

CHRISTINE HAUER PIEKARZ

**EXPRESSÃO DA E-CADERINA NO PROGNÓSTICO
DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS**

CURITIBA
2007

CHRISTINE HAUER PIEKARZ

**EXPRESSÃO DA E-CADERINA NO PROGNÓSTICO
DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Alexander Welker Biondo

CURITIBA
2007

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “**EXPRESSÃO DA E-CADERINA NO PROGNÓSTICO DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS**” apresentada pela Mestranda CHRISTINE HAUER PIEKARZ, declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03–CEPE/UFPR, que considerou a candidata aprovada para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Patologia Veterinária.

Curitiba, 26 de fevereiro de 2007.


Prof. Dr. Alexander Welker Biondo
Presidente/Orientador


Profa. Dra. Renée Laufer Amorim
Membro


Prof. Dr. Pedro Ribas Werner
Membro

A criação prossegue incessantemente por meio
do homem, mas o homem não cria, apenas
descobre.

(Antonio Gaudi)

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre me incentivaram,
apoiaram e aconselharam cada passo e decisão que tive que
tomar na minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre ao meu lado me protegendo e guiando pelo caminho certo.

Ao meu querido namorado Ivan, pela pessoa maravilhosa que é e por todo apoio, carinho, paciência e incentivo dedicado em cada passo e decisão que precisei tomar.

Ao Professor Alexander Welker Biondo, por ter aceitado esta orientação e por toda paciência, orientação e compreensão dedicada.

À Professora Renée Laufer Amorim, por todo incentivo, paciência e por ter aberto as portas da UNESP-campus Botucatu tornando possível a realização deste projeto.

À Professora Suely Rodaski pela amizade, paciência e ensinamento dedicado ao longo da minha vida acadêmica.

Ao Professor Pedro R. Werner que aceitou tão prontamente ao convite para a participação da avaliação desse estudo.

Ao Professor Felipe Wouk por toda ajuda, conselhos e ensinamentos que proporcionou durante a minha vida acadêmica.

À Professora Juliana Werner pela paciência e cooperação que foi fundamental ao desenvolvimento deste projeto.

À Professora Tilde R. Froes Paiva que tanto cooperou para realização do projeto com seu reconhecível conhecimento em diagnóstico por imagem.

Ao Professor Antônio Waldir da Silva por ter cooperado com o desenvolvimento deste projeto.

Ao amigo Andrigo por ter proporcionado a oportunidade de realização deste projeto e por toda ajuda e paciência dedicada.

Ao funcionário do serviço de Patologia do HV-UFPR Olair pela cooperação para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Professor Rogério Lange, diretor do HV-UFPR, e a todos os professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária da UFPR que estiveram presentes e participaram do meu desenvolvimento durante estes anos.

A todos os professores e pós-graduandos da UNESP-Botucatu pela excelente recepção e por terem tornado possível a realização deste projeto, principalmente ao pós-graduando Pedro Pinczowski que tanto colaborou para o desenvolvimento do experimento.

Aos meus pais, Roque e Ingrid, pela confiança e incentivo ao longo de todos esses anos.

Ao meu irmão Andreas pela enorme paciência cooperando com o desenvolvimento de todo este trabalho.

Ao meu irmão Ronie por toda ajuda e apoio dedicado.

Aos meus avós Lory, Acyr e Cleomar pelas pessoas maravilhosas que são e por todo apoio e credibilidade que depositam em mim.

A todas as pessoas, amigos, colegas, que estiveram presentes durante esta fase sempre estimulando, apoiando e cooperando com o meu desenvolvimento.

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| LISTA DE ABREVIATURAS | VI |
| LISTA DE FIGURAS..... | VII |
| LISTA DE TABELAS | IX |
| SINÓPSE..... | XI |
| ABSTRACT | XIII |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1 A GLÂNDULA MAMÁRIA NAS CADELAS | 3 |
| 2.2 NEOPLASIAS MAMÁRIAS | 4 |
| 2.2.1 Neoplasias mamárias em cadelas | 7 |
| 2.3 CADERINAS | 12 |
| 2.3.1 Fisiopatologia das Caderinas..... | 13 |
| 2.3.2 O Complexo E-caderina-Cateninas | 16 |
| 2.3.3 E-caderina como Indicadora de Prognóstico..... | 18 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 23 |
| 3.1 SELEÇÃO DOS CASOS..... | 23 |
| 3.2 IMUNOISTOQUÍMICA | 26 |
| 3.3 LEITURA DA EXPRESSÃO DA E-CADERINA | 26 |
| 4 RESULTADOS..... | 33 |
| 4.1 DADOS DE FREQUÊNCIA DE ACORDO COM OS GRUPOS HISTOPATOLÓGICOS..... | 33 |
| 4.1.1 Adenoma..... | 34 |
| 4.1.2 Carcinomas com prognóstico bom | 35 |
| 4.1.3 Carcinomas com prognóstico ruim | 35 |
| 4.1.4 Carcinomas com metástase pulmonar e Carcinomas inflamatórios | 38 |
| 4.2 ESTADIAMENTO CLÍNICO | 38 |
| 4.3 IMUNOISTOQUÍMICA | 40 |
| 5 DISCUSSÃO | 52 |
| 6 CONCLUSÕES | 61 |
| 7 PERSPECTIVAS FUTURAS | 62 |
| 8 REFERÊNCIAS..... | 63 |
| 9 ANEXOS | 70 |
| 9.1 ANEXO 1..... | 70 |
| 9.2 ANEXO 2..... | 71 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | | |
|-----------|---|----------------------|
| ALT | Alaninaminotransferase | |
| Caderinas | E-Caderina: | Caderina epitelial |
| | N-Caderina: | Caderina neural |
| | P-Caderina: | Caderina placentária |
| CAM | Molécula de Adesão Celular | |
| DAB | Diaminobenzidina | |
| FMVZ | Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia | |
| HV | Hospital Veterinário | |
| NR | Não realizado | |
| OMS | Organização Mundial de Saúde | |
| SRD | Sem Raça Definida | |
| TNM | Tumor/ Linfonodo/ Metástase | |
| UFPR | Universidade Federal do Paraná | |
| UNESP | Universidade Estadual Paulista | |

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Representação esquemática da interação do complexo E-caderina-cateninas. A figura “A” representa a união de três células ligadas pela E-caderina. Em maior aumento, na figura “B” está esquematizado a importância das cateninas alfa, beta e p120 na ligação da E-caderina ao citoesqueleto de actina da célula para a formação de adesão intercelular.17
- FIGURA 2 – Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica para ilustrar o controle positivo da expressão da proteína. Observar a marcação para a atividade da E-caderina entre células epiteliais de um folículo piloso. Carcinoma mamário em cadela. Aumento: 400 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2006.....28
- FIGURA 3 – Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica. Observar a marcação de E-caderina entre as células epiteliais normais da epiderme. Controle positivo da expressão da E-caderina na lâmina de um carcinoma inflamatório mamário em cadela que não expressou a proteína. Aumento: 400 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2006.....28
- FIGURA 4 – Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de tecido mamário normal (++++) de cadela. Observar a marcação normal para a atividade da E-caderina entre células epiteliais da glândula mamária. Aumento: 400 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2006.29
- FIGURA 5 – Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um adenoma mamário em cadela. Observar a marcação normal (++++) para a atividade da E-caderina entre células epiteliais da glândula mamária de tecido neoplásico. Aumento: 400 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2006.29
- FIGURA 6 - Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um carcinoma mamário em cadela. Observar a marcação mediana (+++) para a atividade da E-caderina entre células epiteliais da glândula mamária de tecido neoplásico. Aumento: 200 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2006.30
- FIGURA 7 - Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de metástase pulmonar de um carcinoma mamário em cadela. Observar a marcação muito fraca (+) para a atividade da E-caderina entre células epiteliais do tecido neoplásico metastático. Aumento: 400 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2006.....30
- FIGURA 8 - Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um carcinoma inflamatório mamário em cadela. Observar marcação muito baixa (+) para a atividade da E-caderina entre células epiteliais da glândula mamária do tecido neoplásico. Aumento: 400 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2006.....31

- FIGURA 9 - Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de metástase pulmonar de um carcinoma mamário em cadela. Observar a ausência de marcação (-) para a atividade da E-caderina entre células epiteliais do tecido neoplásico metastático. Aumento: 400 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2006.....31
- FIGURA 10 – Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um carcinoma inflamatório mamário em cadela. Observar a ausência de marcação (-) para a atividade da E-caderina entre células epiteliais da glândula mamária do tecido neoplásico, mostrando apenas marcações inespecíficas (flecha). Aumento: 400 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2006.....32
- FIGURA 11 – Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um carcinoma inflamatório mamário em cadela com ausência de expressão da E-caderina. Observar o êmbolo neoplásico formado, indicado pela flecha. Aumento: 400 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2006.....32
- FIGURA 12 – Frequência de neoplasias mamárias, distribuídas conforme a raça, em cadelas atendidas junto ao Hospital Veterinário da UFPR, campus de Curitiba, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004.33
- FIGURA 15 – Grau de expressão da E-caderina, distribuída de acordo com os grupos estudados (Adenoma, Carcinoma com prognóstico bom, Carcinoma com prognóstico ruim, Carcinoma com metástase pulmonar – tecido mamário, Carcinoma com metástase pulmonar – tecido pulmonar, Carcinoma Inflamatório e Controle).42

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 – Grupos utilizados no presente estudo segundo a classificação histológica de acordo com MOULTON (1990) e as características clínicas da neoplasia mamária..... | 24 |
| TABELA 2 – Prevalência de neoplasias mamárias, distribuídas conforme a idade, em cadelas atendidas junto ao Hospital Veterinário da UFPR, campus de Curitiba, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004. | 34 |
| TABELA 3 – Informações relativas ao histórico (gestação, anticoncepcional, pseudociese e ovariosalpingoisterectomia) e dados clínicos das cadelas com neoplasia mamária atendidas no Hospital Veterinário da UFPR, campus de Curitiba, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004..... | 36 |
| TABELA 4 – Estágio clínico das cadelas portadoras de adenomas mamários seguindo o Sistema TNM (Tumor/ Linfonodo/ Metástase) proposto pela OMS (OWEN, 1980). | 39 |
| TABELA 5 – Estágio clínico das cadelas portadoras de carcinoma mamário com prognóstico bom seguindo o Sistema TNM (Tumor/ Linfonodo/ Metástase) proposto pela OMS (OWEN, 1980)..... | 39 |
| TABELA 6 – Estágio clínico das cadelas portadoras de carcinoma mamário com prognóstico ruim seguindo o Sistema TNM (Tumor/ Linfonodo/ Metástase) proposto pela OMS (OWEN, 1980)..... | 40 |
| TABELA 7 – Porcentagem de expressão da E-caderina por categoria tumoral nas neoplasias mamárias de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da UFPR, campus de Curitiba, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004..... | 41 |
| TABELA 8 – Expressão da E-caderina de acordo com as variáveis clínicas tamanho do tumor, ulceração e sobrevida dos grupos Adenoma, Carcinoma com prognóstico bom e Carcinoma com prognóstico ruim e estadiamento dos grupos Adenoma, Carcinoma com prognóstico bom, Carcinoma com prognóstico ruim, Carcinoma com metástase pulmonar e Carcinoma inflamatório..... | 45 |
| TABELA 9 – Expressão da E-caderina nos Adenomas de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da UFPR, campus de Curitiba, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004. | 47 |

| | |
|--|----|
| TABELA 10 – Expressão da E-caderina nos Carcinomas com prognóstico bom de tecido mamário de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da UFPR, campus de Curitiba, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004..... | 48 |
| TABELA 11 – Expressão da E-caderina nos Carcinomas com prognóstico ruim de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da UFPR, campus de Curitiba, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004..... | 49 |
| TABELA 12 – Expressão da E-caderina nos Carcinomas com metástase pulmonar de cadelas recebidas pelo Serviço de Patologia Veterinária do Hospital Veterinário da UFPR, campus de Curitiba..... | 50 |
| TABELA 13 – Expressão da E-caderina nos Carcinomas Inflamatórios de cadelas recebidas pelo Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus de Botucatu..... | 51 |

SINÓPSE

EXPRESSÃO DA E-CADERINA NO PROGNÓSTICO DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS

Autora: Christine Hauer Piekarz

Orientador: Alexander Welker Biondo

As neoplasias mamárias são os tumores mais comuns nas cadelas não castradas. Embora a avaliação microscópica do nódulo defina o seu diagnóstico, marcadores protéicos que caracterizem o risco no desenvolvimento de metástases têm sido propostos como ferramenta auxiliar na determinação do seu prognóstico. A e-caderina (caderina epitelial) é um membro da família das caderinas conhecida pelo importante papel na regulação da adesão intercelular em tecidos epiteliais. Em tumores mamários caninos parece existir uma significativa correlação entre a perda de expressão da e-caderina e outros indicadores de prognóstico ruim, como o tamanho do tumor, ulceração, tipo histológico, tipo de crescimento, metástase em linfonodos e necrose, indicando que a perda da expressão da e-caderina pode ter um valor prognóstico em neoplasias mamárias caninas.

No presente estudo retrospectivo foi utilizado 50 casos clínicos de neoplasias mamárias em cadelas, selecionados a partir do diagnóstico histopatológico, divididas em cinco grupos de 10 animais cada de acordo com a classificação histopatológica e característica clínica do tumor. A anamnese, a ficha de identificação e a necropsia dos pacientes foram registradas, quando possível, tendo por base as fichas clínicas de atendimento. Os tecidos neoplásicos de todos os animais foram fixados em formol 10%, e avaliados para expressão da E-caderina nos tecidos pela técnica de imunohistoquímica.

Foi observada, neste estudo, uma variação da expressão da E-caderina entre os diferentes grupos histológicos das neoplasias mamárias, mostrando que a expressão da E-caderina parece estar relacionada às diferentes classificações histológicas e comportamento biológico do tumor, tendo sido encontrado menor expressão nas neoplasias malignas. Ainda que tenha sido observado, também, uma expressão normal da E-caderina nos carcinomas inflamatórios, a maioria apresentou menor expressão em comparação aos outros grupos.

Dentre as pacientes portadoras de carcinoma com metástase pulmonar, 30% apresentaram a mesma expressão nos nódulos primários e metastáticos (pulmão), sugerindo que ocorram alterações dinâmicas reversíveis da expressão da E-caderina durante a progressão do carcinoma e o processo de metástase.

Não foi observada uma relação direta da expressão da E-caderina com o tamanho do tumor sugerindo que esta característica deve ser associada ao tipo histológico do tumor quando se analisa o grau de expressão da proteína.

Observando-se a grande dinâmica na alteração da expressão da E-caderina e comparando-a separadamente com variáveis de prognóstico, percebe-se que esta proteína não deve ser utilizada como um fator de prognóstico independente, mas pode ser sim um marcador no qual a sua ausência indica maior malignidade da neoplasia principalmente correlacionando-a aos carcinomas inflamatórios.

ABSTRACT

EXPRESSION OF E-CADHERIN IN THE PROGNOSIS OF MAMMARY NEOPLASIAS IN BITCHES

Author: Christine Hauer Piekarz

Adviser: Alexander Welker Biondo

The mammary tumors are the most common in intact bitches. Although the microscopic evaluation of the nodule defines its diagnostic, proteins markers that characterize the risk in the development of metastases have been proposed as auxiliary tools in the determination of its prognostic. The E-cadherin (epithelial cadherin) is a member of the cadherins families known for having important role in the regulation of intercellular junction. It seems to exist a significant relation between the loss of the e-cadherin and other indicators of poor prognostic in the canine mammary tumors, such as tumor size, ulceration, histological type, growing type, lymph nodes metastases and necrosis, indicating that the loss of expression of the E-cadherin may have a prognostic value in these tumors.

Fifty clinic cases of bitch mammary neoplasms were used in the current retrospective study, selected from the histopathological diagnostic and divided in 5 groups of 10 animals each, according to the histopathological classification and clinic characteristic of the tumor. The anamnesis, the identification card and the patient necropsy were registered when it was possible, based on the consultation clinic cards. The neoplastic tissues from all animals were fixed in 10% formalin and evaluated for the E-cadherin expression in tissues by immunohistochemical methods.

A variation of the E-cadherin expression in the different histological groups of the mammary neoplasias was observed in this study, showing that the E-cadherin

expression seems probably to be related to the different histological type and biological behavior of tumors, finding a minor expression in the most malignant tumors. Even if a normal expression of the E-cadherin in the Inflammatory Carcinomas has also been observed, the majority showed minor expression comparing to the other groups.

Only 30% of the patients with lung metastase carcinoma showed the same expression of the primary and metastatic nodes, suggesting that reversible dynamics alterations of the E-cadherin expression occur during the carcinoma progression and metastasis development.

A straight relation of the E-cadherin expression with the tumor size was not verified suggesting that this characteristic must be associated to the histological type of tumor when is analyzed the degree of the protein expression.

By observing the grade dynamic in the alteration of the E-cadherin expression and comparing it apart with prognostic variables, it is understandable that this protein can not be used as a factor of independent prognostic, but it sure can be a marker in which its absence indicates a major malignant of the neoplasm, relating it mainly to the inflammatory carcinomas.

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias são os tumores mais comuns nas cadelas não castradas (RUTTEMAN *et al.*, 2001; SORENMO, 2003). Estas afecções acometem, com maior frequência, fêmeas entre nove e doze anos de idade, e as raças nas quais se observa maior incidência dos tumores de mama são os Poodles, os Pastores Alemães e os Cockers Spaniel, além dos animais sem raça definida (RUTTEMAN *et al.*, 2001).

O diagnóstico definitivo para tumores mamários é determinado pelo exame histopatológico. O exame microscópico das células tumorais e da cadeia linfática fornece informações importantes sobre a natureza, o tipo histológico e a extensão microscópica da lesão (CAVALCANTI e CASSALI, 2006).

Embora a avaliação microscópica do nódulo defina o seu diagnóstico, marcadores protéicos que caracterizem o risco no desenvolvimento de metástases têm sido propostos como ferramenta auxiliar na determinação do seu prognóstico (WEIGELT *et al.*, 2005). As proteínas de superfície celular responsáveis pela junção celular ou CAMs (moléculas de adesão celular) foram descritas como potenciais marcadores, sendo suas cinco principais classes as caderinas, imunoglobulinas, selectinas, mucinas e integrinas (LODISH *et al.*, 2000).

Dentre as proteínas de junção celular, as caderinas parecem ser as mais promissoras como indicadores de prognóstico nas neoplasias mamárias. Além de atuarem na junção intercelular estão também envolvidas na regulação de processos observados no desenvolvimento tumoral como o crescimento celular desordenado, a diferenciação celular defeituosa e a organização tecidual modificada. Deste modo, é

esperado que estas moléculas afetem também a gênese do tumor e o comportamento das células neoplásicas (KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005).

A E-caderina (caderina epitelial) é um membro da família das caderinas conhecida por desempenhar um papel importante na regulação da adesão intercelular em tecidos epiteliais. É considerada o principal componente na junção de aderência transmembranosa de células epiteliais de todos os órgãos, como as células epiteliais luminiais mamárias (TAKEICHI, 1991). Como a maioria dos tumores de mama, tanto na mulher como na cadela, são de origem epitelial, a E-caderina tem sido intensamente estudada em relação à sua função na gênese destes tumores (MATOS *et al.*, 2006).

