FACULDADE DE MEDICINA

**UNIVERSIDADE DO PORTO**

# *ESTUDO DA EXPRESSÃO DA CADERINA P EM LESÕES BENIGNAS E MALIGNAS DA GLÂNDULA MAMÁRIA FELINA*

Ana Catarina Pais dos Santos Figueira

Porto, 2008

FACULDADE DE MEDICINA

**UNIVERSIDADE DO PORTO**

Mestrado em Medicina e Oncologia Molecular

# *ESTUDO DA EXPRESSÃO DA CADERINA P EM LESÕES BENIGNAS E MALIGNAS DA GLÂNDULA MAMÁRIA FELINA*

Ana Catarina Pais dos Santos Figueira

Porto, 2008

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE MESTRE APRESENTADA À FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

Artigo 48º, parágrafo 3 – A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação (Regulamento da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto – Decreto n.º 19337, 29 de Janeiro de 1931).

Aos Meus Pais

Ao Miguel

**AGRADECIMENTOS**

Ao longo do Curso de Mestrado em Medicina e Oncologia Molecular, foram muitas as pessoas que ajudaram e apoiaram na elaboração do presente trabalho. A elas a expressão do meu sincero agradecimento.

À Comissão Organizadora do Mestrado em Medicina e Oncologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, por esta excelente oportunidade.

À Professora Doutora Fátima Gärtner, orientadora deste projecto, acima de tudo pela amizade e por me ter proporcionado a oportunidade de realizar este trabalho. Agradeço ainda pela orientação técnico-científica, pelos ensinamentos transmitidos e pelo tempo generosamente despendido desde o início das actividades experimentais até à revisão do presente estudo.

À Doutora Manuela Lacerda co-orientadora deste projecto, por toda a contribuição técnico-científica e por me ter aceite no seu serviço (Laboratório de Histopatologia do Instituto Português de Oncologia de Coimbra) para a realização deste trabalho. Agradeço a amizade com que me recebeu, a total disponibilidade que sempre demonstrou para me ajudar e as palavras de incentivo nas horas mais difíceis. Não posso deixar de referir o seu empenho e interesse demonstrados na realização de um estudo em Medicina Veterinária.

Ao Professor Doutor Júlio Carvalheira pela sempre pronta disponibilidade na colaboração da análise estatística dos resultados deste estudo, bem como pelas inúmeras reuniões e alterações ao longo do trabalho.

Ao Dr. Paulo Figueiredo pela paciência e tempo dispendido na selecção de fotografias.

À Doutora Teresa Martins por ter apoiado a realização deste projecto no Instituto Português de Oncologia de Coimbra, bem como pela simpatia e incentivo.

A todos os elementos do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, pela disponibilidade e apoio técnico.

A todos os elementos do Laboratório de Histopatologia do Instituto Português de Oncologia de Coimbra pela simpatia e apoio, em especial à Ana Sofia agradeço a sua amizade e a disponibilidade que sempre demonstrou para me ajudar, bem como por todo o trabalho técnico desempenhado.

Ao Sr. Seco do Laboratório de Anatomia Patológica da Escola Universitária Vasco da Gama pela ajuda técnica e por todo o seu apoio.

Uma agradecimento muito especial à Doutora Anália do Carmo pela sua amizade, incentivo e apoio demonstrado na minha evolução académica.

Aos meus amigos e colegas que se mostraram interessados e solícitos em ajudar-me e tiveram sempre uma palavra de ânimo.

À minha família pelo seu apoio incondicional.

Ao Miguel por toda a paciência e carinho.

A todos um MUITO OBRIGADA.

## ÍNDICE


ÍNDICE DE FIGURAS ..... 17
ÍNDICE DE QUADROS ..... 21
ÍNDICE DE GRÁFICOS ..... 23
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS ..... 25
RESUMO ..... 27
*ABSTRACT* ..... 29
INTRODUÇÃO ..... 31
1. TUMORES DA GLÂNDULA MAMÁRIA DE FELÍDEOS ..... 33
2. MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR ..... 39
2.1. Superfamília das caderinas ..... 40
2.1.1 Caderinas clássicas ..... 40
2.1.1.1. Caderinas não neuronais ..... 40
2.1.1.2. Caderinas neuronais ..... 41
2.1.2. Estrutura ..... 42
2.1.3. Interacção caderina - caderina ..... 43
2.1.4. Interacção caderina-citoesqueleto ..... 44
2.1.4.1. Cateninas ..... 45
2.1.5. Funções e regulação das caderinas ..... 46
3. As caderinas e a tumorigénese ..... 47
3.1 As caderinas na tumorigénese mamária ..... 48
3.1.1. Caderina E ..... 49
3.1.2. Caderina P ..... 54
OBJECTIVOS ..... 59
MATERIAL E MÉTODOS ..... 63
1. MATERIAL ..... 65
2. MÉTODOS ..... 65
2.1. Avaliação clínico-patológica ..... 65
2.2. Avaliação histopatológica ..... 66
2.2.1. Método de *Nottingham* ..... 66
2.3. Avaliação imunohistoquímica ..... 68
2.3.1. Anticorpos ..... 68
2.3.2. Protocolo ..... 69
2.3.3. Quantificação da imunoexpressão ..... 70
2.3.3.1. Caderina P ..... 70
2.3.3.2. Caderina E ..... 70
2.4. Análise estatística ..... 71
RESULTADOS ..... 73
1. AVALIAÇÃO CLíNICO-PATOLÓGICA ..... 75
Raça ..... 76
Idade ..... 76
Estado Reprodutivo ..... 77
Localização das lesões ..... 77

Tamanho ..... 77
Ulceração cutânea ..... 77
2. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA ..... 78
2.1. Classificação histológica ..... 78
Infiltrado inflamatório ..... 87
Necrose ..... 87
Padrão de crescimento ..... 87
2.2. Grau histológico ..... 88
2.3. Metástases ..... 88
3. AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA ..... 89
3.1 Imunoexpressão da caderina P no tecido mamário felino ..... 89
3.1.1. Glândula mamária normal (n=4) ..... 89
3.1.2. Glândula mamária hiperplásica (n=12) ..... 92
3.1.3. Tumores mamários (n=45) ..... 92
3.1.3.1. Tumores mamários benignos (n=6) ..... 92
3.1.3.2. Tumores mamários malignos (n=39) ..... 92
3.1.4. Metástases (n=3) ..... 100
3.2. Imunoexpressão da caderina E no tecido mamário felino ..... 102
3.2.1. Glândula mamária normal (n=4) ..... 102
3.2.2. Glândula mamária hiperplásica (n=12) ..... 102
3.2.3. Tumores mamários (n=45) ..... 104
3.2.3.1. Tumores mamários benignos (n=6) ..... 104
3.2.3.2. Tumores mamários malignos (n=39) ..... 106
3.2.4. Metástases (n=3) ..... 112
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA ..... 114
4.1. Associação entre as variáveis clínico-patológicas e as lesões mamárias ..... 114
4.2. Associação entre as variáveis histopatológicas e as lesões mamárias ..... 116
4.3. Avaliação da imunoexpressão da caderina P e a agressividade biológica ..... 118
4.3.1. Associação entre a imunoexpressão da caderina P e as lesões mamárias ..... 118
4.3.2. Associação entre a imunoexpressão da caderina P e as variáveis clínico-patológicas ..... 119
4.3.3. Associação entre a imunoexpressão da caderina P e as variáveis histopatológicas ..... 120
4.3.4. Análise estatística no grupo de tumores malignos ..... 122
4.3.4.1. Associação entre a imunoexpressão da caderina P e o tipo histológico ..... 122
4.3.4.2. Associação entre a imunoexpressão da caderina P e o grau histológico ..... 122
4.4. Avaliação do padrão de imunoexpressão da caderina E e a agressividade biológica ..... 123
4.4.1. Associação entre o padrão de imunoexpressão da caderina E e as lesões mamárias ..... 123
4.4.2. Associação entre o padrão de imunoexpressão da caderina E e as variáveis clínico-patológicas ..... 123
4.4.3. Associação entre o padrão de imunoexpressão da caderina E e as variáveis histopatológicas ..... 124
4.4.4. Análise estatística no grupo de tumores malignos ..... 125
4.4.4.1. Associação entre o padrão de imunoexpressão da caderina E e o tipo histológico ..... 125
4.4.4.2. Associação entre o padrão de imunoexpressão da caderina E e o grau histológico ..... 126
4.5. Associação entre a expressão da caderina E e a expressão da caderina P ..... 126
DISCUSSÃO ..... 127
CONCLUSÕES ..... 139

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 143
ANEXOS ..... 163
ANEXO I ..... 165
ANEXO II ..... 167

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1**. Representação esquemática da estrutura básica das caderinas clássicas (Adaptado de Wheelock *et al*., 2001). ..... 42
**Figura 2.** Representação esquemática do complexo caderina-catenina (Adaptado de Paredes *et al*., 2007a). ..... 44
**Figura 3.** Glândula mamária: normal (Coloração de H-E, 630x). ..... 79
**Figura 4.** Glândula mamária: hiperplasia lobular (Coloração de H-E, 25x). ..... 79
**Figura 5.** Glândula mamária: alteração fibroadenomatosa (Coloração de H-E, 25x). ..... 80
**Figura 6.** Glândula mamária: adenoma simples (Coloração de H-E, 50x). ..... 80
**Figura 7.** Glândula mamária: fibroadenoma (Coloração de H-E, 50x). ..... 81
**Figura 8.** Glândula mamária: papiloma ductal (Coloração de H-E, 50x). ..... 81
**Figura 9.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar (predominantemente tubular) (Coloração de H-E, 50x). ..... 82
**Figura 10.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar (predominantemente papilar) (Coloração de H-E, 100x). ..... 82
**Figura 11.** Glândula mamária: carcinoma sólido (Coloração de H-E, 100x). ..... 83
**Figura 12.** Glândula mamária: carcinoma cribiforme (Coloração de H-E, 100x). ..... 83
**Figura 13.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar com áreas com produção de substância mucinosa (Coloração de H-E, 100x). ..... 84
**Figura 14.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar com áreas com produção de substância mucinosa (Coloração de PAS, 100x). ..... 84
**Figura 15.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar com áreas com produção de substância mucinosa (Coloração de PAS após diastase, 100x). ..... 85
**Figura 16.** Gânglio linfático: metástase ganglionar de um carcinoma tubulopapilar (Coloração de H-E, 50x). ..... 85
**Figura 17.** Glândula mamária: normal. Imunorreactividade nuclear para a p63 (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x). ..... 90
**Figura 18.** Glândula mamária: normal. Imunorreactividade membranar e citoplasmática para a AE1/AE3 (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x). ..... 90
**Figura 19.** Glândula mamária: normal. Imunorreactividade membranar e citoplasmática para a caderina P nas células mioepiteliais (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x). ..... 91
**Figura 20.** Glândula mamária: normal em lactação. Imunorreactividade para a caderina P no pólo apical das células epiteliais (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x). ..... 91
**Figura 21.** Glândula mamária: alteração fibroadenomatosa. Imunorreactividade nuclear para a p63 (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x). ..... 93
**Figura 22.** Glândula mamária: alteração fibroadenomatosa. Imunorreactividade membranar e citoplasmática para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x). ..... 93
**Figura 23.** Glândula mamária: adenoma. Imunorreactividade nuclear para a p63 (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x). ..... 94
**Figura 24.** Glândula mamária: adenoma. Imunorreactividade membranar e citoplasmática para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x). ..... 94
**Figura 25.** Glândula mamária: carcinoma sólido. Imunorreactividade para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x). ..... 95
**Figura 26.** Glândula mamária: carcinoma sólido. Imunorreactividade membranar e citoplasmática para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x). ..... 95
**Figura 27.** Glândula mamária: carcinoma sólido. Imunorreactividade membranar e citoplasmática granular para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x). ..... 96

