED, S. I.; KHAN, K. N.; SELLERS, R. S.; HAYEK, M. G.; DENICOLA,

D. B.; WU, L.; BONNEY, P. L.; KNAPP, D. W. - Expression of cyclooxygenase-1 and 2 in naturally-occurring canine cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 70: 479-83, 2004.

MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; STINSON, A. W. - Integument. In: In Dellman HD: 1993. p. 304-07.

MOULTON, J. E. - tumors of the mammary gland. In: IN MOULTON JE, E. - *Tumors in domestic animals* Berkeley: University of California Press, 1990. p. pp 547-48.

NELSON, L. W.; KELLY, W. A. - Changes in canine mammary gland histology during the estrous cycle. *Toxicol Appl Pharmacol*. 27: 113-22, 1974.

ONDER, T. T.; GUPTA, P. B.; MANI, S. A.; YANG, J.; LANDER, E. S.; WEINBERG, R. A. - Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res*. 68: 3645-54, 2008.

OSTROWSKI, M. L.; CHAKRABORTY, S.; LAUCIRICA, R.; BROWN, R. W.; GREENBERG, S. D. - Quantitative image analysis of MIB-1 immunoreactivity. A comparison with flow cytometric assessment of proliferative activity in invasive carcinoma of the breast. *Anal Quant Cytol Histol*. 17: 15-24, 1995.

PENA, L. L.; NIETO, A. I.; PEREZ-ALENZA, D.; CUESTA, P.; CASTANO, M. - Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *J Vet Diagn Invest*. 10: 237-46, 1998.

PEREZ ALENZA, M. D.; PENNA, L.; DEL CASTILLO, N.; NIETO, A. I. - Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J Small Anim Pract*. 41: 287-91, 2000.

PETTITT, J. - The cadherin superfamily. *WormBook*. 1-9, 2005.

POTTER, E.; BERGWITZ, C.; BRABANT, G. - The cadherin-catenin system: implications for growth and differentiation of endocrine tissues. *Endocr Rev*. 20: 207-39, 1999.

QUEIROGA, F. L.; ALVES, A.; PIRES, I.; LOPES, C. - Expression of Cox-1 and Cox-2 in canine mammary tumours. *J Comp Pathol*. 136: 177-85, 2007.

RESTUCCI, B.; PAPPARELLA, S.; DE VICO, G.; MAIOLINO, P. - E cadherin expression in normal and neoplastic canine mammary gland. *J Comp Pathol*. 116: 191-202, 1997.

RISTIMAKI, A.; SIVULA, A.; LUNDIN, J.; LUNDIN, M.; SALMINEN, T.; HAGLUND, C.; JOENSUU, H.; ISOLA, J. - Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res*. 62: 632-5, 2002.

ROWLANDS, T. M.; SYMONDS, J. M.; FAROOKHI, R.; BLASCHUK, O. W. - Cadherins: crucial regulators of structure and function in reproductive tissues. *Rev Reprod*. 5: 53-61, 2000.