O uso da imunoistoquímica no estudo de marcadores prognósticos dos tumores de mama em cadelas constitui importante ferramenta de trabalho na rotina e pesquisa diagnósticas (KANDIOLER-ECKERSBERGER *et al.*, 2000). A utilização de anticorpos monoclonais contra antígenos específicos associados aos tumores de mama permite um melhor conhecimento da biologia tumoral, permitindo, com isso, um diagnóstico, prognóstico e tratamento mais direcionados para o controle destas neoplasias (MOTTOLLESE *et al.*, 1994).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A GLÂNDULA MAMÁRIA NAS CADELAS

Nas cadelas as glândulas mamárias apresentam-se sob a forma de linhas mamárias subepidermais (DYCE *et al.*, 1996), consideradas glândulas secretoras especializadas resultantes da invaginação da epiderme durante a embriogênese, gerando uma série de ductos que se conectam ao ambiente externo (KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005). Seu desenvolvimento inicia-se na fase embrionária e continua lentamente até o período pré-puberdade (CAVALCANTI e CASSALI, 2006). O desenvolvimento da glândula mamária só é efetivado na presença dos hormônios da gestação e da lactação, que induzirão a ramificação e estimularão a proliferação de células germinativas finais e a diferenciação em alvéolos glandulares que produzirão o leite. Após o desmame, o alvéolo regride por apoptose e as estruturas ductais são mantidas (KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005).

A mama é composta pelos ductos ou alvéolos que são componentes epiteliais, pelo produto de secreção (na fase de lactação) e pelo estroma (SILVERMAN, 1997). O lume dos ductos e alvéolos mamários é revestido internamente por células epiteliais (BOUSSADIA *et al.*, 2002) e externamente pelas células mioepiteliais (RADICE *et al.*, 1997) que estão relacionadas com o reflexo de ejeção do leite (SILVERMAN, 1997). Nos cães, as mamas são tipicamente dispostas em alinhamento bilateral que se estendem desde a região torácica ventral à inguinal. O número médio de glândulas é de 10, distribuídas da seguinte forma: quatro torácicas de tamanho menor, quatro abdominais de tamanho médio e duas inguinais ou púbicas de maior tamanho (DYCE *et al.*, 1996).

2.2 NEOPLASIAS MAMÁRIAS

O desenvolvimento de uma neoplasia resulta do somatório de uma série de fatores originando células que não respondem aos mecanismos naturais de controle (RUTTEMAN *et al.*, 2001). Apesar das neoplasias terem origem em diferentes tecidos e seu desenvolvimento ser induzido por diversos agentes, como vírus, produtos químicos mutagênicos e radiações, o dano no genoma celular é um ponto em comum para todas as neoplasias, porém, apesar de geralmente inconseqüente, este dano genético produzido por um carcinógeno parece ser corriqueiro (CULLEN *et al.* 2002). O processo de formação de um tumor é dividido em etapas distintas, como iniciação, promoção, progressão e manifestação clínica (RUTTEMAN *et al.*, 2001).

Os tumores mamários apresentam-se freqüentemente como nódulos que podem apresentar tipos histológicos diversos e ocorrer em uma ou mais glândulas mamárias de forma sincrônica (MISDORP, 2002; CAVALCANTI e CASSALI, 2006). Nestes casos em que as lesões da mama surgem de maneira multicêntrica, o tumor de pior prognóstico é o que determinará a evolução clínica do paciente (CAVALCANTI e CASSALI, 2006). O câncer de mama é uma doença clinicamente heterogênea, ou seja, se expressa de forma muito variada em cada paciente, e esta natureza heterogênea acarreta numa dificuldade não somente para definir a cura da doença, mas também para determinar fatores de risco para o desenvolvimento de metástases (WEIGELT *et al.*, 2005).

A determinação do grau de malignidade dos tumores é baseada em uma série de características de avaliação, entre elas a diferenciação celular, índice de mitose, pleomorfismo celular ou nuclear, presença de necrose, invasividade, reação estromal e resposta linfóide inflamatória. A determinação deste grau pode estar associada à

sobrevida, índice de metástase, intervalo livre da doença, ou com a freqüência e/ou intervalo de tempo de recorrência local (POWERS, 2001).

A maioria das neoplasias malignas é classificada como tumores epiteliais malignos, ou carcinomas. Os carcinomas são classificados em 4 graus histológicos, divididos pelas lesões em: (a) os não infiltrativos, como o carcinoma *in situ* (grau 0); (b) os com invasão do estroma adjacente, mas sem invasão vascular ou linfática detectável (grau I); (c) os com invasão vascular ou linfática e/ou metástase para linfonodos regionais (grau II); e (d) os com evidências de metástases distantes (grau III). Além disso, estes tumores foram classificados baseados em seu grau de diferenciação celular (pouco diferenciado, moderadamente diferenciado e bem diferenciado). Ambas as classificações são relatadas como tendo importante relação à agressividade tumoral (RUTTEMAN *et al.*, 2001).

Baseado nisso, a diferenciação histopatológica dos tumores epiteliais de glândulas mamárias tem um impacto no prognóstico, com este sendo inversamente proporcional à perda da diferenciação. Por exemplo, os carcinomas *in situ* e os adenocarcinomas têm melhor prognóstico que os carcinomas anaplásicos e inflamatórios (SORENMO, 2003). Os carcinomas inflamatórios apresentam uma designação específica reservada, pois, histologicamente, constituem um tipo nítido de carcinoma pobremente diferenciado com grande evidência de células inflamatórias mono e polinucleares infiltradas. Clinicamente, este neoplasma cresce e provoca metástases com grande velocidade, além de invadir vasos linfáticos da pele resultando em acentuado edema e inflamação (RUTTEMAN *et al.*, 2001).

A avaliação clínica das neoplasias mamárias requer a determinação dos seguintes fatores: (1) condições gerais do animal; (2) sinais clínicos; (3) durações dos

sinais; (4) velocidade de crescimento tumoral; (5) localização; (6) tamanho; (7) consistência do tumor; (8) número de glândulas envolvidas; (9) forma de crescimento; (10) ulceração; (11) aderência em tecidos adjacentes; (12) aumento dos linfonodos regionais; (13) linfedema de extremidades; (14) deformidade da mama; (15) recorrência e, (16) presença de metástase à distância. Os fatores 6, 10, 11, 12 e 16 contribuem para a determinação do estágio clínico da doença tumoral de acordo com o sistema TNM (Tumor/Linfonodo/Metástase) da Organização Mundial de Saúde (MISDORP, 2002).

O melhor meio de se obter um diagnóstico definitivo é por meio do exame histológico da biópsia excisional (RUTTEMAN *et al.*, 2001). O exame histopatológico é o método de eleição para identificar as características de uma neoplasia (MOTA e OLIVEIRA, 1999). Quando, após avaliação física, suspeita-se de metástase no linfonodo, este deve ser avaliado pela análise citológica realizada por meio de aspirado por agulha fina. Este exame também pode ser útil para o diagnóstico do carcinoma inflamatório (RUTTEMAN *et al.*, 2001), mas nas demais neoplasias mamárias a citologia é útil apenas como um diagnóstico presuntivo, e não definitivo, como utilizado no diagnóstico de processos benignos, como cistos ou abscessos e para massas neoplásicas como o mastocitoma e outros tumores de células redondas (CULLEN *et al.*, 2002).

Vários fatores têm sido relacionados ao prognóstico, entre eles o tamanho do tumor, envolvimento de linfonodos, presença de metástases distantes, tipo histológico, grau de malignidade, grau de diferenciação celular, evidência de infiltrado mononuclear adjacente ao tumor, atividade do receptor do hormônio esteróide e índice de mitose (RUTTEMAN *et al.*, 2001). As características histopatológicas indicativas de um

prognóstico reservado são: anisocariose, presença de necrose tumoral, ocorrência de invasão de vasos linfáticos e/ou sangüíneos e observação de metástases em linfonodos satélites (PHILIBERT et al., 2003). O tamanho do tumor é considerado como um fator de prognóstico independente, pois tumores menores que 3 cm de diâmetro estão associados com um prognóstico significativamente melhor que os tumores maiores que esta medida (SORENMO, 2003). Sabe-se que o risco de desenvolvimento de metástase aumenta com a presença de células neoplásicas em linfonodos, com o maior tamanho do tumor primário e com a perda da diferenciação histopatológica (WEIGELT *et al.*, 2005), e que o enfraquecimento dos mecanismos de adesão celular, que envolve alterações na adesão celular e interações das células com a matriz extracelular no tumor primário, é um pré-requisito para a ocorrência de metástase (BUSSEMAKERS e SCHALKEN, 1996).

A imunoistoquímica pode ser utilizada como um auxílio na classificação de diversos tumores em medicina veterinária, com emprego crescente na rotina da medicina humana (POWERS, 2001). A aplicação da imunoistoquímica tem trazido informações úteis (MISDORP, 2002), pois permite determinar com maior precisão a presença de marcadores hormonais, a taxa de proliferação celular, a angiogênese e a presença de produtos de proto-oncogenes e de genes supressores tumorais (CAVALCANTI e CASSALI, 2006).

2.2.1 Neoplasias mamárias em cadelas

As neoplasias mamárias são os tumores mais comuns nas cadelas não castradas, sendo, portanto, claramente hormônio dependentes (RUTTEMAN *et al.*, 2001; SORENMO, 2003). Em conseqüência, o risco de ocorrência de neoplasias

malignas em cadelas castradas antes do primeiro estro é baixo, em torno de 0,05%. Este risco aumenta para 8,0% depois do primeiro estro e para cerca de 26,0% se submetida à ovariossalpingoisterectomia após o segundo estro, quando comparadas com cadelas intactas. Depois disso a castração não interfere mais na oncogênese das neoplasias malignas. Porém, a chance de desenvolver tumores benignos parece ser reduzida pela castração em qualquer idade (RUTTEMAN *et al.*, 2001; SORENMO, 2003).

Os tumores de mama representam aproximadamente 52% de todas as neoplasias na cadela, sendo que 50% delas são malignas (RUTTEMAN *et al.*, 2001). E, dentre as malignas, cerca de 50% são os carcinomas. A classificação pode ser realizada de acordo com a origem tecidual (tecido epitelial, miopetelial ou mesenquimal), os aspectos morfológicos e o prognóstico (SORENMO, 2003).

A metodologia para a classificação os tumores varia consideravelmente, porém há um consenso geral para as seguintes categorias: adenomas, carcinomas e tumores mistos benignos e malignos (MOULTON, 1990). A Organização Mundial da Saúde classifica os tumores de mama da cadela em tumores malignos, benignos, não classificados e hiperplasias ou displasias mamárias. As neoplasias malignas são: o carcinoma *in situ*, carcinoma complexo, carcinoma simples com os subtipos tubulopapilar, sólido, e anaplásico; tipos especiais de carcinoma, que agrupam o carcinoma de células fusiformes, o de células escamosas, o mucinoso e o rico em lipídio; sarcomas tais como fibrossarcoma, osteossarcoma e outros sarcomas (MISDORP *et al.*, 1999).

Nos tumores benignos estão agrupados os adenomas simples, complexo e basalóide, os fibroadenomas de baixa e alta celularidade, o tumor misto benigno e o

papiloma ductal. As hiperplasias ou displasias mamárias na cadela são classificadas como hiperplasia ductal, hiperplasia lobular podendo ser epitelial ou adenose, cistos, ectasia ductal, fibrose local e ginecomastia (MISDORP *et al.*, 1999).

O diagnóstico da neoplasia mamária em medicina veterinária deve incluir o exame físico detalhado, baseado na idade, no histórico reprodutivo e nos sinais clínicos, como a presença de nódulos mamários e aumento de volume de linfonodos regionais. Sinais sistêmicos como tosse, dispnéia e claudicação, que podem ocorrer devido ao desenvolvimento de metástases, merecem especial atenção. Deve ser considerado na primeira avaliação se o local da região da doença permite ou não uma completa ressecção (CAVALCANTI e CASSALI, 2006).

O estadiamento das neoplasias mamárias em cadelas deve ser voltado para a avaliação da fase de evolução tumoral, bem como as possibilidades de progressão do tumor, no seu sítio de origem e em outros territórios (metástases). Este estadiamento pode ser feito segundo o sistema TNM (Tumor/ Linfonodo/ Metástase) proposto pela Organização Mundial de Saúde (MOULTON, 1990).

A radiografia ainda é o principal método para avaliação de metástases pulmonares em animais (SORENMO, 2003). Portanto, nos casos em que a malignidade não pode ser excluída, deve-se realizar radiografia torácica dos planos laterais direito e esquerdo e ventrodorsal, para avaliar possíveis metástases em pulmão e linfonodos esternais do animal, uma vez que todos os tumores mamários malignos têm um potencial metastático (RUTTEMAN *et al.*, 2001). Este risco de disseminação está correlacionado ao tipo tumoral, diferenciação histológica e vários fatores clínicos de prognóstico. Em geral, os tumores epiteliais provocam metástases pela circulação linfática para linfonodos regionais e pulmões, enquanto os tumores mesenquimais se

disseminam pela via hematógica diretamente para o pulmão (SORENMO, 2003). Portanto, os principais órgãos acometidos pelas lesões metastáticas são: linfonodos regionais (inguinais e axilares) e pulmão e com, menor frequência, rins, fígado, baço, pele, adrenais, encéfalo, olhos e esqueleto (KITCHELL, 1995; CAVALCANTI e CASSALI, 2006).

Em medicina veterinária, o diagnóstico histopatológico deve ser realizado em todos os casos de neoplasia mamária submetidas à exérese cirúrgica. A exérese cirúrgica é o tratamento de escolha para todos os cães com tumores de glândula mamária, com exceção do carcinoma inflamatório ou na presença de metástases distantes (RUTTEMAN et al, 2001; MISDORP, 2002). Realizada com ampla margem de segurança é a modalidade de tratamento mais efetiva para o controle local do tumor e que confere maior sobrevida para cadelas com câncer de mama (BIRCHARD, 1995; MISDORP, 2002). O tipo de cirurgia dependerá da extensão da doença (RUTTEMAN et al., 2001), do tamanho, localização, número e grau de infiltração dos tumores, além da condição dos linfonodos regionais, idade do animal e perspectiva do proprietário (MISDORP, 2002).

A quimioterapia é realizada em todas as mulheres com câncer de mama com risco de desenvolver metástase distante. No entanto, em cães com tumores mamários de alto risco, ainda são necessários estudos prospectivos para avaliar a eficácia da quimioterapia e quais drogas e protocolos são mais eficazes (SORENMO, 2003).

Em medicina veterinária, o aumento na casuística e a complexidade na evolução clínica dos tumores de mama nas cadelas têm despertado interesse especial no estudo dos fatores de prognóstico. Mas determinar o prognóstico do paciente canino com neoplasia mamária pode ser difícil, já que o comportamento biológico desses tumores

varia consideravelmente (KURZMAN e GILBERTSON, 1986). Clinicamente, o câncer de mama é uma doença heterogênea, ou seja, se expressa de forma muito variada em cada paciente, e esta natureza heterogênea acarreta numa dificuldade não somente para definir a cura da doença, mas também para determinar fatores de risco para o desenvolvimento de metástases (WEIGELT *et al.*, 2005). Dessa forma, a definição de subpopulações de pacientes caninos com evoluções distintas de sobrevida facilitaria não apenas a determinação do prognóstico, como também as melhores condutas terapêuticas a serem adotadas (KURZMAN e GILBERTSON, 1986).

Estudos utilizando culturas celulares e modelos animais sugeriram que a E-caderina é uma molécula supressora de tumor e de invasão neoplásica (KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005). Isto também foi observado com o estudo da prevalência da perda desta molécula em lesões precursoras não invasivas conhecidas como carcinomas lobulares *in situ* (COWIN *et al.*, 2005).

Em tumores mamários caninos parece existir uma significativa correlação entre a perda de expressão da E-caderina e outros indicadores conhecidos de prognóstico ruim, tais como tamanho do tumor, ulceração, tipo histológico, tipo de crescimento, metástase em linfonodos e necrose, indicando que a perda da expressão da E-caderina pode ter um valor prognóstico em neoplasias mamárias caninas (MATOS *et al.*, 2006).

Baseando-se nessas evidências, parecer ser importante a influência que as caderinas exercem no desenvolvimento da neoplasia e de suas metástases, com especial atenção à E-caderina, pois é uma molécula responsável pela adesão das células epiteliais, das quais a maioria dos tumores é derivada.

2.3 CADERINAS

As caderinas são proteínas transmembranosas (BERX e VAN ROY, 2001; KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005), cálcio dependentes (LODISH *et al.*, 2000; MATOS *et al.*, 2006), com função de promover adesão intercelular (KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005). São moléculas que promovem a manutenção da arquitetura tecidual normal (MATOS *et al.*, 2006). Existem mais de 40 caderinas diferentes conhecidas (LODISH *et al.*, 2000). As caderinas mais estudadas são as caderinas E (epitelial), P (placentária) e N (neural), conhecidas como caderinas clássicas (ROWLANDS *et al.*, 2000).

Os ductos e alvéolos mamários que se formam ainda na embriogênese são duplamente revestidos por células epiteliais. Estas células se aderem umas às outras pela E-caderina (BOUSSADIA *et al.*, 2002). As células mioepiteliais, que envolvem a camada luminal externa, se aderem umas às outras pela P-caderina (RADICE *et al.*, 1997). Sabe-se que a expressão da P-caderina é restrita ao mioepitélio nas glândulas mamárias normais não lactantes de mulheres, porém tem sido observada em muitos carcinomas ductais (SOLER *et al.*, 2002). Esta observação pode ser um indicativo de que as células tumorais têm características de células mioepiteliais ou de revestimento (RADICE *et al.*, 2003). Sabe-se também que a perda de expressão da P-caderina resulta em uma alteração fenotípica da glândula mamária, levando a um desenvolvimento precoce da glândula e diferenciação de células epiteliais (KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005).

A E-caderina é um elemento da família das caderinas conhecida por desempenhar um papel importante na regulação da adesão intercelular em tecidos epiteliais (TAKEICHI, 1991; MATOS *et al.*, 2006). É considerada a principal componente na junção de aderência transmembranosa de células epiteliais de todos os órgãos,

como as células epiteliais luminais mamárias (TAKEICHI, 1991). Como a maioria dos tumores de mama, tanto do homem como do cão, são de origem epitelial, a E-caderina tem sido intensamente estudada em relação à sua função na gênese do tumor (MATOS *et al.*, 2006). Esta molécula parece também ser essencial para a diferenciação e sobrevivência da célula epitelial alveolar, bem como para a função da glândula, pois foi observado que a destruição da E-caderina do epitélio mamário em lactação resulta em acentuada apoptose com concomitante perda da produção de leite (BOUSSADIA *et al.*, 2002).