**Figura 28.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x). ..... 96
**Figura 29.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x). ..... 97
**Figura 30.** Glândula mamária: carcinoma sólido. Imunorreactividade para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x). ..... 97
**Figura 31.** Glândula mamária: carcinoma sólido. Imunorreactividade para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x). ..... 98
**Figura 32.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x). ..... 98
**Figura 33.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x). ..... 99
**Figura 34.** Glândula mamária: carcinoma sólido. Imunorreactividade para a AE1/AE3 (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x). ..... 99
**Figura 35.** Gânglio linfático: metástase ganglionar de carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x). ..... 100
**Figura 36.** Gânglio linfático: metástase ganglionar de carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x). ..... 101
**Figura 37.** Gânglio linfático: metástase ganglionar de carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade membranar e citoplasmática para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x). ..... 101
**Figura 38.** Glândula mamária: normal. Imunorreactividade membranar para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x). ..... 103
**Figura 39.** Glândula mamária: alteração fibroadenomatosa. Imunorreactividade para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x). ..... 103
**Figura 40.** Glândula mamária: alteração fibroadenomatosa. Imunorreactividade para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x). ..... 104
**Figura 41.** Glândula mamária: adenoma simples. Imunorreactividade para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x). ..... 105
**Figura 42.** Glândula mamária: fibroadenoma. Imunorreactividade para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x). ..... 105
**Figura 43.** Glândula mamária: carcinoma sólido. Imunorreactividade para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x). ..... 106
**Figura 44.** Glândula mamária: carcinoma sólido. Imunorreactividade membranar para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x). ..... 107
**Figura 45.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar (predominantemente tubular). Imunorreactividade para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x). ..... 107
**Figura 46.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade membranar para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x). ..... 108
**Figura 47.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade membranar e citoplasmática para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x). ..... 108
**Figura 48.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar (predominantemente papilar). Imunorreactividade para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x). ..... 109
**Figura 49.** Glândula mamária: carcinoma cribiforme. Imunorreactividade para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x). ..... 109

**Figura 50.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x). ..... 110
**Figura 51.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x). ..... 110
**Figura 52.** Glândula mamária: carcinoma sólido. Imunorreactividade citoplasmática granular para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x). ..... 111
**Figura 53.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade membranar e citoplasmática granular para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x). ..... 111
**Figura 54.** Glândula mamária: carcinoma sólido. Imunorreactividade para a AE1/AE3 (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x). ..... 112
**Figura 55.** Gânglio linfático: metástase ganglionar de carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 50x). ..... 113
**Figura 56.** Gânglio linfático: metástase ganglionar de carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x). ..... 113

## ÍNDICE DE QUADROS

**Quadro 1.** Classificação histológica dos tumores mamários na espécie felina (Adaptado de Misdorp *et al*., 1999)... 35
**Quadro 2.** Resumo do método semi-quantitativo para determinação do grau histológico em carcinomas da mama (Adaptado de Elston e Ellis, 1998). ..... 67
**Quadro 3.** Anticorpos utilizados, respectivas diluições, tempos, temperaturas de incubação e tratamentos efectuados para recuperação antigénica. ..... 69
**Quadro 4.** Avaliação semi-quantitativa da imunoexpressão da caderina P. ..... 70
**Quadro 5.** Avaliação semi-quantitativa da imunoexpressão da caderina E. ..... 70
**Quadro 6.** Variáveis clínico-patológicas e respectivas frequências absolutas e relativas. ..... 76
**Quadro 7.** Historial reprodutivo dos animais em função das lesões mamárias. ..... 77
**Quadro 8.** Classificação histológica das lesões mamárias e respectivas frequências absolutas e relativas. ..... 78
**Quadro 9.** Variáveis clínico-patológicas e suas frequências absolutas e relativas nas lesões mamárias. ..... 86
**Quadro 10.** Variáveis histopatológicas e respectivas frequências absolutas e relativas. ..... 87
**Quadro 11.** Variáveis histopatológicas e suas frequências absolutas e relativas nas lesões mamárias. ..... 87
**Quadro 12.** Graduação histológica e respectivas frequências absolutas e relativas. ..... 88
**Quadro 13.** Graduação histológica dos diferentes tipos histológicos de carcinomas avaliados. ..... 88
**Quadro 14.** Imunorreactividade dos tecidos mamários para o anticorpo anti-caderina P. ..... 89
**Quadro 15.** Padrão de imunorreactividade dos tecidos mamários para o anticorpo anti-caderina E. ..... 102
**Quadro 16.** Correlação entre as variáveis clínico-patológicas e as lesões mamárias. ..... 114
**Quadro 17.** Correlação entre as variáveis histopatológicas e as lesões mamárias. ..... 116
**Quadro 18.** Correlação entre a expressão da caderina P e as lesões mamárias. ..... 118
**Quadro 19.** Correlação entre a imunoexpressão da caderina P e as variáveis clínico-patológicas. ..... 119
**Quadro 20.** Correlação entre a imunoexpressão da caderina P e as variáveis histopatológicas. ..... 120
**Quadro 21.** Correlação entre a imunoexpressão da caderina P e o tipo histológico dos tumores malignos. ..... 122
**Quadro 22.** Correlação entre a expressão da caderina P e o grau histológico dos tumores malignos. ..... 122
**Quadro 23.** Correlação entre o padrão de imunoexpressão da caderina E e as lesões mamárias. ..... 123
**Quadro 24.** Correlação entre o padrão de imunoexpressão da caderina E e as variáves clínico-patológicas. ..... 124
**Quadro 25.** Correlação entre o padrão de imunoexpressão da caderina E e as variáves histopatológicas. ..... 125
**Quadro 26.** Correlação entre o padrão de imunoexpressão da caderina E e o tipo histológico dos tumores malignos. ..... 125
**Quadro 27.** Correlação entre o padrão de imunoexpressão da caderina E e o grau histológico dos tumores malignos. ..... 126
**Quadro 28.** Correlação entre o padrão de imunoexpressão da caderina E e a imunorreactividade à caderina P. ..... 126

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

**Gráfico 1.** Correlação entre o diâmetro do campo do microscópio e o número de mitoses (Adaptado de Elston e Ellis, 1998). ..... 67
**Gráfico 2.** Frequências absolutas dos tecidos mamários estudados. ..... 75
**Gráfico 3.** Associação entre a idade e as lesões mamárias (p=0,0007). ..... 115
**Gráfico 4.** Associação entre o estado reprodutivo (ovariectomia) e as lesões mamárias (p=0,0270). ..... 115
**Gráfico 5.** Associação entre a localização e as lesões mamárias (p=0,0162). ..... 115
**Gráfico 6.** Associação entre a presença de ulceração e as lesões mamárias (p=0,0358). ..... 116
**Gráfico 7.** Associação entre a presença de infiltrado inflamatório e as lesões mamárias (p<0,0001). ..... 117
**Gráfico 8.** Associação entre a presença de necrose e as lesões mamárias (p<0,0001). ..... 117
**Gráfico 9.** Associação entre o padrão de crescimento e as lesões mamárias (p<0,0001). ..... 117
**Gráfico 10.** Associação entre as lesões mamárias e a imunoexpressão da caderina P (p=0,0001). ..... 118
**Gráfico 11.** Associação entre o uso de anticoncepcionais e a imunoexpressão da caderina P (p=0,0020). ..... 120
**Gráfico 12.** Associação entre a presença de infiltrado inflamatório e a imunoexpressão da caderina P (p=0,0226). ..... 121
**Gráfico 13.** Associação entre a presença de necrose e a imunoexpressão da caderina P (p<0,0001). ..... 121
**Gráfico 14.** Associação entre o padrão de crescimento e a imunoexpressão da caderina P (p<0,0001). ..... 121
**Gráfico 15.** Associação entre o grau histológico e a imunoexpressão da caderina P (p=0,0132). ..... 123

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ºC - graus Célcius.

$Ca^{2+}$ - ião cálcio.

CBD - *catenin-binding domain* - domínio de ligação à catenina.

CDH1 - gene da caderina E.

CDH3 - gene da caderina P.

CK - citoqueratina.

cm - centímetro.

DAB - *3,3' diaminobenzidine* - tetrahidrocloreto de 3,3' diaminobenzidina.

EC - extracelular.

EDTA - *ethylenediaminetetraacetic acid* - ácido etilenodiaminotetracético.

EGF-R - *epidermal growth factor receptor* - receptor do factor de crescimento epidérmico.

ER - *estrogen receptor* - receptor de estrogénio.

HAV - histidina-alanina-valina.

H-E - coloração de hematoxilina eosina.

$H_2O_2$ - peróxido de hidrogénio.

IGF - *insulin-like growth factor* - factor de crescimento semelhante a insulina.

JMD - *juxtamembrane domain* - domínio justamembranar.

kb - quilo base.

kDa - quilo Dalton.

LOH - *lost of heterozigoty* - perda da heterozigotia.

µm - micrómetro.

mm - milímetro.

MPCD – *membrane-proximal conserved domain* - domínio conservado proximal à membrana.

*n* - número.

N.S. - não significativo.

OMS - Organização Mundial de Saúde.

PAS - *periodic acid-Schiff stain* – coloração de ácido periódico-*Schiff.*

PR - *progesterone receptor* - receptor de progesterona.

RTK - *receptor tyrosine kinase* - receptor de tirosina quinase.