- RUSSO, J.; RUSSO, I. - The mammary gland development, regulation and function. *New York Plenum Publishing*. Development of the Human Mammary Gland: 67-93, 1987.
- RUTTEMAN, G. R.; MISDORP, W. - Hormonal background of canine and feline mammary tumours. *J Reprod Fertil Suppl*. 47: 483-7, 1993.
- RUTTEMAN, G. R.; KIRPENSTEIJN, J. - Tumours of the mammary glands: BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology. 2nd ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association, 2003.
- RUTTEMAN, G. R.; BLANKENSTEIN, M. A.; MINKE, J.; MISDORP, W. - Steroid receptors in mammary tumours of the cat. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 125 Suppl 1: 32-7, 1991.
- SARRIO, D.; PALACIOS, J.; HERGUETA-REDONDO, M.; GOMEZ-LOPEZ, G.; CANO, A.; MORENO-BUENO, G. - Functional characterization of E- and P-cadherin in invasive breast cancer cells. *BMC Cancer*. 9: 74, 2009.
- SAYASITH, K.; SIROIS, J.; DORE, M. - Molecular characterization of feline COX-2 and expression in feline mammary carcinomas. *Vet Pathol*. 46: 423-9, 2009.
- SCHOLZEN, T.; GERDES, J. - The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 182: 311-22, 2000.
- SOLER, A. P.; RUSSO, J.; RUSSO, I. H.; KNUDSEN, K. A. - Soluble fragment of P-cadherin adhesion protein found in human milk. *J Cell Biochem*. 85: 180-4, 2002.
- SORENMO, K. U.; SHOFER, F. S.; GOLDSCHMIDT, M. H. - Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *J Vet Intern Med*. 14: 266-70, 2000.
- STEFANSSON, O. A.; JONASSON, J. G.; JOHANNSSON, O. T.; OLAFSDOTTIR, K.; STEINARSDOTTIR, M.; VALGEIRSDOTTIR, S.; EYFJORD, J. E. - Genomic profiling of breast tumours in relation to BRCA abnormalities and phenotypes. *Breast Cancer Res*. 11: R47, 2009.
- STUMPP, J.; DIETL, J.; SIMON, W.; GEPPERT, M. - Growth fraction in breast carcinoma determined by Ki-67 immunostaining: correlation with pathological and clinical variables. *Gynecol Obstet Invest*. 33: 47-50, 1992.
- TAKAUJI, S. R.; WATANABE, M.; UYAMA, R.; NAKAGAWA, T.; MIYAJIMA, N.; MOCHIZUKI, M.; NISHIMURA, R.; SUGANO, S.; SASAKI, N. - Expression and subcellular localization of E-cadherin, alpha-catenin, and beta-catenin in 8 feline mammary tumor cell lines. *J Vet Med Sci*. 69: 831-4, 2007.
- TAN, D. S.; POTTS, H. W.; LEONG, A. C.; GILLET, C. E.; SKILTON, D.; HARRIS, W. H.; LIEBMANN, R. D.; HANBY, A. M. - The biological and prognostic significance of cell polarity and E-cadherin in grade I infiltrating ductal carcinoma of

the breast. *J Pathol.* 189: 20-7, 1999.

TOYOSHIMA, H.; HUNTER, T. - p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell.* 78: 67-74, 1994.

VAN AKEN, E.; DE WEVER, O.; CORREIA DA ROCHA, A. S.; MAREEL, M. - Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. *Virchows Arch.* 439: 725-51, 2001.

VAN DIEST, P. J.; VAN DER WALL, E.; BAAK, J. P. - Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review. *J Clin Pathol.* 57: 675-81, 2004.

VERONESE, S. M.; GAMBACORTA, M.; GOTTARDI, O.; SCANZI, F.; FERRARI, M.; LAMPERTICO, P. - Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. *Cancer.* 71: 3926-31, 1993.

WANG, D.; DUBOIS, R. N. - Prostaglandins and cancer. *Gut.* 55: 115-22, 2006.

WEIJER, K. - Feline mammary tumours and dysplasias. Conclusions based on personal studies and some suggestions for future research. *Tijdschr Diergeneeskd.* 105: suppl 2:69-74, 1980.

WEIJER, K.; HART, A. A. - Prognostic factors in feline mammary carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 70: 709-16, 1983.

WEIJER, K.; HEAD, K. W.; MISDORP, W.; HAMPE, J. F. - Feline malignant mammary tumors. I. Morphology and biology: some comparisons with human and canine mammary carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 49: 1697-704, 1972.

WILCOCK, B. P. - The skin and appendages. In: IN JUBB KVF, K. P., PALMER C, EDS. - *Pathology of Domestic Animals* Vol 1. 4th ed. San Diego: Academic Press: 1993. p. pp 733-37.

WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. - Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology. St. Louis, Mo.: Saunders Elsevier, 2007. ISBN 9780721605586 0721605583.

YOSHIDA, R.; KIMURA, N.; HARADA, Y.; OHUCHI, N. - The loss of E-cadherin, alpha- and beta-catenin expression is associated with metastasis and poor prognosis in invasive breast cancer. *Int J Oncol.* 18: 513-20, 2001.

YOUNG, B.; HEATH, J. W. - Weather's Functional Histology: a text and colour atlas. In: KOOGAN, G. - Edinburgh: Churchill Livingstone: 2000. p. 27-31, 368-71.

ZAGOURI, F.; SERGENTANIS, T. N.; ZOGRAFOS, G. C. - Precursors and preinvasive lesions of the breast: the role of molecular prognostic markers in the diagnostic and therapeutic dilemma. *World J Surg Oncol.* 5: 57, 2007.