2.3.1 Fisiopatologia das Caderinas

As E-caderinas possuem como principal função a união entre as células epiteliais, e as P-caderinas a das células mioepiteliais. Esta expressão diferenciada da E-caderina e P-caderinas produz dois compartimentos na glândula mamária, com células epiteliais revestindo o lume e células mioepiteliais encobrendo a membrana basal. Mas as caderinas clássicas não estão envolvidas em ligações entre as células epiteliais e mioepiteliais. Esta função é realizada por uma subfamília de caderinas, as caderinas desmossomais, as quais são componentes transmembranosas dos desmossomos (PITELKA *et al.*, 1973).

Os desmossomos unem as células epiteliais, as células mioepiteliais e os dois tipos de células umas as outras, sendo essenciais para o estabelecimento do arranjo de dupla camada (RUNSWICK *et al.*, 2001). Suas uniões, localização celular e atividade funcional são reguladas, em parte, pelos complexos clássicos de adesão das caderinas (KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005).

Devido às suas interações homofílicas e expressão específica com o tipo celular, as caderinas clássicas iniciam a adesão celular e promovem a seleção da célula, enquanto que as caderinas desmossomais produzem resistência adicional para interações celulares (KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005), portanto, a perda da forte adesão que os desmossomos promovem pode desencadear importante atuação na disseminação das células tumorais, ou seja, a presença de desmossomos íntegros também pode prevenir as metástases (COWIN *et al.*, 2005; KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005).

Sabe-se que as células epiteliais normais expressam E-caderina. Entretanto células tumorais que passam por transição de epitelial para mesenquimal podem iniciar uma expressão inapropriada de N-caderina, uma proteína expressa normalmente em tecidos de origem não epitelial que tem sido encontrada em células tumorais mamárias (NIEMAN *et al.*, 1999; CAVALLARO *et al.*, 2002). A expressão da N-caderina leva a um aumento da migração e invasão celular, estando a E-caderina presente ou não (NIEMAN *et al.*, 1999). A redução da E-caderina e o aumento da N-caderina alteram o ambiente celular, mas não a morfologia que acompanha a transição de epitelial para mesenquimal (MAEDA *et al.*, 2005).

A atividade das caderinas é regulada por múltiplos mecanismos, incluindo a interação com as cateninas, eventos de fosforilação e derramamento de conteúdo extracelular (SOLER *et al.*, 2002). Muitos estudos mostraram que hormônios esteróides também regulam as caderinas. Sabendo-se que uma alteração na expressão do estrógeno pode estar envolvida no aumento da transcrição da E-caderina, a relação deste hormônio com a expressão da N- e da E-caderina tem sido bastante pesquisada (ROWLANDS *et al.*, 2000). Devido a essa repressão da E-caderina pelo estrógeno,

pode-se dizer que este hormônio também é responsável pela manutenção da arquitetura epitelial (COWIN *et al.*, 2005).

Além de expressarem a E-caderina, as células epiteliais que delimitam o lume dos ductos e alvéolos expressam também as cateninas associadas α -, β -pacoglobinas e p120 (DANIEL *et al.*, 1995). A E-caderina é expressa na superfície basolateral destas células epiteliais, no local de contato célula-célula (BRUNETTI *et al.*, 2003). O complexo caderina-catenina desempenha um importante papel na morfogênese e arquitetura tecidual e na progressão do câncer. Esses complexos são conhecidos por influenciar as metástases e a invasão das células neoplásicas por um processo envolvendo a perda da adesão celular (YOSHIDA *et al.*, 2001).

Os estudos recentes sobre a função da E-caderina mostraram importância desta molécula também na redução da proliferação celular. Dois mecanismos de redução pela E-caderina são conhecidos. No primeiro a E-caderina inibe a mitose, utilizando o receptor do fator de crescimento epidermal, o qual regula o nível de p27 nas células. P27 é uma proteína da família dos inibidores das quinases dependentes de ciclina que medeia a interrupção do ciclo celular bloqueando a transição da fase G1 para a S (TOYOSHIMA e HUNTER, 1994). O segundo mecanismo é mediado pela β -catenina, que quando livre atua na transcrição celular. A quantidade desta catenina livre pode ser originada da redução de expressão da E-caderina ou da mutação de genes (BRUNETTI *et al.*, 2005). A β -catenina tem uma função importante na organogênese e no câncer em seres humanos devido à sua dupla função, pois atua tanto no complexo de adesividade como na regulação de transdução ou transcrição (HATSELL *et al.*, 2003). Em lesões mamárias caninas, a ausência ou baixa expressão de E-caderina foi associada com a perda da expressão de β -catenina (BRUNETTI *et al.*, 2005).

2.3.2 O Complexo E-caderina-Cateninas

A adesão celular mediada pela E-caderina requer, além da disponibilidade de íons cálcio na superfície celular, da presença adequada de outras proteínas, como as chamadas α -, β - e γ -cateninas, presentes no lado citoplasmático da membrana plasmática, que ancoram a E-caderina ao citoesqueleto de actina (TAKEICHI, 1991). Estas associações das caderinas clássicas com suas cateninas formam estruturas identificadas pela microscopia como junções de aderências (KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005).

Estudos recentes têm fornecido importantes critérios de mecanismos a respeito das expressões das caderinas e cateninas em cânceres de mama (COWIN *et al.*, 2005), existindo fortes evidências de que desempenham um papel vital nesta glândula (KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005).

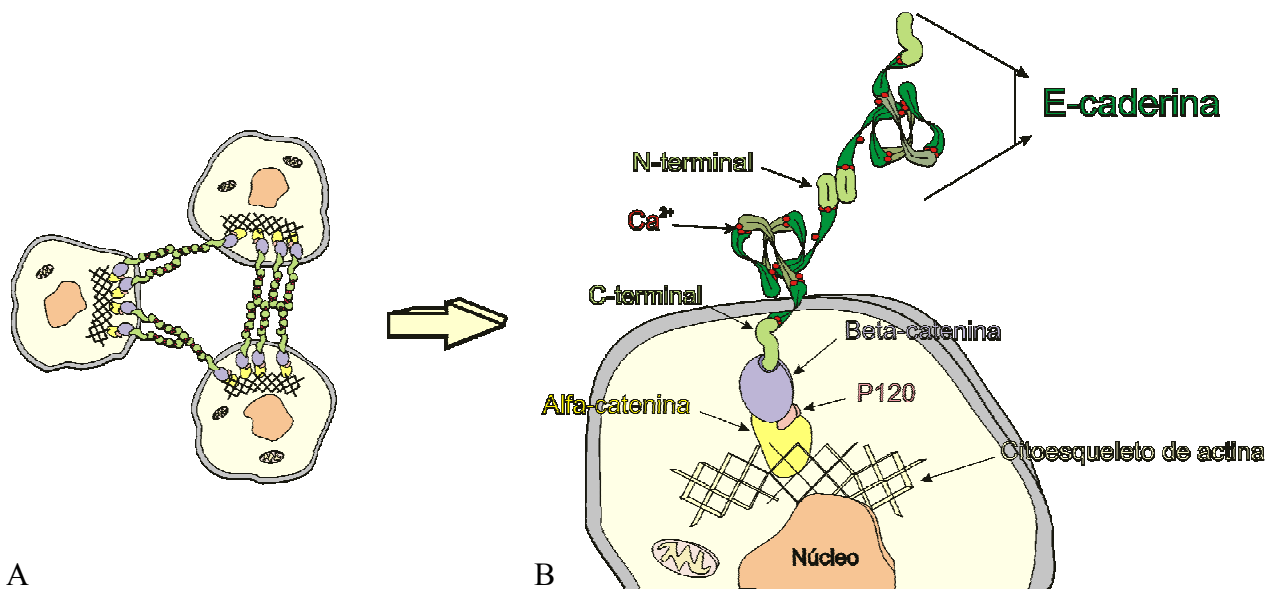
As cateninas α -, β - e p120 formam um complexo com a E-caderina em células epiteliais mamárias (FIGURA 1). Em geral, a expressão e localização celular das cateninas em cânceres mamários parecem corresponder com a presença ou ausência da E-caderina (KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005).

A presença da E-caderina nos tumores mamários só será funcional se formar um complexo com as cateninas (HATSELL *et al.*, 2003; KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005). Quando o nível de E-caderina está normal no tumor, mas as cateninas estão ausentes ou não estão interagindo com a caderina, a E-caderina não será efetiva na função de adesão intercelular no tumor primário (KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005).

A expressão de cateninas pode ser perdida em cânceres de mama com ausência de expressão da caderina e, alterações na fosforilação da catenina podem comprometer a adesão celular em cânceres caderina-positivos (COWIN *et al.*, 2005).

Portanto, a simples presença de cateninas não é suficiente para mostrar que a E-caderina é completamente funcional, já que aquelas podem ser alteradas após a tradução para modificar as funções das caderinas (KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005).

FIGURA 1 – Representação esquemática da interação do complexo E-caderina-cateninas. A figura “A” representa a união de três células ligadas pela E-caderina. Em maior aumento, na figura “B” está esquematizado a importância das cateninas alfa, beta e p120 na ligação da E-caderina ao citoesqueleto de actina da célula para a formação de adesão intercelular.



Fonte: Christine Hauer Piekarz, 2006.

Além de facilitar a adesão, as cateninas têm também função importante em vias de sinalização celular transmembranas (HATSELL *et al.*, 2003). Como exemplo, temos a dupla função das β -cateninas já citada anteriormente.

O entendimento das funções das caderinas e de suas cateninas associadas na glândula mamária ainda não é completo. Sabe-se que elas atuam no desenvolvimento e

função da glândula mamária normal e que parecem influenciar o câncer de mama e sua evolução clínica. Contudo, novos trabalhos são necessários para se compreender o uso destas proteínas como indicadores de prognósticos no auxílio aos oncologistas para delinear e selecionar a terapia mais efetiva e apropriada (KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005).

2.3.3 E-caderina como Indicadora de Prognóstico

Em medicina veterinária, o aumento na casuística e a complexidade na evolução clínica dos tumores de mama nas cadelas têm despertado especial interesse no estudo dos fatores de prognóstico. Determinar o prognóstico preciso do paciente canino portador de neoplasia mamária pode ser difícil, uma vez que o comportamento biológico desses tumores varia consideravelmente. Dessa forma, em animais, a definição de subpopulações de pacientes com evoluções distintas de sobrevida facilitaria não apenas a escolha das melhores condutas terapêuticas a serem adotadas, mas, também, a determinação do prognóstico (KURZMAN e GILBERTSON, 1986).

A E-caderina, como mediadora de adesão intercelular, impede que as células de um tumor primário se soltem e invadam locais próximos ou distantes (KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005). Portanto, é a redução da expressão dessas moléculas um fator facilitador da disseminação das células tumorais (BRUNETTI *et al.*, 2003; KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005), baseando-se nisso, é sugerido que a redução ou a ausência de expressão da E-caderina nos tumores pode servir como um indicador de prognóstico ruim. No entanto, trabalhos publicados mostram que há divergências a respeito da expressão das E-caderinas como fator prognóstico (KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005).

A perda de expressão da E-caderina parece ser um pré-requisito para a ocorrência da disseminação de células tumorais, e pode ser causada por um decréscimo transitório na expressão da molécula durante a fase inicial do desenvolvimento da metástase ou pela emergência de clones celulares em tumores primários com alterações genéticas levando à reduzida expressão da proteína (VAN DER WURFF *et al.*, 1994). Esta 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 está completamente entendida, mas fatores chave da transcrição com significativa ação no câncer de mama têm sido identificados (COWIN *et al.*, 2005).

Em seres humanos a associação entre a perda ou redução da atividade de E-caderina e a progressão de cânceres mamários esporádicos têm sido bastante documentadas (COWIN *et al.*, 2005). A expressão da E-caderina possui correlação, em tumores mamários humanos, com o tipo histológico, fração de crescimento, e expressão de p53, gene supressor de tumor capaz de ativar proteínas reparadoras do DNA quando este é danificado, reconhecendo o local de dano do DNA na fase G1/S do ciclo celular, e promovendo apoptose da célula danificada quando esta não pode ser reparada (CHARPIN *et al.*, 1997). No entanto, parece não haver correlação da expressão da proteína com fatores clínicos como idade do paciente, menopausa e tamanho do tumor (GURIEC *et al.*, 1996). Segundo estes estudos, ainda é controversa a associação da E-caderina com a presença de metástase nos linfonodos, o grau de diferenciação, condição dos receptores hormonais e expressão de c-erbB-2 (uma oncoproteína com alta expressão em vários adenocarcinomas requerida como indicador

de prognóstico ruim) (MATOS *et al.*, 2006). Entretanto, em outros trabalhos, níveis reduzidos de E-caderina têm indicado alto grau de malignidade (HEIMANN *et al.*, 2000).

Geralmente, a expressão da E-caderina corresponde inversamente ao grau histológico e, conseqüentemente, à diferenciação celular, porém não parece estar bem correlacionada com a sobrevida (KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005). Entretanto, outros dois estudos, em seres humanos, indicaram que a redução na expressão de E-caderina em carcinomas ductais infiltrativos de grau I e em carcinomas mamários de grau III foi associada à baixa sobrevida da paciente (TAN *et al.*, 1999; GILLETT *et al.*, 2001).

Em metástases, tanto a E-caderina positiva quanto negativa têm sido relatadas. Os estudos realizados com pacientes que apresentaram marcação negativa da E-caderina nos linfonodos mostraram que a redução na expressão desta proteína está correlacionada com menor período livre de metástases e com prognóstico ruim. Outros relatos indicaram que a simples presença heterogênea da molécula na neoplasia já é indicador de mau prognóstico. Já se observou que células das mais agressivas formas de câncer de mama, câncer de mama inflamatório e carcinoma micropapilar invasivo, muitas vezes apresentam uma expressão aumentada da E-caderina (KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005). A expressão mais intensa da E-caderina nas metástases pode ser devido à fixação das células no novo ambiente, para que possa estabelecer uma arquitetura. Portanto, a re-expressão dessa molécula de adesão por células neoplásicas, depois da liberação do local primário, pode ser necessária para a reunião entre as células num órgão distante (BRUNETTI *et al.*, 2003).

Um estudo em seres humanos sugere que os tumores com parcial ou total perda da expressão de E-caderina são mais infiltrativos, de maior grau de malignidade e mais prováveis de apresentarem disseminação para linfonodos (HEIMANN *et al.*, 2000). Mas,

apesar de estudos anteriores terem correlacionado à baixa expressão de E-caderina com propriedades invasivas, outras investigações têm observado que níveis de N-caderina e caderina-11 aumentados são mais intimamente associados com a invasão, motilidade e metástases de células do câncer de mama (NIEMAN *et al.*, 1999). A N-caderina pode facilitar a invasão e metástase por promover uma afinidade da célula tumoral pelas células estromais e endoteliais (COWIN *et al.*, 2005).

Duas pesquisas com tumores mamários caninos encontraram associação entre a expressão da E-caderina e o tipo e a diferenciação tumoral (RESTUCCI *et al.*, 1997; REIS *et al.*, 2003). Outro trabalho realizado com 60 casos de tumores mamários caninos malignos, baseado na função da E-caderina e da β -catenina na invasão e proliferação tumoral, foi observado que a redução destas duas moléculas parece ocorrer paralelamente à ocorrência de invasividade, mas não indica correlação com a proliferação celular. Além disso, estas proteínas pareceram ser indicadores de prognóstico ruim no concernente à sobrevida (BRUNETTI *et al.*, 2005).

Existe uma significativa associação entre a presença de necrose tumoral e perda da expressão da E-caderina. Em cânceres mamários em seres humanos, a necrose tumoral é associada à baixa sobrevida e rápida recorrência (MATOS *et al.*, 2006). Também foi encontrada uma importante associação entre tumores grandes (> 5 cm) e perda da expressão de E-caderina. A redução na expressão também foi associada por estes autores à ulceração tumoral, que frequentemente ocorre em tumores malignos mais agressivos (RUTTEMAN *et al.*, 2001).

Em um estudo realizado com 77 tumores mamários malignos e 131 linfonodos locais e regionais de 45 fêmeas caninas, demonstrou-se que 48% dos tumores apresentaram redução na expressão da E-caderina. A redução da expressão foi

significativamente relacionada ao tamanho do tumor e à presença de ulceração, mas não à ocorrência de aderência em tecidos adjacentes. Os tumores com diâmetro menor que 3 centímetros diferenciaram-se dos maiores por apresentarem uma expressão significativamente maior de E-caderina. As neoplasias com ulcerações apresentaram menor expressão que os não ulcerados. Importante redução de expressão também foi associada com a presença de metástase para linfonodos e presença de necrose (MATOS *et al.*, 2006). No entanto, em cães, a associação das E-caderinas com metástases ainda é controversa, pois em um estudo com cães acometidos por carcinomas mamários com metástase para linfonodos regionais, os resultados mostraram imunomarcção da E-caderina tanto nos tumores primários como nos linfonodos com metástases (BRUNETTI *et al.*, 2003).

Cânceres caracterizados por crescimento infiltrativo apresentaram expressão significativamente mais baixa que os de crescimento ordenado. Invasão vascular também foi associada com baixa expressão de E-caderina quando comparada com crescimento expansivo ou crescimento infiltrativo sem invasão vascular (MATOS *et al.*, 2006), porém, essa associação em seres humanos entre a expressão de E-caderina e invasão vascular de tumores mamários ainda é contraditória (PARKER *et al.*, 2001; GUPTA *et al.*, 2003). Outros dois estudos indicaram que os tumores bem diferenciados (grau I) apresentaram maior expressão de E-caderina que os menos diferenciados (graus II e III). Deste modo foi encontrada importante relação na expressão da E-caderina com o tipo histológico de neoplasias mamárias caninas, indicando que existe diferença significativa de expressão entre um grupo de tumores menos diferenciados e um grupo de tumores moderadamente e bem diferenciados (REIS *et al.*, 2003; MATOS *et al.*, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DOS CASOS

No presente estudo foi utilizado casos clínicos em estudo retrospectivo de neoplasias mamárias em cadelas. Para isso foram selecionados 50 casos de cadelas com o diagnóstico histopatológico de neoplasia mamária, sendo 30 pacientes submetidas à cirurgia para exérese neoplásica no período de 1999 a 2004 no Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná (HV-UFPR), 10 pacientes selecionadas no Serviço de Patologia do HV-UFPR e 10 do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – UNESP Campus de Botucatu.

As amostras foram divididas em cinco grupos de 10 animais cada, de acordo com a classificação histopatológica e característica clínica do tumor de acordo com MOULTON, 1990. O grupo controle foi formado com 5 amostras de tecido glandular mamário normal obtidos por necropsia de cadelas com ausência de neoplasias mamárias (TABELA 1).

A anamnese e ficha de identificação dos pacientes com tumores mamários foram registradas, quando possível (casos de adenoma, carcinoma com prognóstico bom e carcinoma com prognóstico ruim), tendo por base as fichas clínicas de atendimento. Dentre as informações, foram tabulados a raça, idade, o início do desenvolvimento do tumor, a realização de ovariosalpingoisterectomia prévia, a frequência da administração de anticoncepcional, ocorrência de pseudocieses e gestações e a forma de alimentação. Também foram obtidos, junto à ficha clínica, o exame físico pré-operatório,

quanto ao número de tumores encontrados na paciente, tamanho da(s) neoplasia(s), a ocorrência de ulceração do tumor e a sua localização ao longo da cadeia mamária.