$sLe^x$ - Sialyl Lewis x.

*vs* - versus.

**RESUMO**

As caderinas são moléculas de adesão celular dependentes de cálcio, com importantes funções na formação e manutenção da arquitectura tecidular normal. A caderina placentária (caderina P) e a caderina epitelial (caderina E) são caderinas clássicas, expressas pelas células mioepiteliais e epiteliais da glândula mamária humana, respectivamente. Alterações das suas expressões têm sido observadas e implicadas na carcinogénese mamária humana.

Os tumores mamários de felídeos são considerados um bom modelo animal para o estudo da carcinogénese mamária humana. Desta forma, a investigação de marcadores moleculares na glândula mamária felina, nomeadamente as caderinas, poderá ser vantajosa no estudo e compreensão da carcinogénese mamária da mulher.

Com o objectivo de estudar a expressão da caderina P e da caderina E na glândula mamária felina normal e em lesões mamárias, avaliou-se a sua imunoexpressão através da técnica de imunohistoquímica de processamento automatizado em 61 amostras de tecido mamário felino, que incluíam glândula mamária normal (*n*=4), hiperplasia mamária (*n*=12), tumor mamário benigno (*n*=6) e tumor mamário maligno (*n*=39).

No presente trabalho, a imunoexpressão da caderina P na glândula mamária normal, em hiperplasias e em tumores benignos encontrava-se restrita às células mioepiteliais. Relativamente aos tumores malignos, observou-se imunoexpressão aberrante da caderina P em células epiteliais em 64,1% (*n*=25) dos casos, com distribuição celular membranar e/ou citoplasmática. Desta forma, a imunoexpressão da caderina P em lesões mamárias de felídeos não foi exclusiva das células mioepiteliais.

Foi possível determinar uma correlação estastisticamente significativa entre a imunoexpressão da caderina P e o tipo de lesão mamária (p=0,0001), a presença de infiltrado inflamatório (p=0,0226), a presença de necrose (p<0,0001) e o padrão de crescimento (p<0,0001). Nos tumores mamários malignos foi observada uma correlação estatisticamente significativa entre a imunoexpressão da caderina P e o grau histológico (p=0,0132).

Relativamente à caderina E não foi possível estabelecer qualquer correlação entre a imunoexpressão desta molécula, quer em termos de percentagem de células marcadas quer em termos de padrão de marcação, e as variáveis em estudo.

A expressão epitelial aberrante da caderina P parece estar relacionada com a malignidade tumoral. No entanto, e de forma a confirmar os resultados da presente investigação, seriam necessários estudos adicionais com uma maior casuística e estudos de acompanhamento clínico.

**Palavras-chave**: caderina P, caderina E, tumores mamários de felídeos, imunohistoquímica.

***ABSTRACT***

Cadherins are calcium-dependent cellular adhesion molecules, with important functions in the formation and maintenance of normal tissue architecture. Placental cadherin (P-cadherin) and epitelial cadherin (E-cadherin) are classical cadherins, expressed by myoepithelial and epithelial cells of the human mammary gland, respectively. Changes to their expression have been observed and implicated in human breast carcinogenesis.

Feline mammary tumours are considered a good animal model for the study of human mammary carcinogenesis. Thus, the investigation of molecular markers in the feline mammary gland, namely the cadherins, may be useful in the understanding of the women mammary carcinogenesis.

In order to study P-cadherin and E-cadherin expression in normal feline mammary gland and in mammary lesions, an automated immunohistochemistry system was used in 61 samples of normal (*n*=4), hyperplastic (*n*=12), benign (*n*=6) and malignant (*n*=39) feline mammary tissues.

In the present work, we concluded that in normal mammary gland, in mammary hyperplasia and in benign tumours, P-cadherin immunolabelling was restricted to myoepithelial cells. As far as malignant tumours were concerned, there was an aberrant epithelial P-cadherin immunoexpression in 64,1% (*n*=25) of the cases, with a membranar and/or cytoplasmic pattern of cellular distribution. Therefore, P-cadherin expression in feline mammary lesions was not exclusive of myoepithelial cells.

It was possible to determine a significant statistical correlation between P-cadherin expression intensity and feline mammary lesions (p=0,0001), presence of inflammatory infiltrate (p=0,0226), presence of necrosis (p<0,0001) and growth pattern (p<0,0001). Malignant mammary tumours showed a statistical correlation between P-cadherin immunoexpression intensity and histological grade (p=0,0132).

In contrast, it was not possible to correlate E-cadherin expression (intensity and pattern of staining) with any of the variables studied.

Aberrant epithelial P-cadherin expression seems to be correlated with tumour malignancy. However, and to confirm the results of the present investigation, further studies with a larger sample number, as well as a better clinical support would be required.

**Keywords**: P-cadherin, E-cadherin, feline mammary tumour, imunohistochemistry.

# INTRODUÇÃO

## 1. TUMORES DA GLÂNDULA MAMÁRIA DE FELÍDEOS

A glândula mamária felina é uma glândula sudorípara modificada (Banks, 1993; Donald e Miller, 2007; Schlafer e Miller, 2007), tubuloalveolar composta (Banks, 1993; Espinosa de los Monteros y Zayas *et al*., 2004; Monteiro-Riviere, 2006), na qual os grupos de unidades secretoras formam lóbulos separados por septos de tecido conjuntivo e cuja principal função é produzir leite (Espinosa de los Monteros y Zayas *et al*., 2004; Monteiro-Riviere, 2006). A unidade secretora ou alvéolo glandular, bem como os ductos, são revestidos por um epitélio cúbico simples e entre as células epiteliais e a membrana basal localizam-se as células mioepiteliais (Espinosa de los Monteros y Zayas *et al*., 2004).

Na espécie felina, as cadeias mamárias localizam-se nas paredes torácica e abdominal ventrais (Bevier, 1993), estendem-se desde a região peitoral à inguinal e têm, geralmente, quatro glândulas mamárias de cada lado (McGeady *et al*., 2006), com dois pares torácicos e dois abdominais (Barone, 2001). Em cada mamilo existem entre três e sete ductos papilares (Donald e Miller, 2007; McGeady *et al*., 2006; Monteiro-Riviere, 2006; Schlafer e Miller, 2007).

O estudo de tumores espontâneos em animais domésticos (canídeos e felídeos) tem sido de reconhecido interesse na área da oncobiologia, bem como na patologia comparada (Bostock 1975; Cassali *et al*., 1999; Cotchin, 1975; Dutra *et al*., 2004; Misdorp e Hart, 1976; Silva *et al*., 2004; Zappulli *et al*., 2005). Com base nas características histológicas e na evolução clínica, os carcinomas mamários felinos têm sido propostos como bons modelos de estudo para melhor compreensão da carcinogénese da mama da mulher (Misdorp e Weijer, 1980; Pérez-Alenza *et al*., 2004; Weijer *et al*., 1972). São considerados, por alguns autores, como melhores modelos do que os tumores mamários de canídeos (Misdorp e Weijer, 1980; Pérez-Alenza *et al*., 2004), à excepção de um tipo particular de cancro da mama, o carcinoma inflamatório, em que os de canídeos parecem ser um melhor modelo de estudo (Pérez-Alenza *et al*., 2004).

Os tumores mamários são os tumores mais frequentes em cadelas e os terceiros mais frequentes em gatas (Misdorp, 2002; Misdorp *et al*., 1999), a seguir às neoplasias hematopoiéticas e aos tumores da pele (Lana *et al*., 2007; Misdorp, 2002; Misdorp e Weijer, 1980; Rutteman e Kirpensteigh, 2003). Representam cerca de 12% de todos os tumores dos felídeos (Misdorp, 2002) e 17% dos tumores das gatas (Lana *et al*., 2007; Misdorp, 2002; Rutteman e Kirpensteigh, 2003). A incidência é menos de metade da dos humanos e da dos canídeos (Lana *et al*., 2007), que são os com maior incidência de tumores mamários de todos os animais domésticos (Harvey e Gilbertson, 1977).

Os tumores mamários em felídeos ocorrem quase exclusivamente em fêmeas (Misdorp, 2002) e quando ocorrem em machos representam aproximadamente 1 a 5% dos carcinomas mamários diagnosticados (Lana *et al*., 2007). Skorupski *et al*., 2005 demonstraram que os carcinomas mamários

felinos têm comportamento similar em ambos os sexos, à semelhança do que acontece em humanos (Lester e Cotran, 1999).

Aproximadamente 85% dos tumores mamários de felídeos são classificados como malignos (Ginn *et al*., 2007; Lana *et al*., 2007; Rutteman e Kirpensteigh, 2003), sendo os tumores mamários benignos raros nesta espécie (Moore e Ogilvie, 2001), correspondendo a 15-20% das neoplasias mamárias (Jones *et al*., 1997). Os tumores mamários felinos são conhecidos pelo seu mau comportamento biológico (Misdorp *et al*., 1999).

Enquanto que os tumores mamários caninos têm sido reclassificados em termos de tipo histológico de acordo com o grau de malignidade, acrescentando assim um factor prognóstico ao sistema de classificação (Benjamin *et al*., 1999; Misdorp *et al*., 1999; Misdorp e Hart, 1976; Pérez-Alenza *et al*., 2000), os carcinomas mamários felinos, não foram ainda estudados com profundidade ao ponto de ser feita uma reclassificação com base em características histológicas com possível valor prognóstico (Misdorp *et al*., 1999). Desta forma, alguns autores propõem uma classificação morfológica descritiva, mais do que uma classificação com valor prognóstico (Ginn *et al*., 2007; Misdorp *et al*., 1999). No entanto, mesmo em canídeos, para uma classificação mais criteriosa é recomendada uma avaliação imunohistoquímica em conjunto com a classificação histopatológica (Destexhe *et al*., 1993).

A classificação histológica de acordo com os critérios de diagnóstico propostos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para tumores da glândula mamária de felídeos, encontra-se resumida no Quadro 1 (Misdorp *et al*., 1999).

Os tumores mamários nos felídeos não apresentam uma grande variedade de tipos morfológicos como nos canídeos (Amorim, 2007). A maioria dos tumores mamários malignos dos felídeos são adenocarcinomas (Novosad, 2003), do tipo tubular, papilar e sólido ou uma combinação destes três (Weijer e Hart, 1983). Tal como nos canídeos, muitos carcinomas têm uma histomorfologia heterogénea, sendo a sua classificação estabelecida com base no padrão morfológico predominante (Misdorp *et al*., 1999).

As proliferações de células mioepiteliais e os tumores mistos são raros em felídeos (Jones *et al*., 1997) e, embora os carcinomas complexos sejam pouco frequentes, a presença de células mioepiteliais em carcinomas mamários de felinos está aparentemente associada a um melhor prognóstico (Seixas *et al*., 2008a, 2008b), de forma semelhante ao verificado em canídeos (Yamagami *et al*., 1996).