TABELA 1 – Grupos utilizados no presente estudo segundo a classificação histológica de acordo com MOULTON (1990) e as características clínicas da neoplasia mamária.

| GRUPO | N°. de CASOS | CRITÉRIOS DE SELEÇÃO |
|----------------------------------|--------------|---|
| Adenoma | 10 | Animais com laudo histopatológico de Adenoma |
| Carcinoma com prognóstico bom | 10 | Animais que durante o período de acompanhamento pós-operatório não apresentaram recidiva e/ou metástase |
| Carcinoma com prognóstico ruim | 10 | Animais que durante o período de acompanhamento pós-operatório apresentaram recidiva e/ou metástases |
| Carcinoma com metástase pulmonar | 10 | Animais com laudo necroscópico de Carcinoma mamário primário e metástase pulmonar |
| Carcinoma inflamatório | 10 | Animais com laudo necroscópico de Carcinoma Inflamatório |
| Controle | 05 | Tecido mamário com ausência de neoplasia |
| TOTAL | 55 | |

A anamnese e exame físico das pacientes desses três grupos foram realizados pelos respectivos serviços clínicos mencionados, e registrados na ficha individual de cada paciente. A avaliação radiográfica do tórax e ultra-sonográfica do abdome com a presença ou não de metástases nestas cavidades foram realizadas para o estadiamento clínico das neoplasias mamárias, segundo o sistema TNM (Tumor/ Linfonodo/ Metástase) proposto pela OMS (OWEN, 1980). Este estadiamento dos tumores mamários, graduado em quatro estádios – I, II, III e IV – sendo o de grau IV de

maior malignidade, é fundamental para avaliar a possibilidade de progressão do tumor para os principais locais de ocorrência de metástases, como os linfonodos ou pulmão, portanto, foi importante para determinar a malignidade dos tumores estudados (KITCHELL, 1995).

Após a realização do estadiamento da doença e análise de todos os resultados obtidos nas avaliações citadas anteriormente, executou-se o procedimento cirúrgico. A mastectomia foi realizada com amplas margens de segurança, ressecando-se entre 2 a 3 cm de tecido normal perineoplásico. Quando possível, foi realizada a remoção dos linfonodos satélites. Após cirurgia adequada para cada caso específico, efetuou-se a colheita das amostras contendo tecido neoplásico para a classificação da histogênese tumoral.

A evolução da afecção neoplásica (presença ou ausência de recidiva e/ou metástase; paciente vivo ou morto) foi avaliada trimestralmente no período pós-operatório através de exames clínico e complementares no HV-UFPR. Para o presente estudo, este monitoramento foi finalizado no mês de dezembro de 2006, quando foram preenchidas fichas de estadiamento clínico para cada animal (ANEXO 1) e calculada a sobrevida de cada paciente.

As amostras dos animais dos demais grupos foram obtidas através da necropsia (carcinoma com metástase pulmonar, carcinoma inflamatório e controle). Estes animais não foram previamente submetidos à anamnese, exame clínico, tratamento cirúrgico ou acompanhamento para a obtenção de dados clínicos como as pacientes dos grupos anteriores.

Os tecidos neoplásicos de todos os animais, dos seis grupos, foram fixados em formol 10% tamponado com fosfato (pH 7,2) imediatamente após a sua extirpação

cirúrgica ou na necropsia. Após um período de fixação de aproximadamente oito horas, o material foi colocado em álcool 80%, seguindo-se procedimentos usuais para inclusão em parafina. Cortes de cinco micrômetros de espessura corados pela hematoxilina-eosina foram utilizados para diagnóstico e classificação histológica dos tumores, seguindo os critérios de MOULTON (1990).

3.2 IMUNOISTOQUÍMICA

As amostras previamente fixadas e embebidas em parafina foram submetidas a cortes de 4 μ m de espessura, e distendidas em lâminas histológicas devidamente preparadas com Poly-L-Lysine (Sigma P8920), para promover maior aderência dos cortes às lâminas de vidro. As lâminas foram mantidas em estufa a 60° C durante 24 horas até o seu processamento que foi feito segundo o protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – UNESP, Campus de Botucatu, utilizando-se a técnica de estreptoavidina-biotina-peroxidase (ANEXO 2).

Para a avaliação da expressão da E-caderina nos tecidos por imunoistoquímica foi utilizado o anticorpo primário monoclonal E-caderina de camundongo, clone 36B5, isotipo IgG1, para tecidos inclusos em parafina (NCL-E-Cad, Novocastra, EUA), e o anticorpo secundário universal, IgG de coelho e camundongo, Avidina DH e enzima biotinilada (EP-ABCu, Novocastra-EasyPath, EUA).

3.3 LEITURA DA EXPRESSÃO DA E-CADERINA

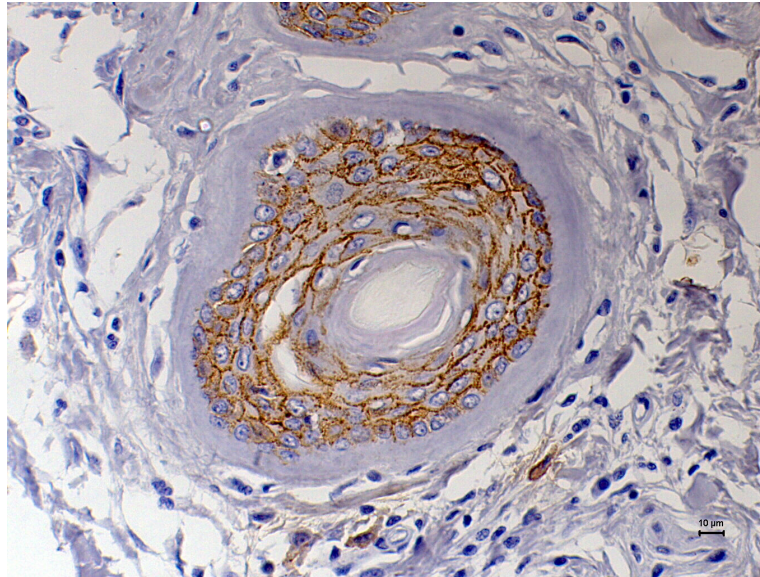
Todas as lâminas foram analisadas com o uso de microscópio óptico com maior atenção à área do epitélio neoplásico.

As lâminas foram avaliadas de acordo com a presença ou ausência de expressão, e quando presente a intensidade da expressão nas células epiteliais, levando-se em consideração somente o tecido neoplásico. O Grau de expressão da E-caderina avaliadas em todo o tecido neoplásico presente em cada lâmina, foi dividido em 5 grupos de acordo com a intensidade de expressão: negativo (-) quando 0% - ausência de expressão, e positivos: (+) quando 1-25% - expressão muito baixa, (++) quando 26-50% - baixa, (+++) quando 50-75% - mediana, e (+++++) quando 76-100% - normal.

Como controle negativo foram feitas duas lâminas substituindo o anticorpo primário por BSA e imunoglobulina de camundongo.

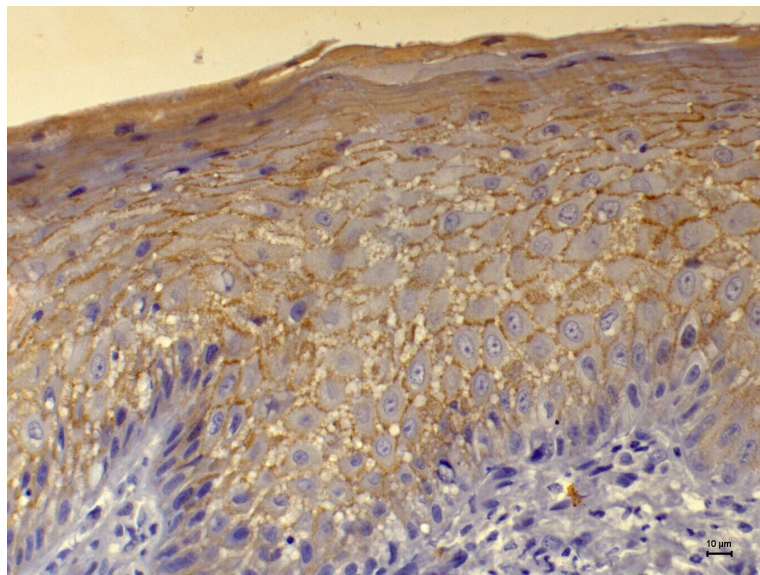
Na análise das lâminas foram buscadas áreas de tecido epitelial não neoplásico para se ter um controle positivo em cada amostra (FIGURA 2 e FIGURA 3). Nas amostras tidas com expressão normal, foi observada a presença de E-caderina entre mais de 75% das células epiteliais da área neoplásica (FIGURA 4 e FIGURA 5). A expressão mediana foi constatada quando houve uma expressão da E-caderina em mais de 50% das células epiteliais neoplásicas, porém pelo menos 15% das células não expressaram a proteína (FIGURA 6). A marcação muito fraca foi tida quando pouquíssimas células, no máximo 25%, expressaram a molécula (FIGURA 7 e FIGURA 8). E a marcação negativa quando a expressão não foi encontrada entre as células epiteliais de toda a área neoplásica (FIGURA 9, FIGURA 10 e FIGURA 11).

FIGURA 2 – Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica para ilustrar o controle positivo da expressão da proteína. Observar a marcação para a atividade da E-caderina entre células epiteliais de um folículo piloso. Carcinoma mamário em cadela. Aumento: 400 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2006.



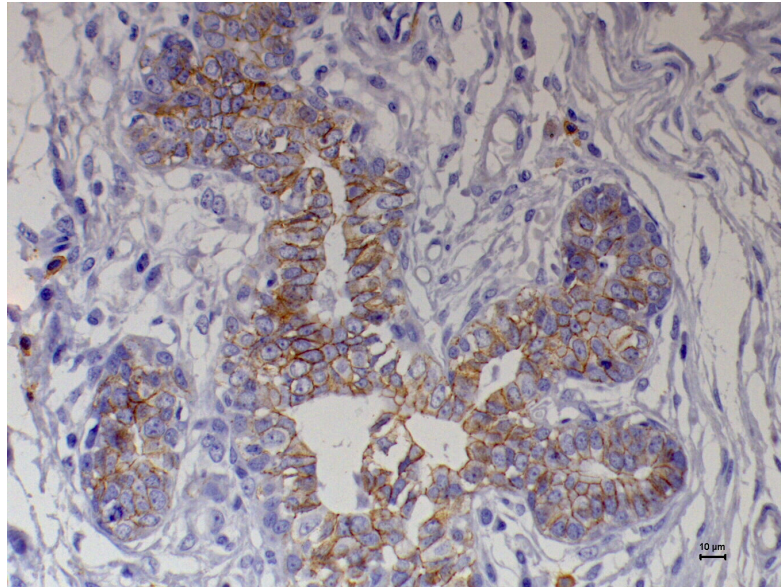
Fonte: Christine Piekarz, 2006

FIGURA 3 – Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica. Observar a marcação de E-caderina entre as células epiteliais normais da epiderme. Controle positivo da expressão da E-caderina na lâmina de um carcinoma inflamatório mamário em cadela que não expressou a proteína. Aumento: 400 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2006.



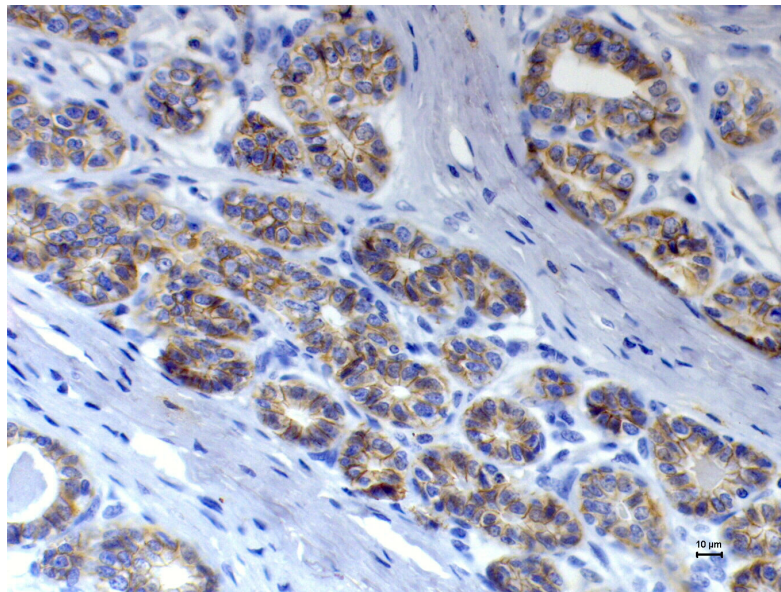
Fonte: Christine Piekarz, 2006

FIGURA 4 – Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de tecido mamário normal (++++) de cadela. Observar a marcação normal para a atividade da E-caderina entre células epiteliais da glândula mamária. Aumento: 400 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2006.



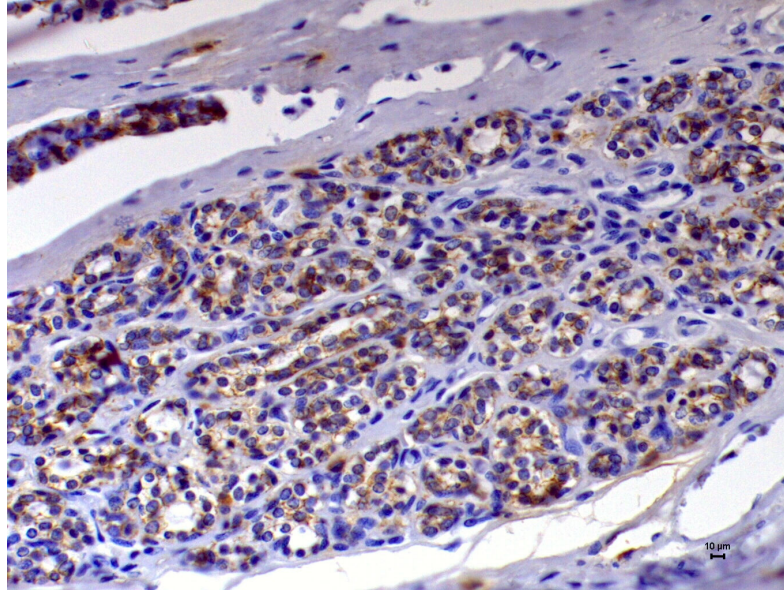
Fonte: Christine Piekarz, 2006

FIGURA 5 – Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um adenoma mamário em cadela. Observar a marcação normal (++++) para a atividade da E-caderina entre células epiteliais da glândula mamária de tecido neoplásico. Aumento: 400 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2006.



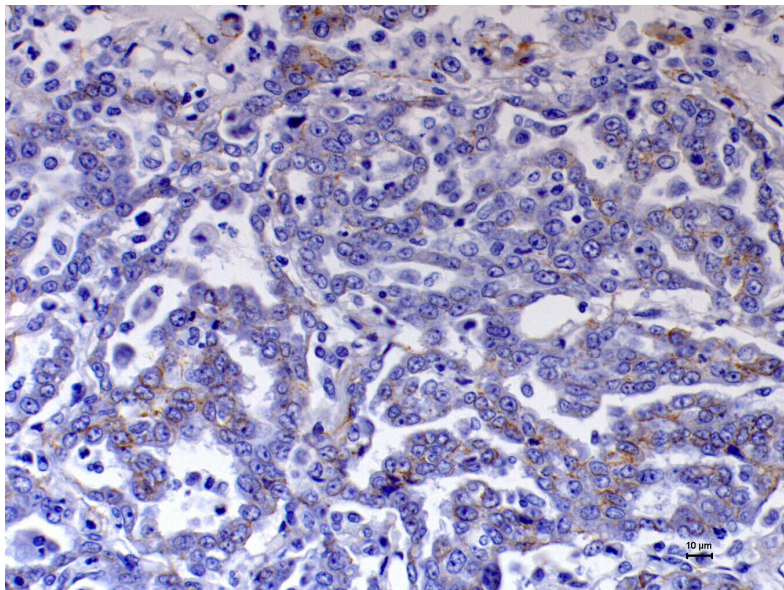
Fonte: Christine Piekarz, 2006

FIGURA 6 - Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um carcinoma mamário em cadela. Observar a marcação mediana (+++) para a atividade da E-caderina entre células epiteliais da glândula mamária de tecido neoplásico. Aumento: 200 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2006.



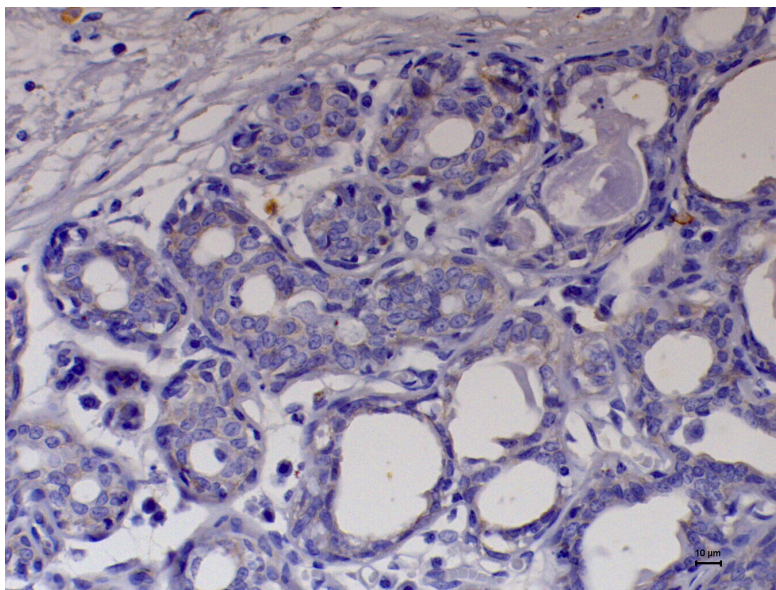
Fonte: Christine Piekarz, 2006

FIGURA 7 - Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de metástase pulmonar de um carcinoma mamário em cadela. Observar a marcação muito fraca (+) para a atividade da E-caderina entre células epiteliais do tecido neoplásico metastático. Aumento: 400 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2006.



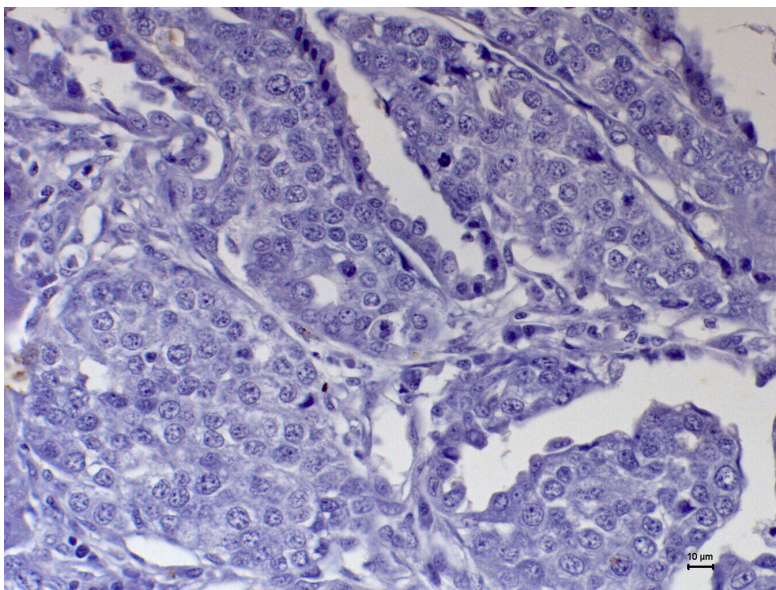
Fonte: Christine Piekarz, 2006

FIGURA 8 - Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um carcinoma inflamatório mamário em cadela. Observar marcação muito baixa (+) para a atividade da E-caderina entre células epiteliais da glândula mamária do tecido neoplásico. Aumento: 400 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2006.



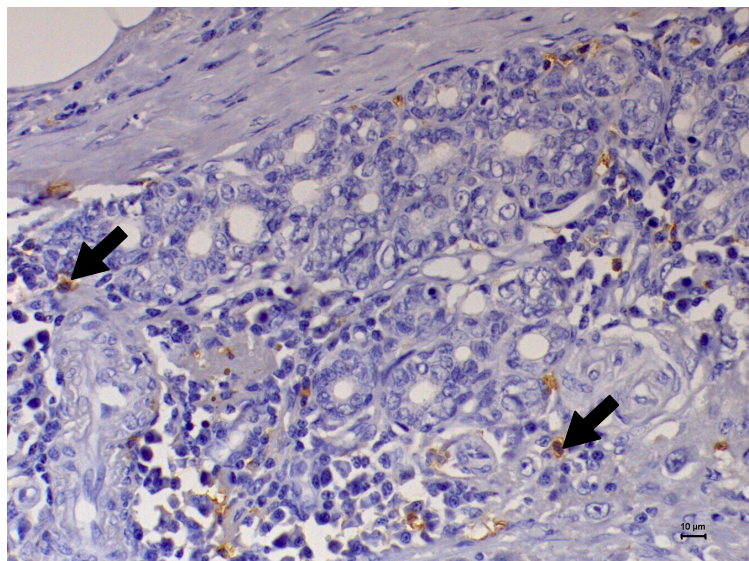
Fonte: Christine Piekarz, 2006

FIGURA 9 - Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de metástase pulmonar de um carcinoma mamário em cadela. Observar a ausência de marcação (-) para a atividade da E-caderina entre células epiteliais do tecido neoplásico metastático. Aumento: 400 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2006.



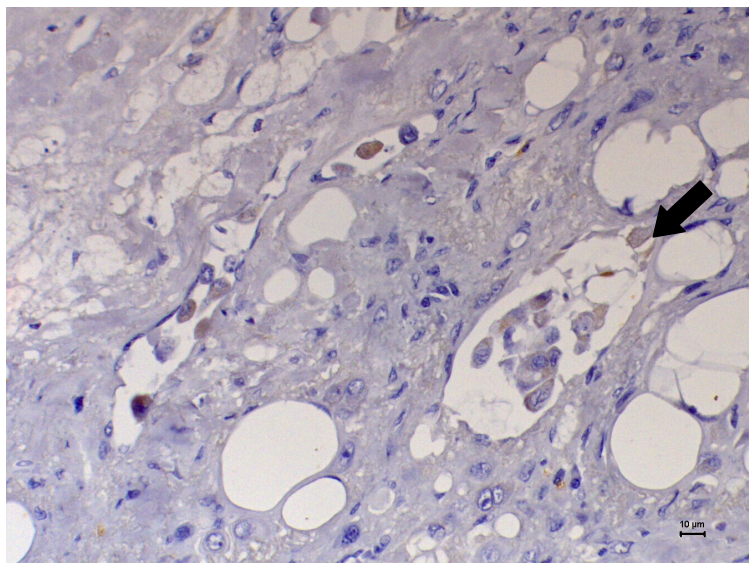
Fonte: Christine Piekarz, 2006

FIGURA 10 – Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um carcinoma inflamatório mamário em cadela. Observar a ausência de marcação (-) para a atividade da E-caderina entre células epiteliais da glândula mamária do tecido neoplásico, mostrando apenas marcações inespecíficas (flecha). Aumento: 400 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2006.



Fonte: Christine Piekarz, 2006

FIGURA 11 – Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um carcinoma inflamatório mamário em cadela com ausência de expressão da E-caderina. Observar o êmbolo neoplásico formado, indicado pela flecha. Aumento: 400 vezes. UNESP – Botucatu, SP, 2006.



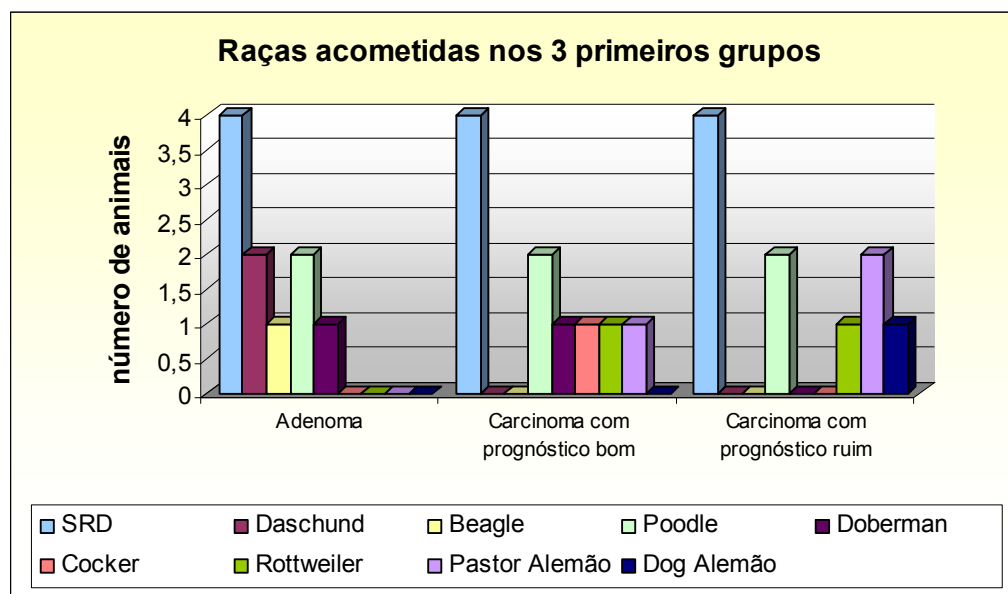
Fonte: Christine Piekarz, 2006

4 RESULTADOS

4.1 DADOS DE FREQUÊNCIA DE ACORDO COM OS GRUPOS HISTOPATOLÓGICOS

Tendo por base o total de neoplasias mamárias avaliadas no presente estudo, verificou-se maior ocorrência em cadelas sem raça definida (40%), as raças mais acometidas foram Poodle (20%) e Pastor Alemão (10%). A prevalência que as raças incluídas neste estudo apresentaram para o desenvolvimento de neoplasias mamárias (adenoma, carcinoma com prognóstico bom e carcinoma com prognóstico ruim) está representada na FIGURA 12.

FIGURA 12 – Frequência de neoplasias mamárias, distribuídas conforme a raça, em cadelas atendidas junto ao Hospital Veterinário da UFPR, campus de Curitiba, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004.



SRD = Animais Sem Raça Definida

A média de idade das cadelas acometidas pelas neoplasias mamárias dos grupos Adenoma, Carcinoma com prognóstico bom e Carcinoma com prognóstico ruim, neste estudo, foi de 9,1 anos, com uma variação entre 4 e 15 anos. Os dados referentes à idade de cada animal estão tabulados na TABELA 2.

TABELA 2 – Prevalência de neoplasias mamárias, distribuídas conforme a idade, em cadelas atendidas junto ao Hospital Veterinário da UFPR, campus de Curitiba, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004.

| | Adenoma | CA sem recidiva/metástase | CA com recidiva/metástase |
|--------------------|----------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | 9 | 9 | 13 |
| | 6 | 12 | 7 |
| | 4 | 13 | 15 |
| Idade | 10 | 8 | 5 |
| das | 12 | 6 | 12 |
| cadelas | 5 | 6 | 10 |
| | 8 | 7 | 10 |
| | 8 | 7 | 11 |
| | 13 | 9 | 12 |
| | 7 | 15 | 6 |
| Média | 8,2 | 9,2 | 10,1 |
| Média geral | 9,1 | | |

4.1.1 Adenoma

Os animais acometidos apresentaram uma média de 8,2 anos, com variação de 4 a 13 anos. Quanto ao tamanho do tumor, 60% apresentaram nódulos < 3 cm, 30% entre 3 e 5 cm e 10% > 5 cm. Apenas uma cadela (10%) apresentou ulceração do tumor. Até o último contato, em dezembro de 2006, 80% das pacientes apresentaram-se com vida. Das dez cadelas avaliadas, três (30%) apresentaram sinal de recorrência da doença, sete (70%) nunca tiveram gestação, oito (80%) nunca fizeram o uso de anticoncepcional, e nenhuma era castrada até o momento da mastectomia. Já quanto à

sobrevida, todas (100%) tiveram mais de 24 meses, sendo que 30% apresentaram sobrevivida maior de 36 meses (TABELA 3).

4.1.2 Carcinomas com prognóstico bom

Os animais acometidos apresentaram uma média de 9,2 anos, com variação de 6 a 15 anos. Quanto ao tamanho do tumor, das dez cadelas deste grupo, quatro (40%) apresentaram nódulos < 3 cm, 20% entre 3 e 5 cm e 40% > 5 cm e três (30%) apresentaram ulceração do tumor. Até o último contato, em dezembro de 2006, seis (60%) das pacientes apresentavam-se com vida. Das dez cadelas avaliadas, seis (60%) gestaram pelo menos uma vez, oito (80%) nunca fizeram o uso de anticoncepcional, e nenhuma era castrada até o momento da mastectomia. Já quanto à sobrevivida, apenas duas (20%) viveram menos de 24 meses, cinco (50%) apresentaram sobrevivida de pelo menos 24 meses e três (30%) de pelo menos 36 meses (TABELA 3).

4.1.3 Carcinomas com prognóstico ruim

Os animais acometidos apresentaram uma média de 10,1 anos, com variação de 5 a 15 anos. Quanto ao tamanho do tumor, apenas duas (20%), das dez pacientes, apresentaram nódulos < 3 cm, 30% entre 3 e 5 cm e 50% > 5 cm e quatro cadelas (40%) apresentaram ulceração do tumor. Até o último contato, em dezembro de 2006, 90% das pacientes já haviam morrido. Das dez cadelas avaliadas, quatro (40%) gestaram pelo menos uma vez, sete (70%) nunca fizeram o uso de anticoncepcional, e nenhuma era castrada até o momento da mastectomia. Já quanto à sobrevivida, três (30%) dos animais tiveram sobrevivida de menos de 12 meses, quatro (40%) entre 12 e 24 meses e três (30%) entre 24 e 36 meses (TABELA 3).

TABELA 3 – Informações relativas ao histórico (gestação, anticoncepcional, pseudociese e ovariosalpingoisterectomia) e dados clínicos das cadelas com neoplasia mamária atendidas no Hospital Veterinário da UFPR, campus de Curitiba, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004.

| DADOS DA PACIENTE | | ADENOMA | CARCINOMA COM PROGNÓSTICO BOM | CARCINOMA COM PROGNÓSTICO RUIM |
|---|---------------------|-----------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Tamanho do tumor | < 3cm | 6 | 4 | 2 |
| | 3-5 cm | 3 | 2 | 3 |
| | > 5cm | 1 | 4 | 5 |
| | TOTAL | 10 | 10 | 10 |
| Ulceração | ulcerado | 1 | 3 | 4 |
| | não ulcerado | 9 | 7 | 6 |
| | TOTAL | 10 | 10 | 10 |
| Gestação | SIM | 3 | 6 | 4 |
| | NÃO | 7 | 3 | 3 |
| | não informado | 0 | 1 | 3 |
| | TOTAL | 10 | 10 | 10 |
| Anticoncepcional | SIM | 2 | 2 | 2 |
| | NÃO | 8 | 6 | 6 |
| | não informado | 0 | 2 | 2 |
| | TOTAL | 10 | 10 | 10 |
| Pseudociese | SIM | 6 | 5 | 3 |
| | NÃO | 4 | 5 | 7 |
| | TOTAL | 10 | 10 | 10 |
| Ovariosalpingo- isterectomia | SIM | 0 | 0 | 0 |
| | NÃO | 6 | 8 | 7 |
| | Durante mastectomia | 3 | 2 | 1 |
| | não informado | 1 | 0 | 2 |
| | TOTAL | 10 | 10 | 10 |
| Condição atual | VIVO | 8 | 6 | 1 |
| | MORTO | 2 | 4 | 9 |
| | TOTAL | 10 | 10 | 10 |
| Sobrevida geral | < 12 meses | 0 | 1 | 3 |
| | 13-24 meses | 3 | 2 | 4 |
| | 25-36 meses | 4 | 5 | 3 |
| | 37-48 meses | 2 | 2 | 0 |
| | > 49 meses | 1 | 0 | 0 |
| | não informado | 0 | 0 | 0 |
| | TOTAL | 10 | 10 | 10 |

A FIGURA 13 ilustra a distribuição dos grupos neoplásicos adenoma, carcinoma com prognóstico bom e carcinoma com prognóstico ruim de acordo com o tamanho do tumor e a FIGURA 14 a ocorrência de ulceração nestes mesmos grupos.

FIGURA 13 – Frequência das neoplasias mamárias conforme o tamanho do tumor, nos grupos estudados Adenoma, Carcinoma com prognóstico bom e Carcinoma com prognóstico ruim.

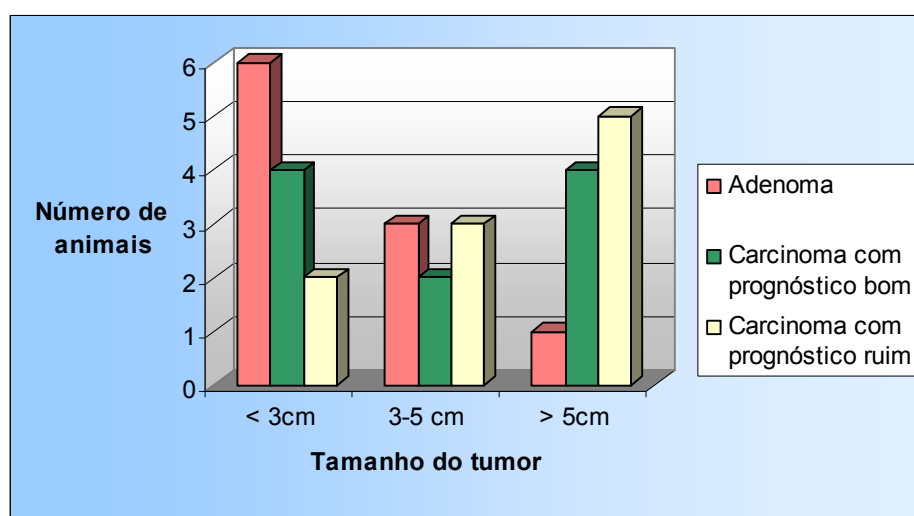
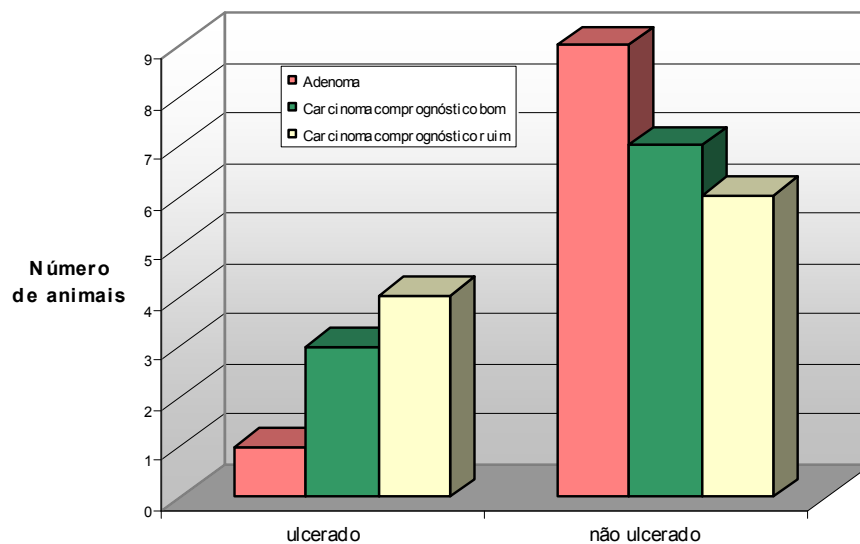


FIGURA 14 - Frequência da ocorrência de ulceração nos grupos estudados Adenoma, Carcinoma com prognóstico bom e Carcinoma com prognóstico ruim.



4.1.4 Carcinomas com metástase pulmonar e Carcinomas inflamatórios

Não foi possível determinar os dados de prevalência destes dois grupos devido à ausência de ficha clínica, pois estes animais foram encaminhados diretamente ao serviço de patologia para necropsia. Quanto ao estadiamento clínico, todas as pacientes ficaram com grau IV, uma vez que todas tinham metástase (MOULTON, 1990).

4.2 ESTADIAMENTO CLÍNICO

Os dados de estadiamento clínico estão apresentados de acordo com a classificação histopatológica e comportamento clínico das neoplasias. Seis animais (60%) do grupo adenoma (TABELA 4) apresentavam estágio clínico I, três animais (30%) estágio clínico II e um animal (10%) estágio clínico III. No grupo de carcinoma mamário com prognóstico bom (TABELA 5), quatro cadelas (40%) apresentavam estágio I, duas cadelas (20%) estágio II e quatro cadelas (40%) estágio III. Nos animais do grupo carcinoma mamário com prognóstico ruim (TABELA 6), dois pacientes (20%) receberam estágio I, dois pacientes (20%) estágio II, cinco pacientes (50%) estágio III e um paciente (10%) estágio IV.