Apesar do sistema de classificação da OMS não identificar o carcinoma rico em lípidos como uma variante dos tumores mamários de felídeos, Kamstock *et al*., 2005 descreveram pela primeira vez um na glândula mamária de uma gata.

**Quadro 1.** Classificação histológica dos tumores mamários na espécie felina (Adaptado de Misdorp *et al*., 1999).

| ***Tumores Mamários de Felídeos*** |
|---|
| *Hiperplasias/displasias mamárias* |
| Hiperplasia ductal |
| Hiperplasia lobular |
| Hiperplasia epitelial |
| Adenose |
| Alterações fibroadenomatosas (hipertrofia mamária felina, hipertrofia fibroepitelial) |
| Quistos |
| Ectasia ductal |
| Fibrose focal (fibroesclerose) |
| *Tumores benignos* |
| Adenoma |
| Adenoma simples |
| Adenoma complexo |
| Fibroadenoma |
| Fibroadenoma de baixa celularidade |
| Fibroadenoma de alta celularidade |
| Tumor misto benigno |
| Papiloma ductal |
| *Tumores malignos* |
| Carcinoma (*in situ*) não infiltrativo |
| Carcinoma tubulopapilar |
| Carcinoma sólido |
| Carcinoma cribiforme |
| Carcinoma das células escamosas |
| Carcinoma mucinoso |
| Carcinossarcoma |
| Carcinoma ou sarcoma em tumor benigno |
| *Tumores não classificados* |

Tumores mamários múltiplos do mesmo tipo ou de tipos diferentes, podem ocorrer em uma ou mais glândulas mamárias nos canídeos e também, embora com menor frequência, nos felídeos (Misdorp *et al*., 1999*)*. Nos felídeos, os carcinomas mamários parecem ser mais prevalentes nas glândulas mamárias craniais (axilares) e caudais (inguinais) (Viste *et al*., 2002; Weijer *et al*., 1972). No entanto, existem referências que apontam para a terceira e quarta glândulas mamárias como as mais frequentemente afectadas (Amorim *et al*., 2006; Moore e Ogilvie, 2001). O número de ocorrências entre as glândulas esquerda e direita é similar (Moore e Ogilvie, 2001).

Na gata, tal como na mulher e na cadela, a maioria dos tumores mamários aparece na meia idade (Weiger *et al*., 1972; Weijer e Hart, 1983). A idade média de ocorrência de neoplasias mamárias em felídeos é de 10 a 12 anos (Amorim *et al*., 2006; Lana *et al*., 2007; Misdorp e Weijer, 1980; Rutteman e Kirpensteigh, 2003), com casos descritos desde os 9 meses aos 23 anos de idade (Lana *et al*., 2007).

Tanto em canídeos (Zatloukal *et al*., 2005) como em felídeos (Moore, 2006; Moore e Ogilvie, 2001), o risco de carcinoma mamário aumenta com a idade. Alguns autores defendem que a idade não parece influenciar o tempo de sobrevida e o tempo livre de doença em felídeos com tumores malignos da glândula mamária (MacEwen *et al*., 1984; Viste *et al*., 2002), enquanto que outros são de opinião contrária (Misdorp *et al*., 1999; Weijer e Hart, 1983).

Tal como nos canídeos (Owen, 1979; Zatloukal *et al*., 2005), os felídeos apresentam uma predisposição aumentada para tumores mamários associada à raça (Lana *et al*., 2007; Novosad, 2003; Rutteman e Kirpensteigh, 2003). Assim, os felídeos Europeu comum e Siameses têm uma taxa de incidência de tumores mamários maior do que outras raças (Amorim *et al*., 2006; Lana *et al*., 2007; Rutteman e Kirpensteigh, 2003). Os Siameses têm um risco aumentado (que pode ser de duas vezes) para desenvolver tumores mamários em relação a qualquer outra raça (Lana *et al*., 2007); representam cerca de 25% dos pacientes (Moore, 2006) e o primeiro diagnóstico tende a ser em idades mais jovens (Lana *et al*., 2007; Misdorp, 2002). No entanto, a raça não parece influenciar o tempo de sobrevida (MacEwen *et al*., 1984; Viste *et al*., 2002) nem o tempo livre de doença (MacEwen *et al*., 1984).

O tamanho (MacEwen *et al*., 1984) e o diâmetro (Weijer *et al*., 1972; Weijer e Hart, 1983) dos tumores mamários de felídeos estão relacionados com o prognóstico, assim como nos canídeos (Bostock 1975; Kurzman e Gilbertson, 1986; Misdorp e Hart, 1976) e nas mulheres (Cianfrocca e Goldstein, 2004; Pinder *et al*., 1995). Felídeos com volume tumoral superior a 8 $cm^3$ (MacEwen *et al*., 1984) ou com diâmetro superior a 3 cm (Viste *et al*., 2002) têm pior prognóstico. O facto de felídeos com tumores pequenos terem melhor prognóstico, enfatiza a importância de uma detecção precoce e de um tratamento agressivo (MacEwen *et al*., 1984; Weijer *et al*., 1972). O tamanho tumoral é mesmo considerado por alguns autores como o factor de prognóstico mais significativo (MacEwen *et al*., 1984; Weijer e Hart, 1983).

O tipo de abordagem cirúrgica (radical *vs* conservadora) está relacionado com o tempo livre de doença. Assim, gatas submetidas a mastectomia radical têm períodos de remissão maiores do que as gatas tratadas com cirurgia conservadora, no entanto o tempo de sobrevida não é maior (MacEwen *et al*., 1984). O prognóstico de felídeos tratados unicamente com cirurgia é mau, com uma média de sobrevida pós-cirúrgica de 7,7 meses (Misdorp e Weijer, 1980).

Em gatas mastectomizadas, existe uma elevada taxa de falhas terapêuticas sob a forma de recorrência, metástases ou ambas (Misdorp e Weijer, 1980). Em 40 a 60% dos casos, as micrometástases presentes na altura do diagnóstico crescem e levam à morte do animal (Misdorp, 2002). Mais de 80% dos felídeos com lesões mamárias malignas na altura da morte apresentam metástases (Lana *et al*., 2007), sendo os gânglios linfáticos regionais inguinais e axilares e o pulmão os locais mais comuns de metastização (Weijer *et al*., 1972). O envolvimento de gânglios linfáticos inguinais superficiais em felídeos está fortemente associado ao prognóstico (Weijer e Hart, 1983).

No que diz respeito ao tipo histológico, nos carcinomas mamários de felídeos, não parece estar relacionado com o prognóstico (Weijer e Hart, 1983), contrariamente ao verificado em canídeos (Misdorp e Hart, 1976) e na mulher (Pinder *et al*., 1995).

Weijer *et al*., 1972 referem existir uma correlação entre o grau histológico dos carcinomas mamários felinos e o prognóstico, tal como nas mulheres (Cianfrocca e Goldstein, 2004; Pinder *et al*., 1995). Em carcinomas mamários felinos o método semi-quantitativo de determinação do grau histológico derivado do método de Elston e Ellis, 1991, parece ter valor preditivo do tempo de sobrevida pós-cirúrgico relativamente aos graus 1 e 3, mas não ao grau 2 (Castagnaro *et al*., 1998a). Misdorp e Weijer, 1980 verificaram uma associação entre o grau de diferenciação, grau de pleomorfismo e o número de mitoses e o prognóstico em carcinomas mamários felinos.

Em tumores mamários de canídeos, a presença de invasão tumoral nos tecidos adjacentes é considerado o factor preditivo de comportamento maligno mais importante. A presença de êmbolos tumorais em vasos linfáticos e sanguíneos são evidências de invasão local e de potencial metastático (Ginn *et al*., 2007). O estadio histológico (grau de invasividade) tem revelado associação com o prognóstico em carcinomas mamários felinos (Sarli *et al*., 2003), de forma semelhante ao verificado em carcinomas mamários caninos (Kurzman e Gilbertson, 1986; Misdorp e Hart, 1976; Sarli *et al*., 2002).

A ulceração cutânea tem sido considerada uma variável clínica associada a mau prognóstico em tumores mamários de canídeos (Pérez-Alenza *et al*., 1997, 2000) e de felídeos (Amorim *et al*., 2006; Weijer e Hart, 1983). Em carcinomas mamários felinos é frequente a existência de necrose extensa, independentemente do tamanho tumoral (Weijer *et al*., 1972) e a sua presença está relacionada com o tempo de sobrevida (Weijer e Hart, 1983).

A etiologia dos tumores mamários de felídeos é ainda pouco conhecida (Misdorp e Weijer, 1980; Todorova, 2006). Tem sido demonstrada a presença de partículas víricas em carcinomas mamários felinos (Misdorp, 2002; Misdorp e Weijer, 1980; Moore e Ogilvie, 2001) e uma dieta rica em gordura, assim como a obesidade, pensa-se aumentarem o risco de cancro da mama (Misdorp, 2002). Por outro lado, influências hormonais endógenas e exógenas parecem estar envolvidas na patogénese dos tumores mamários em felídeos (Lana *et al*., 2007; Misdorp, 2002; Rutteman e Misdorp, 1993).

A exposição hormonal crescente (estrogénio e progesterona), antes da ovariectomia, leva a um aumento gradual do risco de tumores mamários, tanto nos felídeos (Overley *et al*., 2005) como nos canídeos (Kelsey *et al*., 1998). Em cadelas (Fonseca e Daleck, 2000; Misdorp, 2002; Mitchell *et al*., 1974; Owen, 1979; Rutteman e Misdorp, 1993) e em gatas (Misdorp, 2002), a ovariectomia na idade jovem oferece efeito protector considerável para carcinomas mamários. Em gatas a ovariectomia aos 6 meses de idade reduz, em aproximadamente sete vezes, o risco de cancro da mama, quando comparado com o de gatas inteiras (Lana *et al*., 2007; Rutteman e Kirpensteigh, 2003). Outros estudos, em que não foi considerada a idade da ovariectomia, mostraram que as gatas castradas tinham cerca de metade do risco de desenvolver carcinoma mamário quando comparadas com gatas inteiras (Moore, 2006;

Rutteman e Kirpensteigh, 2003). Surpreendentemente, o efeito protector da ovariectomia não foi detectado no desenvolvimento de tumores benignos (Rutteman e Kirpensteigh, 2003; Rutteman e Misdorp, 1993). Não se conhece benefício da ovariectomia como adjuvante do tratamento cirúrgico do cancro da mama na prevenção do desenvolvimento de metástases, embora possa reduzir a incidência de tumores nas restantes glândulas mamárias. Relativamente à paridade e à lactação não foi demonstrada uma associação com o aumento do risco de tumores mamários em canídeos ou felídeos (Rutteman e Misdorp, 1993). No entanto, nas mulheres o cancro da mama parece ser mais frequente em nuliparas do que em multiparas (Lester e Cotran, 1999), com um efeito protector da paridade em idades jovens, especificamente para cancros da mama ER positivos (Britt *et al*., 2007).