TABELA 4 – Estágio clínico das cadelas portadoras de adenomas mamários seguindo o Sistema TNM (Tumor/ Linfonodo/ Metástase) proposto pela OMS (OWEN, 1980).

| Exame | Tamanho do tumor | Linfonodo | Metástase | Estágio clínico |
|--------------|-------------------------|------------------|------------------|------------------------|
| H05/02 | T1 | N0 | M0 | I |
| 03-1492 | T1 | N0 | M0 | I |
| H061/03 | T2 | N0 | M0 | II |
| H121/03 | T1 | N0 | M0 | I |
| H191/03 | T1 | N0 | M0 | I |
| H077/04 | T2 | N0 | M0 | II |
| H075/04 | T3 | N0 | M0 | III |
| H098/04 | T1 | N0 | M0 | I |
| H112/04 | T1 | N0 | M0 | I |
| H137/04 | T2 | N0 | M0 | II |

TABELA 5 – Estágio clínico das cadelas portadoras de carcinoma mamário com prognóstico bom seguindo o Sistema TNM (Tumor/ Linfonodo/ Metástase) proposto pela OMS (OWEN, 1980).

| Exame | Tamanho do tumor | Linfonodo | Metástase | Estágio clínico |
|--------------|-------------------------|------------------|------------------|------------------------|
| H223/02 | T3 | N0 | M0 | III |
| H256/02 | T3 | N0 | M0 | III |
| H179/03 | T1 | N0 | M0 | I |
| H167/03 | T1 | N0 | M0 | I |
| H013/04 | T2 | N0 | M0 | II |
| H059/04 | T2 | N0 | M0 | II |
| H81/04 | T1 | N0 | M0 | I |
| H095/04 | T3 | N0 | M0 | III |
| H111/04 | T3 | N0 | M0 | III |
| H128/04 | T1 | N0 | M0 | I |

TABELA 6 – Estágio clínico das cadelas portadoras de carcinoma mamário com prognóstico ruim seguindo o Sistema TNM (Tumor/ Linfonodo/ Metástase) proposto pela OMS (OWEN, 1980).

| Exame | Tamanho do tumor | Linfonodo | Metástases | Estágio clínico |
|--------------|-------------------------|------------------|-------------------|------------------------|
| 7436 | T2 | N1 | M0 | II |
| H169/03 | T3 | N0 | M0 | III |
| H-265 | T3 | N1 | M0 | III |
| H34/03 | T3 | N1 | M0 | III |
| H42/03 | T3 | N0 | M0 | III |
| H69/03 | T3 | N1 | M0 | III |
| H174/03 | T1 | N0 | M0 | I |
| H157/03 | T1 | N0 | M0 | I |
| 05-0652 | T2 | N1 | M1 | IV |
| H120/04 | T2 | N0 | M0 | II |

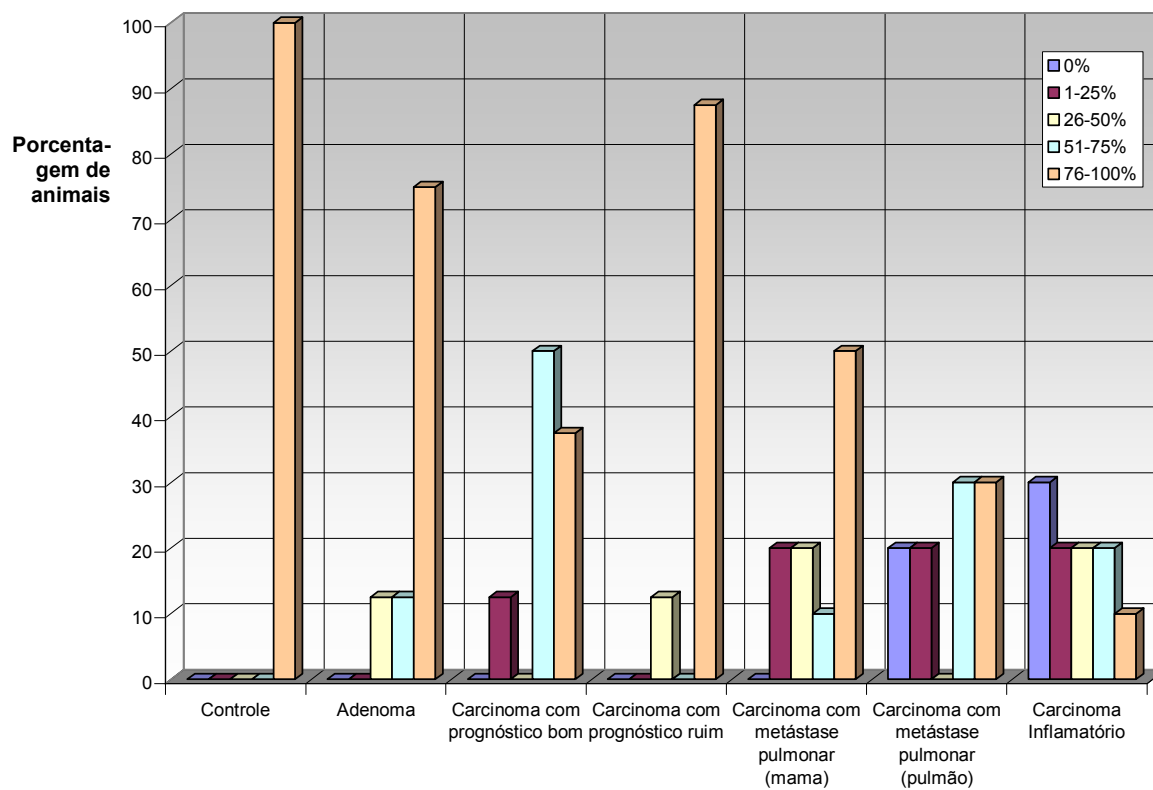
4.3 IMUNOISTOQUÍMICA

O resultado da avaliação imunoistoquímica de acordo com os grupos estudados e o grau de expressão da E-caderina está apresentado na TABELA 7. Para melhor apreciação da referida tabela, os dados estão apresentados também na FIGURA 15.

TABELA 7 – Porcentagem de expressão da E-caderina por categoria tumoral nas neoplasias mamárias de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da UFPR, campus de Curitiba, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004.

| Tipo histológico | Número de tumores | Número (e porcentagem) de tumores que apresentaram as diferentes expressões da E-caderina | | | | |
|--------------------------------|-------------------|---|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | 0% | 1-25% | 26-50% | 51-75% | 76-100% |
| Adenoma | 8 | 0 | 0 | 1 (12,5%) | 1 (12,5%) | 6 (75%) |
| Carcinoma com prognóstico bom | 8 | 0 | 1 (12,5%) | 0 | 4 (50%) | 3 (37,5%) |
| Carcinoma com prognóstico ruim | 8 | 0 | 0 | 1 (12,5%) | 0 | 7 (87,5%) |
| Carcinoma com metástase | 10 | 0 | 2 (20%) | 2 (20%) | 1 (10%) | 5 (50%) |
| pulmonar | 10 | 2 (20%) | 2 (20%) | 0 | 3 (30%) | 3 (30%) |
| Carcinoma inflamatório | 10 | 3 (30%) | 2 (20%) | 2 (20%) | 2 (20%) | 1 (10%) |
| Controle | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 (100%) |

FIGURA 15 – Grau de expressão da E-caderina, distribuída de acordo com os grupos estudados (Adenoma, Carcinoma com prognóstico bom, Carcinoma com prognóstico ruim, Carcinoma com metástase pulmonar – tecido mamário, Carcinoma com metástase pulmonar – tecido pulmonar, Carcinoma Inflamatório e Controle).



A avaliação da expressão da E-caderina de acordo as variáveis clínicas, não considerando os grupos histológicos, estão descritas na TABELA 8. Das pacientes portadoras de nódulos menores de 3 cm, 63% apresentaram expressão da E-caderina entre 76-100%, 60% dos nódulos que se apresentavam entre 3 e 5 cm e maiores que 5 cm expressaram entre 76-100%, estes dados podem ser melhor visualizados na FIGURA 16. Quanto à ulceração dos tumores, 75% dos nódulos que se apresentaram ulcerados expressaram a E-caderina entre 76-100%, enquanto 55% dos nódulos não

ulcerados expressaram esta porcentagem (FIGURA 17). Das pacientes que apresentaram sobrevida menor de 24 meses, 55% expressaram a E-caderina entre 76-100%. As 45% restantes tiveram expressão menor de 50%. No entanto, 65% dos animais que tiveram sobrevida maior de 24 meses expressaram entre 76-100%, em contrapartida apenas 5% apresentaram expressão menor de 50%, sendo que 30% apresentaram expressão entre 51-75%. De acordo com o grau histológico das neoplasias de cada animal, 80% das pacientes portadores de tumores de grau I expressaram entre 76-100%, esta mesma expressão foi observada em 33% dos tumores de grau II, em 60% dos de grau III e 33% dos de grau IV (FIGURA 18).

FIGURA 16 – Frequência do grau de expressão da E-caderina, distribuída de acordo com o tamanho das neoplasias dos grupos estudados (Adenoma, Carcinoma com prognóstico bom, Carcinoma com prognóstico ruim).

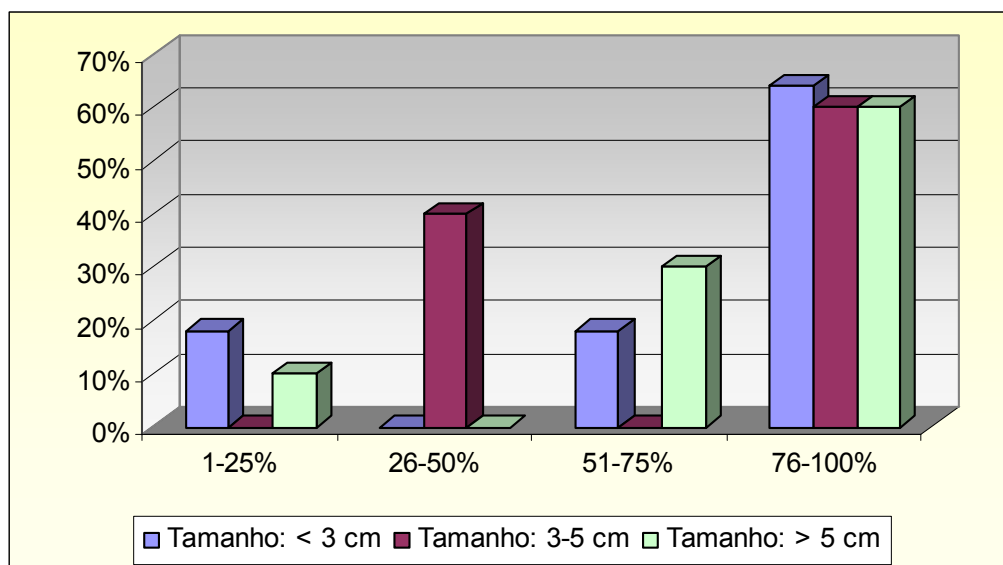


FIGURA 17 – Freqüência do grau de expressão da E-caderina, distribuída de acordo com a ocorrência de ulceração nas neoplasias dos grupos estudados (Adenoma, Carcinoma com prognóstico bom, Carcinoma com prognóstico ruim).

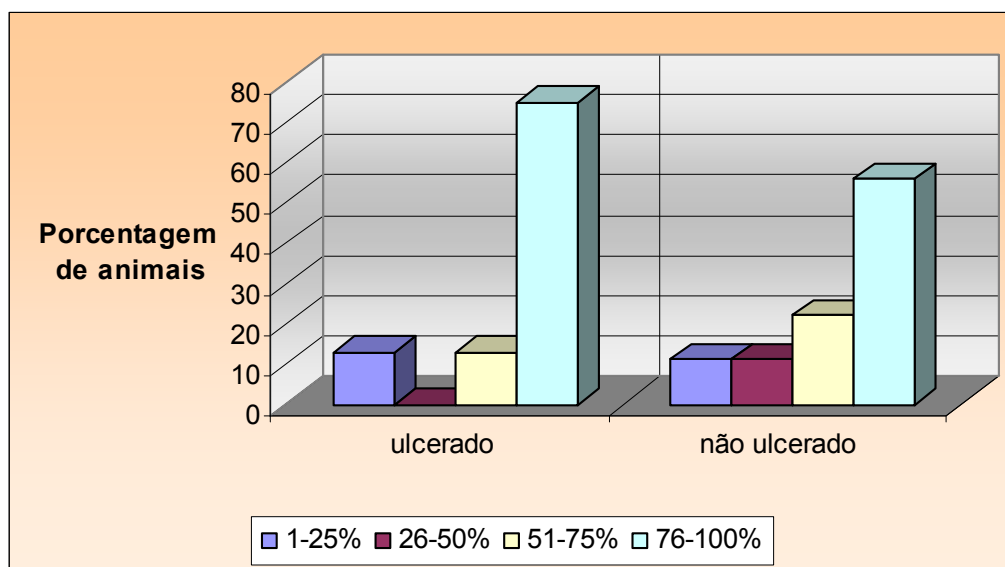


FIGURA 18 – Grau de expressão da E-caderina, distribuída de acordo com o grau da doença (TNM) neoplásica dos grupos estudados (Adenoma, Carcinoma com prognóstico bom, Carcinoma com prognóstico ruim, Carcinoma com metástase pulmonar – tecido mamário e tecido pulmonar e Carcinoma Inflamatório).

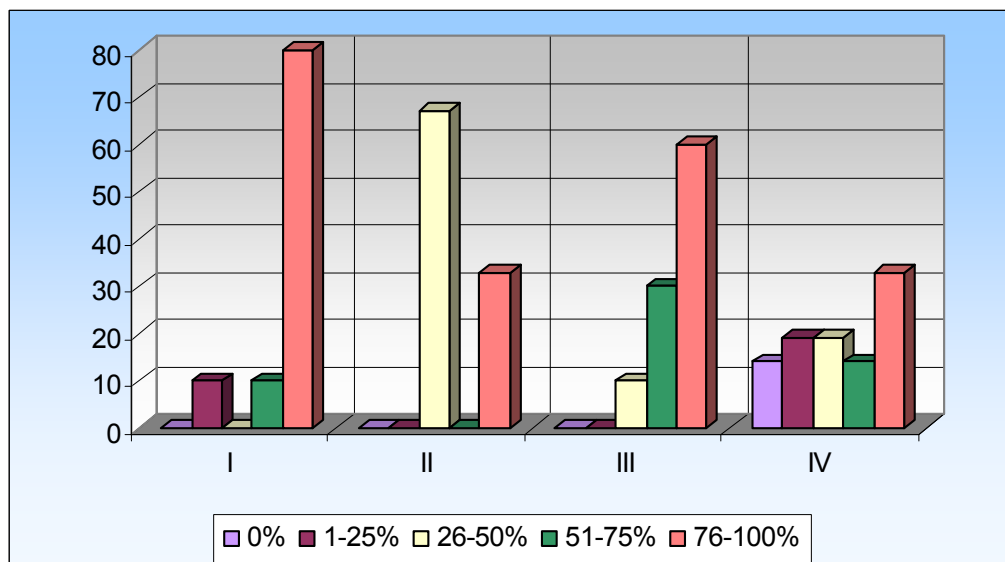


TABELA 8 – Expressão da E-caderina de acordo com as variáveis clínicas tamanho do tumor, ulceração e sobrevida dos grupos Adenoma, Carcinoma com prognóstico bom e Carcinoma com prognóstico ruim e estadiamento dos grupos Adenoma, Carcinoma com prognóstico bom, Carcinoma com prognóstico ruim, Carcinoma com metástase pulmonar e Carcinoma inflamatório.

| Variável clínica | Número de tumores | Número (e porcentagem) de tumores que apresentaram as diferentes expressões de E-caderina | | | | |
|-----------------------------|--------------------------|--|--------------|---------------|---------------|----------------|
| | | 0% | 1-25% | 26-50% | 51-75% | 76-100% |
| Tamanho (cm): | | | | | | |
| < 3 | 10 | 0 | 1 (10%) | 0 | 2 (20%) | 7 (70%) |
| 3-5 | 5 | 0 | 0 | 2 (40%) | 0 | 3 (60%) |
| > 5 | 9 | 0 | 0 | 0 | 3 (33%) | 6 (67%) |
| Ulceração: | | | | | | |
| Presente | 7 | 0 | 0 | 0 | 1 (14%) | 6 (86%) |
| Ausente | 17 | 0 | 1 (6%) | 2 (12%) | 4 (23%) | 10 (59%) |
| Sobrevida (meses): | | | | | | |
| até 12 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 (100%) |
| de 13 a 24 | 5 | 0 | 0 | 2 (40%) | 0 | 3 (60%) |
| pelo menos 24 | 11 | 0 | 1 (9%) | 0 | 2 (18%) | 8 (73%) |
| pelo menos 36 | 5 | 0 | 0 | 0 | 3 (60%) | 2 (40%) |
| pelo menos 48 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (100%) |
| Estadiamento (grau): | | | | | | |
| I | 10 | 0 | 1 (10%) | 0 | 1 (10%) | 8 (80%) |
| II | 3 | 0 | 0 | 2 (67%) | 0 | 1 (33%) |
| III | 10 | 0 | 0 | 1 (10%) | 3 (30%) | 6 (60%) |
| IV | 21 | 3 (14%) | 4 (19%) | 4 (19%) | 3 (14%) | 7 (33%) |

OBS. A expressão registrada nesta tabela do grupo Carcinoma com metástase pulmonar (de grau IV) foi referente apenas à expressão da E-caderina nos tumores mamários e não nos pulmonares.

Não foi possível obter resultado de dois animais dos grupos Adenoma, dois do Carcinoma com prognóstico bom e dois do Carcinoma com prognóstico ruim devido a problemas com a amostra tecidual.

Na TABELA 9 estão listados os resultados da expressão da E-caderina no grupo Adenoma relacionado às variáveis clínicas de cada paciente. A TABELA 10 demonstra os resultados da expressão da E-caderina no grupo Carcinoma com prognóstico bom. E a TABELA 11 os resultados da expressão da E-caderina no grupo Carcinoma com prognóstico ruim.

O resultado da expressão de cada animal dos grupos Carcinoma com metástase pulmonar e Carcinoma inflamatório estão registrados na TABELA 12 e TABELA 13, respectivamente.

TABELA 9 – Expressão da E-caderina nos Adenomas de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da UFPR, campus de Curitiba, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004.

| Dados do Animal | | | Dados do Tumor | | | | Marcação |
|-----------------|--------------|-------------------|----------------|-----------|----------|------|------------|
| Registro | Idade (anos) | Sobrevida (meses) | Tamanho (cm) | Ulceração | Recidiva | Grau | E-Caderina |
| H 112/04 | 13 | > 24 | < 3 | Não | Não | I | ++++ |
| H 121/03 | 10 | > 39 | < 3 | Não | Sim | I | +++ |
| H 137/04 | 7 | > 20 | 3-5 | Não | Não | II | ++ |
| H 61/03 | 4 | > 43 | 3-5 | Não | Não | II | ++++ |
| H 98/04 | 8 | > 24 | < 3 | Não | Sim | I | ++++ |
| H 75/04 | 8 | > 24 | > 5 | Sim | Não | III | ++++ |
| 3-1492 | 6 | 24 | < 3 | Não | Não | I | ++++ |
| H05/02 | 9 | > 55 | < 3 | Não | Não | I | ++++ |
| H 191/03 | 12 | 20 | < 3 | Não | Não | I | NR |
| H 77/04 | 5 | > 24 | 3-5 | Não | Sim | II | NR |

NR= não realizado

TABELA 10 – Expressão da E-caderina nos Carcinomas com prognóstico bom de tecido mamário de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da UFPR, campus de Curitiba, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004.

| Dados do Animal | | | Dados do Tumor | | | | Marcação |
|-----------------|--------------|-------------------|----------------|-----------|----------|------|------------|
| Registro | Idade (anos) | Sobrevida (meses) | Tamanho (cm) | Ulceração | Recidiva | Grau | E-Caderina |
| H 81/04 | 7 | > 24 | < 3 | Não | Não | I | + |
| H 256/02 | 12 | > 37 | > 5 | Sim | Não | III | +++ |
| H 179/03 | 8 | 20 | < 3 | Não | Não | I | ++++ |
| H 95/04 | 7 | > 24 | > 5 | Sim | Não | III | ++++ |
| H 111/04 | 9 | > 20 | > 5 | Não | Não | III | +++ |
| H 167/03 | 6 | 29 | 3-5 | Sim | Não | I | ++++ |
| H 013/04 | 6 | 30 | < 3 | Não | Não | II | +++ |
| H 223/02 | 9 | 38 | > 5 | Não | Não | III | +++ |
| H 59/04 | 13 | > 25 | 3-5 | Não | Não | II | NR |
| H 128/04 | 15 | 10 | < 3 | Não | Não | I | NR |

NR = não realizado

TABELA 11 – Expressão da E-caderina nos Carcinomas com prognóstico ruim de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da UFPR, campus de Curitiba, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004.

| Dados do Animal | | | Dados do Tumor | | | Marcação | |
|-----------------|--------------|-------------------|----------------|-----------|----------|----------|------------|
| Registro | Idade (anos) | Sobrevida (meses) | Tamanho (cm) | Ulceração | Recidiva | Grau | E-Caderina |
| 7436 | 13 | 14 | 3-5 | Não | | II | ++ |
| H 69/03 | 10 | 5 | > 5 | Sim | Sim | III | ++++ |
| H 265/02 | 15 | 36 | > 5 | Não | Não | III | ++++ |
| H 157/03 | 12 | 19 | < 3 | Não | Sim | I | ++++ |
| 05-0652 | 12 | 3 | 3-5 | Não | Não | IV | ++++ |
| H 174/03 | 11 | 14 | < 3 | Não | Sim | I | ++++ |
| H 34/03 | 5 | 28 | > 5 | Sim | Sim | III | ++++ |
| H 169/03 | 7 | 32 | > 5 | Sim | Sim | III | ++++ |
| H 120/04 | 6 | > 22 | 3-5 | Sim | Sim | II | NR |
| H 42/03 | 10 | 6 | > 5 | Sim | Sim | III | NR |

NR = não realizado

TABELA 12 – Expressão da E-caderina nos Carcinomas com metástase pulmonar de cadelas recebidas pelo Serviço de Patologia Veterinária do Hospital Veterinário da UFPR, campus de Curitiba.

| Registro | Tecido | Grau | Marcação |
|-----------------|---------------|-------------|-----------------|
| 19.240 | Mamas | IV | ++++ |
| 19.240 | Pulmão | IV | +++ |
| 6923 | Mama | IV | ++++ |
| 6923 | Pulmão | IV | ++++ |
| 7728 | Mama | IV | +++ |
| 7728 | Pulmão | IV | + |
| 6747 | Mama | IV | ++++ |
| 6747 | Pulmão | IV | + |
| H 291/02 | Mama | IV | + |
| H 291/02 | Pulmão | IV | - |
| 7067 | Mama | IV | ++ |
| 7067 | Pulmão | IV | +++ |
| 18.201 | Mama | IV | ++++ |
| 18.201 | Pulmão | IV | ++++ |
| 24.041 | Mama | IV | ++++ |
| 24.041 | Pulmão | IV | ++++ |
| 21.256 | Mama | IV | + |
| 21.256 | Pulmão | IV | +++ |
| 20.474 | Mama | IV | ++ |
| 20.474 | Pulmão | IV | - |

TABELA 13 – Expressão da E-caderina nos Carcinomas Inflamatórios de cadelas recebidas pelo Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus de Botucatu.

| Registro | Tecido | Grau | Marcação |
|-----------------|---------------|-------------|-----------------|
| E 10.043 | Mama | IV | + |
| PV 30.712 | Mama | IV | - |
| E 6347 | Mama | IV | ++ |
| E 6479 | Mama | IV | - |
| E 9216 | Mama | IV | + |
| E 7053 | Mama | IV | - |
| E 10.365 | Mama | IV | ++++ |
| E 9761 | Mama | IV | +++ |
| E 11.323 | Mama | IV | +++ |
| E 10.516 | Mama | IV | ++ |

5 DISCUSSÃO

As cadelas portadoras de neoplasias mamárias que prevaleceram neste estudo eram sem raça definida (SRD), correspondendo a 40% dos animais. As raças Poodle e Pastor Alemão corresponderam a 20% e 10%, respectivamente, dos animais estudados. Estes dados são semelhantes aos de RUTTEMAN *et al.* (2001) que indicaram o Poodle, o Pastor Alemão, o Cocker Spaniel e o sem raça definida como as raças mais acometidas pelas neoplasias mamárias. Porém, a variação que ocorre no Brasil, do grande número de animais sem raça definida, provavelmente se deve à existência de um grande número de cadelas SRD não submetidas à ovariosalpingoisterectomia, o que pode diferenciá-lo dos dados de outros países. Pois como é sabido, o risco de ocorrência de neoplasias malignas em cadelas castradas antes do primeiro estro é praticamente nulo (RUTTEMAN *et al.*, 2001).

A média de idade das cadelas acometidas pelas neoplasias mamárias encontrada foi de 9,1 anos, com uma variação entre 4 e 15 anos, correspondendo aos dados citados na literatura que refere uma média de 10 anos, com rara ocorrência em cadelas com menos de 4 anos (RUTTEMAN *et al.* 2001).

Foi observada, neste estudo, uma tendência de relação direta do tamanho do tumor com o seu grau de malignidade (ANEXO 3). Um maior número de pacientes com neoplasias benignas (adenomas) apresentou tumores menores de três centímetros comparando-se às neoplasias malignas (carcinomas), portanto, como relataram KURZMAN e GILBERTSON (1986), MISDORP (2002) e SORENMO (2003), o

tamanho do tumor é um fator de prognóstico importante na avaliação das neoplasias mamárias.

A presença de ulceração tumoral, também associada à malignidade da neoplasia (MISDORP, 2002), foi observada no presente estudo, com uma maior ocorrência nos carcinomas com bom prognóstico (30%) e nos carcinomas com mau prognóstico (40%), sendo notado ainda uma nítida relação entre ulceração e tamanho tumoral, uma vez que apenas as neoplasias maiores de 3 cm apresentaram ulceração e 77% desses eram maiores que 5 cm. Mas a ulceração pode estar relacionada a fatores como, isquemia da pele, traumatismo local ou infecção, sendo, portanto, difícil de associá-la individualmente à malignidade do tumor (RUTTEMAN *et al.*, 2001).

Outro dado avaliado neste estudo foi com relação à ocorrência de gestação, antes da cirurgia das pacientes acometidas pelas neoplasias mamárias. Dentre as portadoras de adenoma, 70% nunca tiveram filhotes. Enquanto, das portadoras de carcinoma com prognóstico bom e carcinoma com prognóstico ruim, esses valores foram, respectivamente, 40% e 60%. A partir desses dados pode-se presumir que as cadelas que não tiveram filhotes talvez tenham maior probabilidade de desenvolver neoplasias benignas do que as que já gestaram, porém não se pode fazer a mesma correlação às malignas, que parecem não ter relação com a nuliparidade da cadela. Deste modo há concordância com os resultados encontrados por TAYLOR *et al.* (1976), que afirmaram não haver qualquer modificação na incidência de neoplasias malignas em cadelas nulíparas, apesar destes autores não terem relacionado a ocorrência de gestação ao desenvolvimento de neoplasias benignas.

Não foi encontrada relação do uso de anticoncepcional (hormônio) com o desenvolvimento das neoplasias, já demonstrado anteriormente por outros autores

(RUTTEMAN *et al.*, 2001; MISDORP, 2002). Dos três grupos avaliados no presente estudo (Adenoma, Carcinoma com prognóstico bom e Carcinoma com prognóstico ruim), cerca de 70 a 80% das pacientes nunca havia sido submetidas a este tratamento.

Das pacientes estudadas, nenhuma havia sofrido ovariosalpingoisterectomia previamente ao surgimento da neoplasia, sendo, portanto, possível sustentar a idéia de que a não realização deste procedimento precocemente nas cadelas criadas no Brasil, é um importante fator do grande número de neoplasias mamárias aqui encontradas (RUTTEMAN *et al.*, 2001; MISDORP, 2002).

Analisando-se os resultados é plausível afirmar, que o estudo histológico da neoplasia é um grande fator de prognóstico como MISDORP (2002) e SORENMO (2003) relataram, uma vez que 100% das pacientes, que apresentaram neoplasia benigna (adenoma), tiveram sobrevida maior de 24 meses. Dentre as pacientes que apresentaram carcinoma com prognóstico bom, 80% viveram mais de 24 meses e das que apresentaram carcinoma com prognóstico ruim apenas 30% sobreviveram mais que 24 meses.

O estadiamento dos tumores mamários realizados de acordo como sistema TNM (Tumor/Linfonodo/Metástase) proposto pela Organização Mundial de Saúde (OWEN, 1980) foi fundamental para avaliar, neste estudo, a possibilidade de progressão do tumor para os principais locais de ocorrência de metástases, como os linfonodos ou pulmão, portanto, foi importante para determinar a malignidade dos tumores estudados (KITCHELL, 1995). Os tumores mamários possuem apresentações variadas, podendo ser móveis ou fixos, terem aspecto sólido, cístico ou ainda terem como característica, extrema rapidez de crescimento e invasão, como nos casos de carcinomas inflamatórios (RUTTEMAN *et al.*, 2001; WEIGELT *et al.*, 2005). No grupo dos

Adenomas, mais da metade das neoplasias eram de grau I (que tem um melhor prognóstico), e apenas 10% de grau III. Já no grupo Carcinoma com prognóstico bom, pouco menos da metade era de grau I e 40% de grau III. Enquanto no grupo Carcinoma com prognóstico ruim apenas 20% apresentou grau I, 50% grau III e ainda 10% grau IV. Para completar, 100% dos Carcinomas com metástase pulmonar e Carcinomas Inflamatórios eram de grau IV (o de pior prognóstico). Observando estes resultados, fica evidente a relação direta do grau do tumor com o grau de malignidade, o que mostra que o grau do tumor pode ser utilizado como um avaliador do prognóstico (POWERS, 2001; MISDORP, 2002).

No presente estudo, as cinco amostras de tecido mamário normal (ausência de neoplasia) do grupo controle apresentaram expressão de E-caderina entre 76-100%. Baseando-se nisso, todos os animais pesquisados que apresentaram essa marcação foram considerados com expressão “normal”.

Neste estudo 75% das pacientes portadoras de neoplasias benignas (adenoma) apresentaram expressão normal, e nenhuma expressou menos de 25%, indicando uma tendência de se manter a expressão da proteína nas neoplasias benignas. Apesar de não ter sido encontrado estudos avaliando a expressão de E-caderinas nos adenomas, BRUNETTI *et al.* (2003) e MATOS *et al.* (2006) relataram correlação na manutenção da ocorrência da E-caderina nos carcinomas de menor malignidade, sugerindo uma manutenção da marcação nas neoplasias de melhor prognóstico.

No geral, foi observada uma evidente variação da expressão da E-caderina nos diferentes grupos divididos de acordo com o tipo histológico e a característica clínica, mostrando que esta expressão parece estar relacionada às diferentes variações histológicas do tumor. Assim sendo, 37,5% das pacientes com carcinoma de bom

prognóstico apresentaram expressão normal, 50% expressaram entre 51-75% (mediana) e 12,5% entre 1-25% (muito baixa). Já entre as pacientes portadoras de carcinoma com prognóstico ruim, 87,5% apresentaram expressão normal e 12,5% entre 26-50% (baixa). Em estudo semelhante realizado por MATOS *et al.*, 2006, 100% dos carcinomas de maior malignidade (como o carcinoma anaplásico) apresentaram a menor expressão (<25%) enquanto 100% dos menos malignos (carcinoma in situ) apresentaram a maior expressão da E-caderinas (>75%), apesar disso, tipos de carcinomas de malignidade intermediária mostraram expressões variáveis desta proteína. A partir desses resultados observamos uma grande diferença de expressão dentro do grupo que engloba todos os carcinomas. Talvez a dinâmica que ocorra na expressão da E-caderina possa ser maior em neoplasias de maior agressividade, o que justificaria a constatação de menos marcações nos grupos de carcinoma com metástase pulmonar e carcinoma inflamatório ao mesmo tempo em que foi constatada a ocorrência de tecidos fortemente marcados nestes mesmos grupos. Em trabalho com neoplasias mamárias de mulheres, QUERESHI *et al.*, (2006) também constataram uma significativa diferença na expressão da E-caderina nos diferentes tipos histológicos de carcinomas, uma vez que carcinomas ductais invasivos apresentaram em 97% dos casos expressão alta, enquanto dos carcinomas lobulares invasivos apenas 4% teve esta mesma expressão. Porém, esta classificação de carcinomas lobulares e ductais não é utilizada em medicina veterinária.

No presente estudo, 30% das pacientes portadoras de carcinoma com metástase pulmonar apresentaram a mesma expressão dos nódulos primário e metastático (pulmão), sugerindo que ocorram alterações dinâmicas e reversíveis na expressão da E-caderina durante a progressão do carcinoma. Isto parece compatível com a idéia de

BRUNETTI *et al.*, (2003) e COWIN *et al.*, (2005) de que a expressão reduzida favoreceria a disseminação, e a expressão recuperada a sobrevivência e reunião das células metastáticas. Deve-se levar em consideração ainda, conforme postulam KNUDSEN e WHEELLOCK (2005), que a imunomarcagem da E-caderina, pelo método de imunohistoquímica, representa um segmento do tumor em um dado momento, sendo possível que a diminuição temporária ou localizada da E-caderina promova separação de células da neoplasia primária e invasão para locais próximos. Segundo estes mesmos autores, a re-expressão de E-caderina pelas células tumorais em um novo ambiente também parece promover a sobrevivência dessas células nos vasos sanguíneos ou no sistema linfático, quando são carreadas para um local distante.

Como observado no presente estudo ocorre uma expressão normal da E-caderina também nos carcinomas inflamatórios, porém a maioria apresenta redução da marcação. Esta diferença da expressão também ocorre muitas vezes nas metástases (KOWALSKI *et al.*, 2003), mas, considerando que a maioria expressa esta caderina reduzida, correlaciona-se a diminuição com um período livre de metástase menor e um prognóstico pior para os pacientes que apresentam ausência de expressão nos linfonodos com metástases (KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005).

A expressão da E-caderina apresentou-se alta (>75%) em 70% dos animais em grupos com nódulos menores de 3 cm, em 60% dos com 3-5 cm e em 67% dos com nódulos maiores de 5 cm. Em estudo semelhante, esta expressão aconteceu em 56%, 60% e 30% dos tumores menores que 3 cm, 3-5 cm e maiores que 5 cm, respectivamente (MATOS *et al.*, 2006). Embora haja resultados semelhantes nos dois primeiros grupos entre o estudo destes autores e o presente, observou-se uma diferença marcante nos tumores maiores que 5 cm (30% e 67%, respectivamente).

Assim sendo, não foi observada relação importante da expressão da E-caderina com o tamanho do tumor, como o observado por estes autores. A causa desta discrepância pode ser creditada ao número reduzido de amostras, variabilidade nos tipos dos carcinomas, e ainda a inclusão de Adenomas neste estudo.

A presença de alta expressão (>75%) de E-caderina foi detectada em 85,7% e 59,0% dos nódulos mamários com e sem ulceração, respectivamente. Contrastando com estes resultados, estudo semelhante de MATOS *et al.*, (2006) demonstrou uma alta expressão de E-caderinas nos nódulos com e sem ulceração de 54,0% e 22,0%, respectivamente. Entre as causas de disparidade nos resultados, pode-se supor os diferentes cuidados que os cães são submetidos nos diversos grupos de animais estudados nas diferentes regiões e países, visto que a ocorrência de ulceração pode estar relacionada a diversos fatores de cuidado e manejo como traumatismo ou infecção.

Avaliando-se a expressão da E-caderina em relação somente à sobrevida das pacientes, observou-se expressão normal da E-caderina em 71% dos animais que tiveram sobrevida menor de 24 meses e em 65% das que sobreviveram por mais de 24 meses. Porém, em apenas 6% dos animais que viveram mais de 24 meses foi observado expressão menor que 50%, enquanto das que viveram menos de 24 meses, 29% expressaram menos de 50%. Em geral, apesar da expressão da E-caderina estar relacionada inversamente ao grau histológico e, conseqüentemente, com a diferenciação, sua expressão não está bem relacionada com a sobrevida (BRUNETTI *et al.* 2005; KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005). Os animais que apresentaram baixa expressão da molécula tiveram menor sobrevida, porém uma expressão normal não indicou uma maior sobrevida para a paciente. Portanto, a baixa expressão da E-

caderina pode ser um indicativo de baixa sobrevida, mas a expressão normal não é indicativa de sobrevida maior, uma vez que diversos fatores como acidentes e doenças não relacionadas podem interferir neste dado. Contudo, com base no presente estudo, a sobrevida e a expressão da E-caderina não devem ser avaliadas separadamente.

De acordo com o grau de estadiamento clínico foi observada uma significativa diferença entre as expressões, sendo que 80% das pacientes de grau I tiveram a expressão normal da E-caderina e apenas 10% apresentaram expressão muito baixa (1-25%). Já em relação às portadoras de grau II, apenas 33% expressaram a proteína normalmente, as outras 67% tiveram expressão baixa (26-50%). Portanto é nítido que existe uma diferença entre as expressões de E-caderina e o grau da doença nestas duas graduações. Em contrapartida, dentre os animais com o grau III da doença, 60% apresentaram expressão normal, 30% mediana (51-75%) e apenas 10% baixa (26-50%). O grupo de grau IV (considerado o grau de pior prognóstico) apresentou uma maior distribuição dentre as expressões e, diferentemente dos outros grupos, 19% tiveram expressão muito baixa (1-25%) e ainda 14% não expressaram a E-caderina, sendo que, destes últimos, todos eram portadores de Carcinoma Inflamatório. Portanto, a expressão da E-caderina parece variar de acordo com o grau da doença, uma vez que o grau estabelecido pelo estadiamento clínico se baseia em diversos fatores de prognóstico, como o tamanho do tumor, presença de metástase em linfonodos e a existência de metástase à distância, dados que não foram citados por outros autores desta mesma forma.

Observando-se a grande dinâmica na alteração da expressão da E-caderina e comparando-a separadamente com variáveis de prognóstico, percebe-se que esta proteína não deve ser utilizada como um fator de prognóstico independente, mas pode

ser sim um marcador no qual a sua ausência indica maior malignidade da neoplasia principalmente correlacionando-a aos Carcinomas Inflamatórios.