As progestinas injectáveis têm sido usadas para prevenir o estro na cadela e na gata (Misdorp, 2002), no entanto, existem várias descrições de que a administração de derivados de progesterona parecem promover a ocorrência de alterações mamárias tanto em canídeos (Mol *et al*., 1996; Rutteman e Misdorp, 1993; Tamada *et al*., 2003) como em felídeos (Amorim *et al*., 2006; Loretti *et al*., 2005; MacDougall, 2003; Mol *et al*., 1996; Tamada *et al*., 2003; Tomlinson *et al*., 1984). A alteração fibroadenomatosa felina, também conhecida por hipertrofia mamária felina ou hipertrofia fibroepitelial, é uma lesão que pode afectar uma ou várias glândulas mamárias (Misdorp *et al*., 1999). Pode ser observada em felídeos com recente exposição a esteróides sexuais (Lana *et al*., 2007), nomeadamente em gatas tratadas com progestinas, grávidas e muito jovens (Misdorp *et al*., 1999; Rutteman e Misdorp, 1993), ou seja, está associada a progesteronas endógenas ou exógenas (Misdorp *et al*., 1999; Mol *et al*., 1996). Em felídeos (tanto machos como fêmeas), o tratamento regular com progestinas sintéticas ou combinação de progestinas-estrogénio foi associado a um aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias benignas ou malignas em 3 ou 4 vezes, quando comparado com o de felídeos não tratados (Lana *et al*., 2007; Misdorp, 2002; Rutteman e Kirpensteigh, 2003). No entanto, o tratamento irregular não aumenta o risco destes tumores (Misdorp, 2002; Rutteman e Misdorp, 1993). Também em mulheres, a terapia de substituição hormonal na menopausa, com estrogénios e progesterona, sabe-se aumentar o risco de cancro da mama (Schairer, 2002), apesar de alguns autores considerarem haver ainda controvérsia (Lester e Cotran, 1999).

A hormona de crescimento (Lana *et al*., 2007; Misdorp, 2002; Mol *et al*., 1996; van Garderen *et al*., 1997), a prolactina (Queiroga *et al*., 2005) e o IGF (Rutteman e Misdorp, 1993) também têm um possível envolvimento na carcinogénese mamária de canídeos e de felídeos.

Os tumores mamários em felídeos e canídeos são avaliados, maioritariamente, por critérios clínicos e histológicos (Preziosi *et al*., 2002). No entanto, têm sido estabelecidas novas linhas celulares de tumores mamários felinos (Muleya *et al*., 1998; Takauji *et al*., 2007; Uyama *et al*., 2005) que são de extrema importância para entender o comportamento biológico destes tumores.

Existem muitas semelhanças nos factores de prognóstico para carcinomas mamários em humanos, felídeos e canídeos (Misdorp, 2002) e a potencial utilidade dos tumores mamários de canídeos e de felídeos como modelos animais, tem levado à investigação de vários factores com possível participação na carcinogénese mamária.

Diversos estudos em animais de companhia têm tentado estabelecer correlações entre características histológicas e evolução clínica, e determinados factores, tais como: expressão de receptores hormonais (Cardazzo *et al*., 2005; Donnay *et al*., 1993, 1996; Lana *et al*., 2007; Martín de las Mulas *et al*., 2000a, 2000b, 2002; 2005; Millanta *et al*., 2005a, 2005b; Nieto *et al*., 2000; Ordás *et al*., 2004; Rutteman e Kirpensteigh, 2003), alterações em oncogenes e genes supressores tumorais (De Maria *et al*., 2005; Dutra *et al*., 2004; Martín de las Mulas *et al*., 2003; Millanta *et al*., 2005a; Nieto *et al*., 2003; Oonuma *et al*., 2003; Ordás *et al*., 2007; Sugiura *et al*., 2007; Todorova, 2006), alterações citogenéticas (Hellmén *et al*., 1993), susceptibilidades hereditárias (Schafer *et al*., 1998), factores de transcrição (Petterino *et al*., 2007), enzimas como a COX-2 (Doré *et al*., 2003; Heller *et al*., 2005; Millanta *et al*., 2006), angiogénese e densidade de microvasos intratumoral (Graham e Myers, 1999; Millanta *et al*., 2002a; Restucci *et al*., 2000, 2002, 2004), linfangiogénese (Sarli *et al*., 2007), marcadores de proliferação tumoral (Castagnaro *et al*., 1998b,1998c; Dias Pereira *et al*., 2004; Funakoshi *et al*., 2000; Millanta *et al*., 2002b; Peña *et al*., 1998; Preziosi *et al*., 2002; Sarli *et al*., 2002), taxa de apoptose (Sarli *et al*., 2003), entre outros.

Em medicina veterinária tem-se assistido assim, a um crescente esforço na tentativa de acrescentar aos factores clássicos de prognóstico, novos parâmetros de natureza molecular que forneçam informação útil sobre o curso das lesões malignas e que auxiliem a decisão clínica, à semelhança do verificado em medicina humana (Queiroga e Lopes, 2002). Assim, um dos parâmetros moleculares que tem sido recentemente objecto de estudo em tumores mamários de animais de companhia, são as moléculas de adesão celular, nomeadamente as caderinas.

## 2. MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR

O organismo animal é um conjunto heterogéneo de tipos celulares, organizados em padrões muito diversos. Vários mecanismos de adesão celular são responsáveis por manter a adesão célula-a-célula e a sua regulação é fundamental para a união celular na maior parte dos tecidos, nomeadamente nos tecidos epiteliais (Gumbiner, 1996; Takeichi, 1990).

As células epiteliais estão unidas solidamente por meio de um complexo juncional, que consiste em *tight junctions,* junções aderentes e desmossomas (Semb e Christofori, 1998). As junções aderentes, o tipo mais comum e ubiquitário de adesões intercelulares, são regiões especializadas da membrana plasmática ligadas ao citoesqueleto de actina. São importantes para manter a arquitectura tecidular, a polaridade celular e regular a mobilidade e proliferação celular (Conacci-Sorrell *et al*., 2002; Hirohashi, 1998).

As moléculas de adesão intercelular são glicoproteínas da superfície celular, classificadas em cinco famílias: a superfamília dos proteoglicanos, as selectinas, a superfamília das imunoglobulinas, a

família dos receptores de integrinas e a superfamília das caderinas (Elangbam *et al*., 1997; Gumbiner, 1996; Nollet *et al*., 2000; Takeichi, 1990).

As caderinas constituem uma das famílias de moléculas de adesão intercelular mais importantes (Takeichi *et al*., 2000) e encontram-se principalmente nas junções intercelulares do tipo *zonula adherens* (Angst *et al*., 2001b; Campbell e Pignatelli, 2002). São uma família de receptores proteicos de adesão célula-a-célula, que medeiam a adesão celular homotípica homofílica, dependente de cálcio (Angst *et al*., 2001b; Takeichi, 1991, 1995; Wheelock *et al*., 2001).

## 2.1. SUPERFAMÍLIA DAS CADERINAS

A superfamília das caderinas foi classificada em pelo menos seis subfamílias principais, com base na estrutura proteica dos domínios, na estrutura genómica e na análise filogenética das sequências proteicas. São elas as caderinas clássicas/caderinas tipo I, caderinas atípicas/caderinas tipo II, desmogleínas, desmocolinas, protocaderinas e caderinas Flamingo (Nollet *et al*., 2000).

Quase todos os genes desta superfamília estão estreitamente ligados entre si (Yagi e Takeichi, 2000), existindo fortes evidências de que as diferentes caderinas podem ser codificadas por uma família de genes relacionados, ou seja, com um ancestral comum (Nollet *et al*., 2000; Nose *et al*., 1987; Shirayoshi *et al*., 1986).

### 2.1.1 CADERINAS CLÁSSICAS

As caderinas clássicas pertencem à subfamília mais bem estudada das caderinas (Angst *et al*., 2001b; Han *et al*., 1999), que foi subdividida em dois grupos: as caderinas não neuronais (caderina E ou caderina 1, caderina P ou caderina 3 e caderina EP) e caderinas neuronais (caderina N ou caderina 2 e caderina R ou caderina 4) (Nollet *et al*., 2000).

#### 2.1.1.1. CADERINAS NÃO NEURONAIS

A caderina E (caderina 1) constitui a molécula protótipo das caderinas não neuronais (Nollet *et al*., 2000) e pode mesmo ser considerada a molécula protótipo de toda a família das caderinas clássicas (Nollet *et al*., 1999). A caderina E, também designada de caderina epitelial (Elangbam *et al*., 1997; Takeichi, 1991), é expressa na maioria das células epiteliais (Campbell e Pignatelli, 2002; Elangbam *et al*., 1997; Nollet *et al*., 2000; Wheelock *et al*., 2001) e foi inicialmente descrita como L-CAM na galinha e como uvomorulina no rato (Nollet *et al*., 2000).

A caderina P (caderina 3) (Nollet *et al*., 2000) é também designada de caderina placentária (Elangbam *et al*., 1997; Takeichi, 1991), uma vez que foi observada inicialmente como uma molécula com elevada expressão na placenta do rato (Nollet *et al*., 2000), embora não seja expressa na placenta humana, contrariamente à caderina E (Shimoyama *et al*., 1989).

A caderina P é expressa de forma transitória em vários tecidos durante a embriogénese (Nose e Takeichi, 1986), mas no adulto a sua expressão está limitada a tecidos epiteliais, na junção célula-a-célula (Paredes *et al*., 2007a). Enquanto que a caderina E é expressa em todos os tecidos epiteliais, a caderina P exibe um padrão de expressão singular: co-localiza-se parcialmente com a caderina E e é restrita às camadas basais proliferativas da maioria dos epitélios estratificados ou pseudoestratificados com elevado potencial proliferativo (Elangbam *et al*., 1997; Nollet *et al*., 2000; Shimoyama *et al*., 1989), mas não é expressa no epitélio simples (Shimoyama *et al*., 1989). Esta distribuição da expressão sugere que a caderina P, juntamente com a manutenção da adesão celular, tem funções importantes na diferenciação e crescimento celular (Daniel et al., 1995). É também expressa nas células mioepiteliais da glândula mamária (Wheelock *et al*., 2001) e nas células basais da próstata (Jarrard *et al*., 1997; Wheelock *et al*., 2001).