Apesar de no presente estudo terem sido selecionados apenas pacientes que não foram tratados com quimioterapia, é conveniente ressaltar que a determinação de melhores marcadores de diagnóstico e prognóstico, genes ou proteínas, parecem necessários para determinação precisa dos resultados clínicos, e garantir que estes pacientes não sejam tratados com sub ou sobredoses de quimioterápicos ou outros tratamentos (KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005).

Finalmente, a interação entre os patologistas veterinários e clínicos cirurgiões foi fundamental no estabelecimento da conduta terapêutica e na determinação do prognóstico e do diagnóstico das neoplasias no presente estudo, pois desta interação surgiram informações mais exatas sobre o diagnóstico para os clínicos que determinaram o prognóstico e tratamento mais adequados. Os clínicos, conforme preconiza POWERS (2001), necessitam de conhecimentos de patologia dos tumores para entenderem as condições neoplásicas e as limitações das avaliações histopatológicas no diagnóstico e prognóstico das neoplasias.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

1. Existe uma relação direta da expressão da E-caderina com o tipo histológico e a característica clínica do tumor, com menor expressão observada, na maioria dos casos, com a maior malignidade;
2. A redução na expressão da E-caderina deve ser considerada de forma dinâmica, uma vez que em tumores com alta capacidade de provocar metástases, como o carcinoma inflamatório, foi observada também a ocorrência de elevada expressão nos tecidos;
3. As variedades de carcinomas devem ser estudadas separadamente, uma vez que existe uma grande diferença do grau de malignidade dentro do grupo;
4. A E-caderina é uma molécula cuja ausência pode ser relacionada à malignidade da neoplasia e ao prognóstico (ocorrência de metástase), porém não deve ser utilizada na determinação do prognóstico separadamente, e sim, associada a outros fatores, principalmente, ao tipo histológico do tumor e graduação da doença.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Com os resultados e conclusões obtidos neste primeiro estudo de moléculas de adesão celular associadas às neoplasias, pudemos observar vários caminhos a se trilhar futuramente, entre eles:

1. A realização de estudo prospectivo com tumores mamários em cadelas, de modo a se trabalhar com um maior número de casos, e amostras mais recentes, menos sujeitas à degradação;
2. Estudar os diferentes tipos histológicos dos Carcinomas separadamente para uma melhor determinação da associação da E-caderina ao potencial de malignidade do tumor;
3. Associar a este estudo a imunistoquímica de outros marcadores tumorais;
4. Procurar avaliar a relação da terapêutica instalada com o grau de adesão celular dos tumores frente ao tratamento (recidivas e resistência).

8 REFERÊNCIAS

BERX, G.; VAN ROY, F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. **Breast Cancer Research**, v. 3, p. 289-293, 2001.

BIRCHARD, S. J. Definitive surgical treatment for cancer. **Kirk's Current Veterinary Therapy XII Small Animal Practice**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995, p. 462-464.

BOUSSADIA O.; KUTSCH S.; HIERHOLZER, A.; DELMAS, V.; KEMLER, R. E-cadherin is a survival factor for the lactating mouse mammary gland. **Mechanisms of Development**, v. 115, p. 53-62, 2002.

BRUNETTI, B.; SARLI, G.; PREZIOSI, R.; LEPROTTI, S.; BENAZZI, C. E-cadherin expression in canine mammary carcinomas with regional lymph node metastases. **Journal of Veterinary Medicine. Series A**, v. 50, p. 496-500, 2003.

BRUNETTI, B.; SARLI, G.; PREZIOSI, R.; MONARI, I.; BENAZZI, C. E-cadherin and β -catenin reduction influence invasion but not proliferation and survival in canine malignant mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 42, p. 781-787, 2005.

BUSSEMAKERS, M.J.G.; SCHALKEN, J.A. The role of cell adhesion molecules and proteases in tumor invasion and metastasis. **World Journal of Urology**, v.14, p.151-156, 1996.

CAVALCANTI, M.F.; CASSALI, G.D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas – revisão. **Clínica Veterinária**, Ano XI, n. 61, março/abril, p. 56-64, 2006.

CAVALLARO, U.; SCHAFFHAUSER, B.; CHRSTOFORI, G. Cadherins and the tumor progression: Is it all in a switch? **Cancer Letters**, v. 176, p. 123-128, 2002.

CHARAFE-JAUFFRET, E.; TARPIN, C.; BARDOU, V.J.; BERTUCCI, F.; GINESTIER, C.; BRAUD, A.C.; PUIG, B.; GENEIX, J.; HASSOUN, J.; BIRNBAUM, D.; JACQUEMIER, J.; VIENS, P. Immunophenotypic analysis of inflammatory breast cancers: identification of an "inflammatory signature". **Journal of Pathology**, v. 202, p. 265-273, 2004.

CHARPIN, C.; GARCIA, S.; BOUVIER, C.; DEVICTOR, B.; ANDRAC, L.; CHOUX, R.; LAVAUT, M. E-cadherin quantitative immunocytochemical assays in breast carcinomas. **Journal of Pathology**, v. 181, p. 294-300, 1997.

COWIN, P.; ROWLANDS T.M.; HATSELL, S.J. Cadherins and catenins in breast cancer. **Current opinion in cell biology**. v. 17, p. 499-508, 2005.

CULLEN, J.M.; PAGE, R.; MISDORP, W. An overview of cancer pathogenesis, diagnosis, and management . In: MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animal**. 4.ed. Iowa: Iowa State Press, p. 03-44, 2002.

DANIEL C.; STRICKLAND, P.; FRIEDMANN Y. Expression and functional role of E- and P-cadherins in mouse mammary ductal morphogenesis and growth. **Developmental Biology**, v. 169, p. 511-551, 1995.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 289-91.

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. **Journal of Pathology**, v. 193, p. 433-441, 2001.

GURIEC, N.; MARCELLIN, L.; GAIRARD, B.; CALDÉROLI, H.; WILK, A.; RENAUD, R.; BERGERAT, J.P.; OBERLING, F. E-cadherin mRNA expression in breast carcinomas

correlates with overall and disease-free survival. **Invasion and Metastasis**, v.16, p. 19-26, 1996.

GUPTA, A.; DESHPANDE, C.G.; BADVE, S. Role of E-cadherins in development of lymphatic tumor emboli. **Cancer**, v. 97, p. 2341-2347, 2003.

HATSELL, R.; ROWLANDS, T.R.; HIREMATH, M.; COWIN, P. The role of β -catenin and Tcfs in mammary development and neoplasia. **Journal of Mammary Gland Biology and Cancer**, v. 8, p. 143-156, 2003.

HEIMANN, T.; LAN, F.S.; MCBRIDE, R.; HELLMAN, S. Separating favorable from unfavorable prognostic markers in breast cancer: the role of E-cadherin. **Cancer Research**, v. 60, p. 298-304, 2000.

KANDIOLER-ECKERSBERGER, D.; LUDWIG, C.; RUDAS, M.; KAPPEL, S.; JANSCHKE, E.; WENZEL, C.; SCHLAGBAUER-WAKL, H.; MITTLBÖCK, M.; GNANT, M.; STEGER, G.; JAKESZ, R. TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 1, p. 50-56, 2000.

KITCHELL, B. E. Mammary tumors. **Kirk's Current Veterinary Therapy XII Small Animal Practice**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, p. 1098-1103, 1995.

KNUDSEN K.A.; WHEELLOCK, M.J. Cadherins and the mammary gland. **Journal of cellular Biochemistry**, v. 95, p. 488-496, 2005.

KOWALSKI, P.J.; RUBIN, M.A.; KLEER, C.G. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. **Breast Cancer Research**, v. 5, p. R217-R222, 2003.

KURZMAN, I.D.; GILBERTSON, S.D. Prognostic factors in canine mammary tumors. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v. 1, p. 25-32, 1986.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Molecular Cell Biology**, 4th ed., W.H. Freeman and Company, New York, 1184 pp., 2000.

MAEDA, M.; JOHNSON K.R.; WHEELLOCK, M.J. Cadherin switching: Essencial for behavioral but not morphological changes in epithelial to mesenchymal transition. **Journal of Cell Science**, v. 118, p. 873-887, 2005.

MATOS, A.J.F.; LOPES, C.; CARVALHEIRA, J.; SANTOS, M.; RUTTEMAN, G.R.; GÄRTNER, F. E-cadherin expression in canine malignant mammary tumours: relationship to other clinico-pathological variables. **Journal of Comparative Pathology**. v. 134; p. 182-189, 2006.

MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMÉN, E. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. **Armed Forces Institute of Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1-59, 1999.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animal**. 4.ed. Iowa: Iowa State Press, p. 575-606, 2002.

MOTA, E. F. F.; OLIVEIRA, S. R. Diagnóstico citológico em medicina veterinária. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**, n. 30, v. 1, p. 29-47, 1999.

MOULTON, J. E. Tumors of the mammary gland. In: MOULTON, J. E. **Tumors in Domestic Animals**. 3^a ed. Los Angeles: University of California Press, 1990. cap. 12, p. 518-52.

NIEMAN, M.T.; PRUDOFF, R.S.; JOHNSON, K.R.; WHEELLOCK, M.J. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. **The Journal of Cell Biology**, v. 147, p. 631-643, 1999.

OWEN, L. M. TNM Classification of tumors in domestic animals. **World Health Organization**, Geneva, p. 26-32, 1980.

PARKER, C.; RAMPAUL, R.S.; PINDER, S.E.; BELL, J.A.; WENCYK, P.M.; BLAMEY, R.W.; NICHOLSON, R.I.; ROBERTSON, J.F. E-cadherin as a prognostic indicator in primary breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 85, p. 1958-1963, 2001.

PHILIBERT, J. C.; SNYDER, P. W.; GLICKMAN, N. Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 1, p. 102-106, 2003.

PITELKA, D.R.; HAMAMOTO, S.T.; DUAFALA, J.G. NEMANIC, M.K. Cell contacts in the mouse mammary gland. **The Journal of Cell Biology**, v. 56, p. 797-818, 1973.

POWERS, B.E. The Pathology of Neoplasia. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN E.G. **Small Animal Clinical Oncology**. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 4-17, 2001.

QUERESHI, H.S.; LINDEN, M.D.; DIVINE, G.; RAJU, U.B. E-cadherin status in breast cancer correlatos with histologic but does not correlate with established prognostic parameters. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 125, p. 377-385.

RADICE, G.; FERREIRA-CORNWALL, C.; ROBINSON, S.D.; RAYBURN H.; CHODOSH, L.A.; TAKEICHI, M.; HYNES, R.O. Precocious mammary gland development in P-cadherin-deficient mice. **The Journal of Cell Biology**, v. 139, p. 1025-1032, 1997.

RADICE, G.L.; SAUER, C.L.; KOSTETSKII, I.; PERALTA SOLER, A.; KNUDSEN, K.A. Inappropriate P-cadherin expression in the mouse mammary epithelium is compatible with normal mammary gland function. **Differrentiation**. v. 71, p. 361-373, 2003.

REIS, A.L.; CARVALHEIRA, J.; SCHMITT, F.C.; GÄRTNER, F. Immunohistochemical study of the expression of E-cadherin in canine mammary tumours. **Veterinary Record**, v. 152, p. 621-624, 2003.

RESTUCCI, B.; PAPPARELLA, S.; DE VICO, G.; MAIOLINO, P. E-cadherin expression in normal and neoplastic canine mammary gland. **Journal of Comparative Pathology**, v. 116, p. 191-202, 1997.

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

RUNSWICK, S.K.; O'HARE, M.J.; JONES, L.; STREULI, C.H.; GARROD, D.R. Desmosomal adhesion regulates epithelial morphogenesis and cell positioning. **Nature Cell Biology**, v. 3, p. 823-830, 2001.

RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Tumors of the mammary gland**. In: Small Animal Clinical Oncology, 3rd edit, WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. W.B. Saunders Company, Philadelphia, p. 455-477, 2001.

SILVERMAN, J.F. Breast. In: BIBBO, M. (Ed.) **Comprehensive cytopathology**, 2.ed., Philadelphia: W.B Saunders, 1997. p.731-780.

SOLER, A.P.; RUSSO, J.; RUSSO, I.H.; KNUDSEN, K.A. Soluble fragment of P-cadherin adhesion protein found in human milk. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 85, p. 180-184, 2002.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 33, p. 573-596, 2003.

TAKEICHI, M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. **Science**, v. 251, p. 1451-1455, 1991.

TAN, D.S.P.; POTTS, H.W.W.; LEONG, A.C.K.; GILLETT, 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. **Journal of Pathology**, v. 189, p. 20-27, 1999.

TAYLOR, G.N.; SHABESTARI, L.; WILLIAMS, J.; MAYS, C.W.; ANGUS, W.; MCFARLAND, S. Mammary neoplasia in a closed beagle colony. **Cancer Research**, v. 36, p. 2740-2743, 1976.

TOYOSHIMA, H., HUNTER, T. P27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. **Cell**, v. 78, n. 1, p. 67-74, 1994.

VAN DER WURFF, A.A.M.; ARENDS, W.; VAN DER LINDEN, E.P.M. KATE, J.T.; BOSMAN, F.T. L-CAM expression in lymph node and liver metastases of colorectal carcinomas. **Journal of Pathology**, v. 172, p. 177-182, 1994.

WEIGELT, B.; PETERSE, J.L.; VAN'T VEER, L.J. Breast cancer metastasis: Markers and modelis. Review. **Nature Reviews. Cancer**, v. 5, n. 8, p. 591-602, 2005.

YOSHIDA, R.; KIMURA, N.; HARADA, Y.; OHUCHI, N. The loss of E-cadherin, α - and β -catenin expression is associated with metastasis and poor prognosis in invasive breast cancer. **International Journal of Oncology**, v. 18, p. 513-520, 2001.

ZUCCARI, D. A. P. C. **Estudo imunocitoquímico de marcadores diagnósticos e prognósticos em neoplasias mamárias caninas**. 2001. 92p. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO 1

FICHA DE ESTADIAMENTO CLÍNICO

Paciente: _____ RG: _____ / _____ Data: ____ / ____ / ____

Idade: _____ Peso: _____ Raça: _____

Proprietário: _____ Fone: _____

Alimentação: _____

Mastectomia anterior: () Não () Sim. Quantas: _____

Gestações: () Não () Sim

Pseudogestação: () Não () Sim

Quantas: _____

Quantas: _____

Aborto: () Não () Sim

Castrada: () Não () Sim

Quantos: _____

Em qual idade: _____

Anticoncepcional: () Não () Sim

Cios regulares: () Não () Sim

Quantas vezes: _____

| Característica do(s) tumor(es). Marcar com um X o tamanho correspondente: | | | | | | |
|---|--------|--------|-------|---------------|---------------|--------------------|
| | < 3 cm | 3-5 cm | > 5cm | Ulcerado | Invasivo | Evolução em meses: |
| M1D | | | | ()sim ()não | ()sim ()não | |
| M2D | | | | ()sim ()não | ()sim ()não | |
| M3D | | | | ()sim ()não | ()sim ()não | |
| M4D | | | | ()sim ()não | ()sim ()não | |
| M5D | | | | ()sim ()não | ()sim ()não | |
| | | | | | | |
| M1E | | | | ()sim ()não | ()sim ()não | |
| M2E | | | | ()sim ()não | ()sim ()não | |
| M3E | | | | ()sim ()não | ()sim ()não | |
| M4E | | | | ()sim ()não | ()sim ()não | |
| M5E | | | | ()sim ()não | ()sim ()não | |

Velocidade de crescimento do tumor: () lenta () moderada () rápida

Presença de células neoplásica em linfonodos: () sim () não () não avaliado

Edema em membros: () não () sim. Qual: _____

Presença de metástases a distância: () não () sim () não avaliado

Se sim, em qual(is) órgão(s): _____

Procedimento Cirúrgico: _____

Classificação histopatológica: _____

Grau de diferenciação histológica: () Bem () Moderadamente () Pobremente

Intervalo de tempo livre da doença após a cirurgia em meses: _____.

Tempo de sobrevida em meses: _____.

Condição atual do paciente: () vivo () morto () eutanásia

9.2 ANEXO 2

TÉCNICA DE ESTREPTOAVIDINA-BIOTINA-PEROXIDASE

- 1- Desparafinização:
 - a. 30 minutos no Xilol I, em temperatura ambiente;
 - b. 20 minutos no Xilol II, em temperatura ambiente.
- 2- Hidratação dos cortes:
 - a. 3 minutos no álcool I;
 - b. 3 minutos no álcool II;
 - c. 3 minutos no álcool III;
 - d. 3 minutos no álcool 95°C;
 - e. 3 minutos no álcool 85°C.
- 3- Lavagem em água destilada (10 vezes - passagem)
- 4- Recuperação antigênica: imersão em CITRATO 10 milimolar, pH 6,0
 - a. 25 minutos em banho-maria: solução pré-aquecida a 96,5°C
 - b. Deixar esfriar 20 minutos em temperatura ambiente
- 5- Passagem em água destilada (10 vezes)
- 6- Bloqueio da peroxidase endógena: 20 minutos em água oxigenada 10 volumes;
- 7- Passagem em água destilada (10 vezes)
- 8- Colocado em TRIS (solução tampão - pH 7,4) para parar a reação da peroxidase:
2 vezes durante 5 minutos
- 9- Incubação durante 1 hora em BSA 1% (bloqueador inespecífico de proteínas) –
contribui para a redução das marcações inespecíficas (fundo).
- 10- Incubação com o anticorpo primário

- a. Diluição do anticorpo primário (NCL-E-Cad) na proporção de 1:100 em solução de BSA 1%;
- b. Aplicação da diluição sobre todo corte;
- c. Deixadas as lâminas em câmara úmida a 4°C durante 18 horas (“overnight”).

11- Lavagem com TRIS (colocando e ao mesmo tempo aspirando)

12- Absorção do excesso de TRIS

13- Incubação com o anticorpo secundário (EP-ABCu):

- a. Anticorpo secundário biotilado (anti-camundongo e anti-coelho), diluído conforme informações do fabricante. Incubado por 30 minutos, a temperatura ambiente.
- b. Lavar com TRIS por 10 minutos
- c. Complexo avidina, biotina, peroxidase: preparada meia hora antes do uso, de acordo com informações do fabricante. Incubado por 30 minutos a temperatura ambiente.
- d. Lavar com TRIS por 10 minutos

14- Revelação com o substrato cromogênico (Diaminobenzidina – DAB, pronto para uso – DAKO): deixar 5 minutos em DAB

15- Lavagem com TRIS

16- Passagem em água destilada (10 vezes)

17- Contracoloração com Hematoxilina de Mayer: 3-5 minutos imerso na hematoxilina

18- Lavagem em água corrente durante 10 minutos

19- Passagem em água destilada uma vez

20-Desidratação dos cortes:

- a. Álcool 85°C: passagem
- b. Álcool 95°C: passagem
- c. Álcool absoluto I: 3-5 minutos
- d. Álcool absoluto II: 3-5 minutos
- e. Álcool absoluto III: 3-5 minutos
- f. Xilol I: 3-5 minutos
- g. Xilol II: 3-5 minutos

21- Montagem das lâminas:

- a. Resina sintética (Permount)
- b. Lamínulas