O gene da caderina E (CDH1) é extensivamente estudado como protótipo para toda a superfamília das caderinas (Nollet *et al*., 2000) e está estruturalmente relacionado com o gene da caderina P (CDH3) (Hatta *et al*., 1991). Em humanos, os genes CDH1 (caderina E) e CDH3 (caderina P) têm localização cromossómica em 16q22.1 (Nollet *et al*., 2000), em que o CDH3 encontra-se 32kb a montante do CDH1 (Paredes *et al*., 2007a). Os genes CDH1 e CDH3 codificam proteínas transmembranares com 120 kDa (Ohene-Abuakwa e Pignatelli, 2000) e 118 kDa (Nose e Tacheichi, 1986), respectivamente. Embora partilhem 66% de homologia, o gene que codifica para a caderina P (CDH3) ainda não está suficientemente caracterizado em comparação com o CDH1 (Paredes *et al*., 2007a).

Assim, as caderinas E e P partilham uma estrutura básica comum, embora tenham pesos moleculares, especificidades de ligação e distribuição tecidular diferentes (Elangbam *et al*., 1997).

#### 2.1.1.2. CADERINAS NEURONAIS

A caderina N (caderina 2) é a molécula protótipo das caderinas neuronais (*Nollet et al*., 2000). É expressa predominantemente no tecido neural adulto (Campbell e Pignatelli, 2002; Elangbam *et al*., 1997; Nollet *et al*., 2000), músculo, rim e lente ocular (Elangbam *et al*., 1997), células do miocárdio, células mesoteliais e pleurais (Wheelock *et al*., 2001). Esta caderina é expressa preferencialmente em células migratórias e em células de tecido conjuntivo (Christofori, 2003). Na espécie humana o gene CDH2 (caderina N) tem localização cromossómica em 18q11.2 (Nollet *et al*., 2000).

A caderina 4 (caderina R) é expressa no tecido neural (Nollet *et al*., 2000; Suzuki *et al*., 1991) e na retina (Suzuki *et al*., 1991; Wheelock *et al*., 2001) e o gene CDH4 (caderina R) na espécie humana tem localização cromossómica em 10q13.3 (Nollet *et al*., 2000).

Assim, cada subclasse homofílica de caderinas é caracterizada por um padrão de distribuição tecidular próprio e cada tipo celular pode ser caracterizado pela expressão de uma subclasse particular de caderinas ou de um conjunto de subclasses de caderinas (Campbell e Pignatelli, 2002; Takeichi, 1990, 1991)

### 2.1.2. ESTRUTURA

As caderinas são uma família de moléculas com estrutura comum e heteróloga (Shirayoshi *et al*., 1986). As caderinas clássicas partilham uma estrutura básica comum, com um domínio de passagem simples transmembranar, de ancoragem à membrana celular, que divide a molécula em domínio extracelular amino-terminal e domínio citoplasmático carboxi-terminal (Takeichi, 1990; Wheelock *et al*., 2001) (Figura 1).

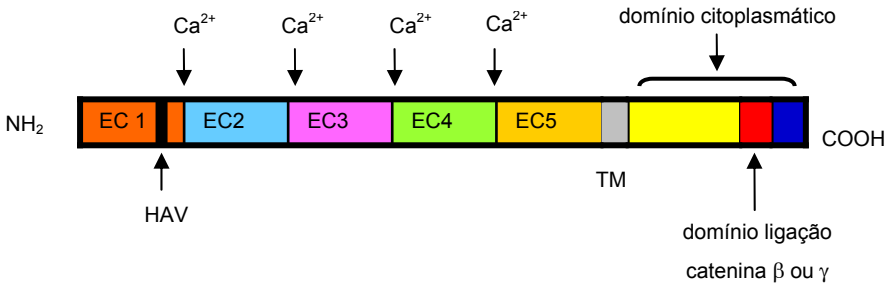



**Figura 1**. Representação esquemática da estrutura básica das caderinas clássicas (Adaptado de Wheelock *et al*., 2001).

A caderina é composta por um domínio extracelular (EC), um domínio transmembranar de passagem simples (TM) e por um domínio citoplasmático. O domínio extracelular contém cinco repetições (EC), ligadas por cálcio. O EC1 contém o tripeptido HAV e é responsável pela adesão célula-célula. O domínio citoplasmático contém o lugar de ligação às cateninas β ou γ (Adaptado de Wheelock *et al*., 2001).

As caderinas clássicas são constituídas por 723 a 748 aminoácidos (Takeichi, 1990). As caderinas de várias subclasses, mesmo de diferentes espécies animais, têm sequências de aminoácidos preservadas (Shirayoshi *et al*., 1986; Takeichi, 1991) e, numa mesma espécie, cerca de 50% dos aminoácidos mantêm-se constantes entre as caderinas. As sequências de aminoácidos preservadas variam com a região das moléculas, sendo que a maior percentagem é encontrada no domínio intracelular ou citoplasmático e o segundo domínio mais conservado é a região amino-terminal (Takeichi, 1990, 1991).

A superfamília das caderinas é caracterizada pelo domínio extracelular único, constituído por *tandem repeats*, designados de sub-domínios caderina ou sub-domínios EC (Suzuki, 1996; Yagi e Takeichi, 2000). O número de sub-domínios EC varia entre os membros da família das caderinas. O domínio extracelular contém os domínios conservados LDRE, DXNDN e DXD, com carga negativa e envolvidos na ligação de cálcio (Yagi e Takeichi, 2000).

As caderinas clássicas partilham a mesma estrutura do domínio extracelular que consiste em 5 sub-domínios estruturais extracelulares, que se ligam a iões cálcio ($Ca^{2+}$): EC1 a EC5 (Angst *et al*., 2001b; Gumbiner, 1996; Suzuki, 1996; Takeichi, 1995; Wheelock *et al*., 2001) (Figura 1). Cada sub-domínio é composto por aproximadamente 100-110 aminoácidos (Suzuki, 1996).

### 2.1.3. INTERACÇÃO CADERINA - CADERINA

Uma propriedade importante das caderinas na adesão celular epitelial é a sua especificidade de ligação, através de interacções homofílicas, ou seja, cada subtipo de caderina liga-se preferencialmente a tipos idênticos de caderinas nas células adjacentes (Angst *et al*., 2001a; Hirohachi, 1998; Takeichi, 1990, 1991, 1995; Takeichi *et al*., 2000).

Os domínios EC desempenham um papel crucial na adesão homofílica das caderinas na adesão celular (Wheelock *et al*., 2001; Yagi e Takeichi, 2000), mais especificamente o domínio EC1 (Handschuh *et al*., 2001). As caderinas clássicas caracterizam-se por, em todos os domínios EC1, terem uma sequência peptídica de reconhecimento da adesão celular altamente conservada, HAV (histidina-alanina-valina) (Nollet *et al*., 2000) (Figura 1). O domínio EC1 é o mais amino-terminal e é responsável não só pela actividade adesiva mas também pela especificidade das ligações das caderinas (Angst *et al*., 2001b; Patel *et al*., 2003; Wheelock *et al*., 2001). Mutações ou delecções neste domínio, resultam em moléculas que falham em promover a adesão celular (Wheelock *et al*., 2001).

As interacções homofílicas entre os domínios extracelulares das caderinas são um processo de dimerização lateral dos ectodomínios das caderinas da mesma superfície celular, seguido da formação de uma estrutura *zipper-like,* em que dímeros paralelos são capazes de se interdigitar com dímeros de células vizinhas, formando os pontos de adesão (Nollet *et al*., 2000; Paredes *et al*., 2007a; Pećina-Šlaus, 2003) (Figura 2). O domínio EC1 é essencial para a criação desta estrutura (Gumbiner, 1996). As caderinas podem assim dimerizar numa orientação *cis* (entre moléculas presentes na mesma célula), bem como *trans* (entre moléculas de células diferentes) (Patel *et al*., 2003). No entanto, o mecanismo subjacente à regulação da adesão homofílica do domínio extracelular das caderinas ainda é pouco compreendido (Gumbiner, 2000).

Para além do domínio extracelular, também o domínio intracelular (Ozawa e Kemler *et al*.,1998) e o domínio transmembranar (Huber et al, 1999) participam na regulação da dimerização lateral das caderinas, requerida para a adesão célula-a-célula.

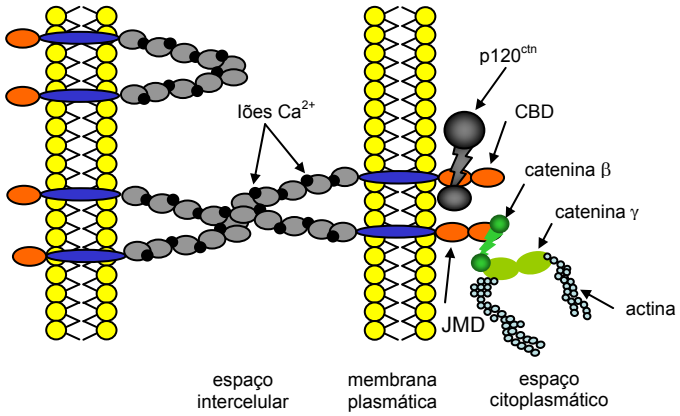



**Figura 2.** Representação esquemática do complexo caderina-catenina (Adaptado de Paredes *et al*., 2007a).

O $Ca^{2+}$ é um ião essencial para que as células mantenham contacto intercelular (Takeichi, 1990). As caderinas, tal como o nome indica (*cadherins* ou *calcium-dependent adherent proteins*) (Cailliez e Lavery, 2005; Patel *et al*., 2003), requerem a presença de $Ca^{2+}$ para a sua ligação, na ausência do qual são degradadas por acção das proteases (Ohene-Abuakwa e Pignatelli, 2000; Takeichi, 1977, 1990, 1991). Na ausência da ligação de cálcio, a junção entre o domínio EC1 e o EC2 comporta-se como uma articulação flexível, sendo o cálcio um pré-requisito para a associação dos dois monómeros EC1-EC2 e para a formação do *cis*-dímero (Cailliez e Lavery, 2005).

Assim, nas junções entre células epiteliais, os ectodomínios das caderinas são responsáveis pelo contacto celular (Nollet *et al*., 2000). No entanto, para uma completa funcionalidade é necessária a ligação estrutural com o citoesqueleto. Esta ligação é mediada por complexos proteicos específicos ligados à região citoplasmática das caderinas (Campbell e Pignatelli, 2002; Gumbiner, 1996; Nelson *et al*., 1990; Nollet *et al*., 2000; Takeichi *et al*., 2000). Assim, a ligação das caderinas ao citoesqueleto desempenha um papel na acção adesiva destas proteínas (Nagafuchi e Takeichi, 1988) e na polaridade celular (Nelson *et al*., 1990).

### 2.1.4. INTERACÇÃO CADERINA-CITOESQUELETO

A família das caderinas clássicas é definida pelo seu domínio citoplasmático bem preservado, que se associa às cateninas (Takeichi, 1995). O domínio citoplasmático das caderinas possui duas regiões altamente conservadas: o CBD (domínio de ligação à catenina), considerado o domínio de ligação à catenina β ou à placoglobina (catenina γ), e o MPCD (domínio conservado proximal à

membrana) (Nollet *et al*., 2000) ou JMD (domínio justamembranar) (Paredes *et al*., 2007a), que liga pelo menos a $p120^{ctn}$ (Nollet *et al*., 2000) (Figura 2).

#### 2.1.4.1. CATENINAS

As cateninas são uma família de proteínas que se ligam às caderinas no seu domínio citoplasmático e que permitem uma ligação indirecta destas últimas ao citoesqueleto de actina (Campbell e Pignatelli, 2002; Ozawa *et al*.,1989; Takeichi *et al*., 2000; Wheelock *et al*., 2001). A designação de cateninas tem origem em *catena,* a palavra em Latim para cadeia (Ozawa *et al*.,1989).

As cateninas incluem a catenina $\alpha$ (102 kDa), catenina $\beta$ (94 kDa), catenina $\gamma$ (82 kDa) ou placoglobina (Campbell e Pignatelli, 2002) e ainda $p120^{ctn}$ (Gumbiner, 2000).

A catenina $\beta$ e a catenina $\gamma$ (placoglobina) associam-se directamente com a caderina no seu domínio citoplasmático (Campbell e Pignatelli, 2002; Ozawa *et al*., 1990; Takeichi *et al*., 2000; Wheelock *et al*., 2001), numa forma de exclusão mútua e podem substituir-se uma à outra no complexo caderina-catenina (Reynolds *et al*., 1994). A catenina $\beta$ é uma proteína que é 65% semelhante à catenina $\gamma$ (Wheelock *et al*., 2001) e ambas pertencem à família das proteínas *Armadillo* (Nollet *et al*., 1999).

A catenina $\alpha$ é uma proteína que se associa indirectamente com a caderina, através da sua interacção directa com a catenina $\beta$ (Ozawa *et al*., 1990; Ozawa e Kemler, 1992; Wheelock *et al*., 2001) ou com a catenina $\gamma$, mediando a interacção entre o complexo caderina-catenina e o citoesqueleto de actina (Wheelock *et al*., 2001).

Uma catenina adicional, a $p120^{ctn}$, está a ser estudada como um importante factor regulador da capacidade de adesão celular das caderinas (Gumbiner, 2000; Reynolds *et al*., 1994; Wheelock *et al*., 2001). A proteína $p120^{ctn}$ está estruturalmente relaccionada com a catenina $\beta$ (Gumbiner, 2000; Reynolds *et al*., 1994) e interage directamente com o domínio citoplasmático das caderinas, mais concretamente com o domínio justamembranar citoplasmático, que é um local diferente do local de ligação das cateninas clássicas (Gumbiner, 2000). Assim, não parece estabelecer ligação das caderinas ao citoesqueleto de actina (Campbell e Pignatelli, 2002).

Proteínas adicionais tais como ZO1, actinina-$\alpha$ e vinculina interagem com as cateninas e permitem a ligação ao citoesqueleto de actina (Gumbiner, 2000; Wheelock *et al*., 2001).

Podem ser considerados pelo menos dois mecanismos diferentes para a regulação da adesão mediada pelas caderinas. Um baseado nas propriedades de ligação específicas das moléculas de caderina, em que cada tipo de caderina se liga preferencialmente ao seu tipo semelhante, o outro baseado na regulação fisiológica da actividade das caderinas pelas cateninas (Takeichi *et al*., 2000). Todos os componentes do complexo caderina-catenina são necessários para uma adesão célula-célula efectiva (Campbell e Pignatelli, 2002; Christofori, 2003).

### 2.1.5. FUNÇÕES E REGULAÇÃO DAS CADERINAS

A expressão das caderinas é crucial na embriogénese (Gumbiner, 1996; Takeichi, 1990; Wheelock *et al*., 2001), na morfogénese tecidular (Takeichi, 1991, 1995) e na manutenção da arquitectura tecidular normal (Wheelock *et al*., 2001). Assim, a manutenção da arquitectura tecidular adulta depende em grande parte da integridade estrutural e funcional das caderinas (Elangbam *et al*., 1997). O número de caderinas expressas numa célula afecta directamente a sua adesividade (Takeichi, 1991) e comportamento morfogenético (Steinberg e Takeichi, 1994), sendo que, de um modo geral, as células com menos moléculas de caderina têm menor capacidade de adesão (Takeichi, 1990, 1991). Assim, desde que as caderinas estejam funcionais, a inactivação de outros sistemas de adesão tem pouco efeito na adesão célula-célula (Takeichi, 1991).

Os mecanismos celulares de adesão e de sinalização parecem estar intimamente ligados (Christofori, 2003; Pećina-Šlaus, 2003). As junções caderina-catenina assemelham-se a sítios de sinalização intercelular (Takeichi *et al*., 2000), em que múltiplas vias de sinalização intracelular podem afectar o complexo de caderinas e a sua força de adesão, e a adesão mediada pelas caderinas pode iniciar uma sinalização intracelular (Knudsen e Wheelock, 2005). Assim, as moléculas de adesão podem induzir ou modular vias de sinalização clássicas associando-se ou activando receptores de tirosina kinase (RTK) e alguns RTK usam as moléculas de adesão como substrato, modulando a sua função (Christofori, 2003).

Deste modo, as caderinas não são só alvos para a sinalização que regula a adesão, mas podem elas mesmas enviar sinais que regulam processos básicos celulares (Pećina-Šlaus, 2003), e modulam a expressão génica e o destino celular (Semb e Christofori, 1998), nomeadamente migração, proliferação, apoptose, diferenciação celular (Pećina-Šlaus, 2003), sobrevivência, polarização, forma celular (Knudsen e Wheelock, 2005), controlo do crescimento e distribuição das proteínas citoplasmáticas (Braga, 1999).

Existem evidências de que a função das caderinas é regulada pela sua região citoplasmática (Nagafuchi e Takeichi, 1988; Ozawa e Kemler, 1998). Alterações na composição do complexo caderina-catenina (Gumbiner, 2000), fosforilação dos elementos do complexo (Christofori, 2003; Gumbiner, 2000; Matsuyoshi *et al*., 1992) e alterações na interação do complexo com o citoesqueleto de actina parecem desempenhar um papel na regulação da adesão celular (Gumbiner, 2000). As cateninas, juntamente com o papel estrutural que desempenham nas junções aderentes, regulam, duma forma dinâmica, a função de adesão mediada pelas caderinas (Morin, 1999; Ozawa et al, 1989; Takeichi *et al*., 2000; Wheelock *et al*., 2001).

Assim, a adesão célula-célula é um processo dinâmico regulado a vários níveis, nomeadamente transcrição génica (Knudsen e Wheelock, 2005), modificação pós-transcricional do complexo caderina/catenina (Gumbiner, 2000; Knudsen e Wheelock, 2005) e por várias vias de transdução de sinal (Pećina-Šlaus, 2003).

Pelo exposto, as caderinas/cateninas estão envolvidas em muitos processos biológicos que incluem a adesão celular, morfogénese, organização do citoesqueleto, distribuição/migração celular (Angst *et al*., 2001b), sinalização celular, reconhecimento celular, desenvolvimento embrionário e diferenciação celular (Campbell e Pignatelli, 2002), bem como em condições patológicas como o cancro (Angst *et al*., 2001b; Birchmeier, 2005; Nollet *et al*., 1999; Knudsen e Wheelock, 2005; Paredes *et al*., 2007a; Takeichi, 1991; Takeichi *et al*., 2000).

## 3. AS CADERINAS E A TUMORIGÉNESE

A transformação maligna é muitas vezes caracterizada por alterações na organização do citoesqueleto, diminuição da adesividade e sinalização aberrante mediada pela adesão (Conacci-Sorrel *et al*., 2002). A adesividade das células tumorais é significativamente menor do que nas células normais e a redução da adesividade é considerada indispensável para os passos iniciais e tardios da carcinogénese (Hirohashi, 1998). Assim, o controlo da adesão e da motilidade celular é um dos mecanismos cruciais responsáveis pela iniciação e progressão tumoral (Pećina-Šlaus, 2003).

A ruptura de adesão pode ocorrer por uma diminuição da expressão dos membros da família das caderinas ou das cateninas (Conacci-Sorrell *et al*., 2002; Matsuyoshi *et al*., 1992), pela perda da função das moléculas de caderinas expressas (Takeichi, 1991) ou por activação de vias de sinalização que previnem a união das zonas aderentes (Conacci-Sorrell *et al*., 2002).

A alteração da expressão das caderinas pelas células tumorais pode induzir adesões celulares novas ou inapropriadas e, consequentemente, sinalização intracelular alterada ou anormal (Wheelock *et al*., 2001). Alteração das funções das caderinas nas lesões malignas é provável que tenha efeitos na morfologia, comportamento celular e estadio de diferenciação do tumor (Campbell e Pignatelli, 2002), com aumento da migração e proliferação celular (Conacci-Sorrell *et al*., 2002), levando à invasão tumoral e a um maior potencial metastático (Conacci-Sorrell *et al*., 2002; Semb e Christofori, 1998). Assim, a capacidade dos carcinomas invadirem e metastizarem depende largamente do grau de diferenciação epitelial, com os menos diferenciados mais invasivos que os bem diferenciados (Frixen *et al*., 1991). Pensa-se que a caderina P é tão efectiva como a caderina E na supressão da invasão maligna (Bauer e Bosserhoff, 2006; Foty e Steinberg, 1997).

A perda de expressão das moléculas de adesão e das moléculas das junções celulares é importante na capacidade invasiva/motilidade das células no estroma envolvente. No entanto, as células neoplásicas que expressam estas moléculas podem ter vantagens de crescimento nos locais de metastização (Sommers *et al*., 1992).

O tipo de caderinas expressas por uma célula pode servir para identificar o seu tecido de origem, bem como identificar as alterações em relação ao fenótipo celular normal. As caderinas são marcadores

tumorais úteis na identificação da origem celular de um tumor, bem como para distinguir diferentes tipos de tumores, que sejam difíceis de diagnosticar pelas técnicas histológicas clássicas (Wheelock *et al*., 2001), ou seja, com diferentes histogéneses mas fenótipos similares (Ohene-Abuakwa e Pignatelli, 2000).

Certas caderinas que não são normalmente expressas por células epiteliais podem ser inapropriadamente expressas em certos tumores epiteliais, nomeadamente a caderina N (Pyo *et al*., 2007; Wheelock *et al*., 2001). A expressão aberrante de determinadas caderinas pode alterar significativamente o comportamento das células epiteliais (Wheelock *et al*., 2001). Assim, pensa-se que uma "troca de caderinas" esteja envolvida não só durante a embriogénese, mas também na tumorigénese (Christofori, 2003).

### 3.1 AS CADERINAS NA TUMORIGÉNESE MAMÁRIA

As unidades ducto-lobulares da glândula mamária humana são constituídas por duas camadas de células epiteliais que delimitam um lúmen central (Anderson, 2002; Cowin *et al*., 2005; Deugnier *et al*., 2002; Lester e Cotran, 1999; Wheelock *et al*., 2001). A dupla camada epitelial é constituída por uma camada contínua de células epiteliais luminais, rodeada por uma camada de células mioepiteliais (Anderson, 2002; Deugnier *et al*., 2002). O cancro da mama humano tem origem no epitélio ductal e lobular da glândula mamária (Berx e van Roy, 2001).

Na mulher, tal como nos felídeos (Lana *et al*., 2007), o carcinoma mamário é uma importante causa de morbilidade e mortalidade, o que torna fundamental a identificação dos eventos moleculares subjacentes aos mecanismos de invasão e metastização, de forma a desenvolver indicadores de prognóstico (Gamallo *et al*., 1993). Alterações na expressão das caderinas podem ser indicadores complementares de prognóstico (Madhavan *et al*., 2001), para além de as caderinas poderem também auxiliar como marcadores em tumores de mama raros, uma vez que estes têm distintos perfis de caderinas (Han *et al*., 1999).

A expressão diferencial da caderina E e P na glândula mamária humana identifica diferentes componentes celulares: as células epiteliais que revestem o lúmen e as células mioepiteliais que assentam sobre a membrana basal (Knudsen e Wheelock, 2005). A caderina E é necessária para a sobrevivência das células mamárias (Cowin *et al*., 2005) e integridade do tecido luminal (Daniel *et al*., 1995) e é expressa nas células epiteliais luminais, na área de contacto célula-célula (Berx e van Roy, 2001; Cowin *et al*., 2005; Daniel *et al*., 1995; Palacios *et al*., 1995; Wheelock *et al*., 2001). Estas células não expressam caderina P (Paredes *et al*., 2007a). Também na glândula mamária de canídeos (Restucci

*et al*., 1997; Sarli *et al*., 2004) e de felídeos (Dias Pereira e Gärtner, 2003) a caderina E é expressa nas células epiteliais luminais.

As células mioepiteliais desempenham um papel na extorsão do leite, na manutenção do fenótipo ductal (Knudsen e Wheelock, 2005), circundam a camada epitelial luminal (Cowin *et al*., 2005) e aderem entre si através da caderina P (Berx e van Roy, 2001; Cowin *et al*., 2005; Daniel *et al*., 1995; Palacios *et al*., 1995; Paredes *et al*., 2007a). A ligação entre as células epiteliais e as mioepiteliais não parece ser desempenhada por caderinas clássicas, mas sim por caderinas desmossomais (Cowin *et al*., 2005; Knudsen e Wheelock, 2005).

### 3.1.1. CADERINA E

A caderina E é a principal caderina expressa pelas células epiteliais (Knudsen e Wheelock, 2005; Shimoyama *et al*., 1989; Wheelock *et al*., 2001), as quais dão origem à maioria (80%) das neoplasias (Knudsen e Wheelock, 2005; Semb e Christofori, 1998; Wheelock *et al*., 2001). É uma das moléculas mais importantes na adesão célula-a-célula em tecidos epiteliais (Pećina-Šlaus, 2003; Semb e Christofori, 1998; Wheelock *et al*., 2001) e a sua diminuição ou perda de expressão é considerada um dos principais eventos moleculares responsáveis pela disfunção da adesão célula-a-célula (Pećina-Šlaus, 2003). Na sua ausência, a expressão de outras proteínas de adesão celular, não é suficiente para manter a adesão intercelular epitelial (Gumbiner, 1996).

Na maioria, se não em todos os carcinomas, a adesão celular mediada pela caderina E vai diminuindo com a progressão tumoral (Christofori, 2003; Shiozaki *et al*., 1991). Assim, a perda da expressão ou de função da caderina E é um passo importante na tumorigénese (Campbell e Pignatelli, 2002), nomeadamente em carcinomas da mama, fígado, pele, rim, pulmão (Semb e Christofori, 1998), estômago (Huiping *et al*., 2001; Semb e Christofori, 1998), cólon, próstata, esófago (Campbell e Pignatelli, 2002; Semb e Christofori, 1998), bexiga (Campbell e Pignatelli, 2002), ovário, pâncreas, cabeça e pescoço (Wheelock *et al*., 2001) e neoplasias orais (Pyo *et al*., 2007).

O epitélio lobular e ductal do tecido mamário normal tem forte expressão da caderina E a nível membranar, em humanos (Gamallo *et al*., 1993; Parker *et al*., 2001), canídeos (Restucci *et al*., 1997; Sarli *et al*., 2004) e felídeos (Dias Pereira e Gärtner, 2003). A sua perda ou *downregulation* tem sido associada à progressão do cancro da mama (Cowin *et al*., 2005).

Devido à frequente perda da adesão celular mediada pela caderina E em tumores epiteliais e à sua função como repressora da progressão tumoral (Semb e Christofori, 1998), esta molécula tem sido indicada como supressora tumoral (Knudsen e Wheelock, 2005; Pećina-Šlaus, 2003; Semb e Christofori, 1998; Welch *et al*., 2000; Wheelock *et al*., 2001). No entanto, este importante papel não está completamente clarificado (Cowin *et al*., 2005). Em felídeos existe um estudo realizado por Dias Pereira

e Gärtner, 2003 que sugere a caderina E como uma molécula de adesão celular com importante papel supressor tumoral.

A perda de adesão célula-a-célula mediada pela caderina E parece ser uma das muitas alterações envolvidas na progressão das células dos carcinomas para um fenótipo invasivo (Sommers *et al*., 1991) e metastático (Byers *et al*., 1995; Sommers *et al*., 1991). Assim, a caderina E parece actuar como um importante supressor de invasão (Christofori, 2003; Cowin *et al*., 2005; Frixen *et al*., 1991; Gumbiner, 1996; Pećina-Šlaus, 2003; Semb e Christofori, 1998) e de metastização celular em tumores epiteliais (Gumbiner, 1996; Knudsen e Wheelock, 2005; Pećina-Šlaus, 2003; Semb e Christofori, 1998; Welch *et al*., 2000), e pode servir como marcador de diferenciação em carcinomas humanos (Frixen *et al*., 1991). A função alterada da caderina E com aumento da invasão e potencial metastático pode resultar de duas alterações estruturais: perda da função adesiva célula-a-célula e aumento da motilidade celular/desdiferenciação celular (Braga, 1999; Foty e Steinberg, 1997; Handschuh *et al*., 1999, 2001). Tem sido proposto que a perda da adesão célula-a-célula mediada pela caderina E é um pré-requisito para a invasão celular tumoral e a formação de metástases (Christofori, 2003).

No carcinoma da mama da mulher, a perda parcial ou total da expressão da caderina E está associada a menor adesividade e maior invasividade (Berx e van Roy, 2001; Shimoyama e Hirohashi, 1991), de forma semelhante ao verificado em canídeos (Gama *et al*., 2008; Matos *et al*., 2006, 2007; Sarli *et al*., 2004). A adesão mediada pela caderina E pode prevenir a invasão (Gama *et al*., 2008) e metastização nos tumores mamários de canídeos (Gama *et al*., 2008; Matos *et al*., 2006), sendo que uma forte expressão da caderina E parece ser um bom indicador de fraca capacidade metastática (Matos *et al*., 2007). No entanto, Restucci *et al*., 1997 são da opinião de que uma única molécula de adesão é pouco provável que possa determinar a aquisição de um fenótipo neoplásico menos diferenciado e mais invasivo. Assim, a redução da adesão mediada pela caderina E sozinha não parece ser suficiente para resultar num aumento da motilidade celular (Handschuh *et al*., 2001; Sommers *et al*., 1991).

A expressão da caderina E em humanos correlaciona-se inversamente com o grau histológico (Berx e van Roy, 2001; Knudsen e Wheelock, 2005; Madhavan *et al*., 2001; Parker *et al*., 2001) e com o grau de diferenciação (Berx e van Roy, 2001; Knudsen e Wheelock, 2005). Num estudo em canídeos (Matos *et al*., 2006), não foi encontrada associação entre a diminuição da expressão da caderina E e o grau histológico, contrariamente ao trabalho de Gama *et al*., 2008.

A perda completa ou parcial da caderina E tem sido proposta como um indicador de mau prognóstico (Berx e van Roy, 2001), havendo no entanto opiniões contrárias que consideram que a caderina E não parece ter significado prognóstico na evolução clínica (Parker *et al*., 2001). Para Gamallo *et al*., 1993, a expressão de caderina E em carcinomas da mama está predominantemente relacionada com o tipo histológico e com o grau de diferenciação, mais do que com a invasão e potencial metastático. Um estudo em felídeos (Dias Pereira e Gärtner, 2003) sugere a elaboração de estudos numa casuística maior, a fim de avaliar a possibilidade da caderina E como indicador útil de prognóstico.

Em tumores mamários caninos, a perda de expressão da caderina E parece estar associada a factores de mau prognóstico (Matos *et al*., 2006, 2007), tais como tamanho tumoral, ulceração, tipo de crescimento (infiltrativo) (Gama *et al*., 2008; Matos *et al*., 2006), necrose (Matos *et al*., 2006), diferenciação, índice proliferativo (Gama *et al*., 2008), metástases ganglionares (Gama *et al*., 2008; Matos *et al*., 2006, 2007) e tipo histológico (Gama *et al*., 2008; Matos *et al*., 2006; Sarli *et al*., 2004).

A expressão da caderina E em carcinomas da mama na mulher parece assim ter valor prognóstico mínimo, mas tem um papel marcador de fenótipo (Parker *et al*., 2001). Quando se consideram os dois maiores subtipos histológicos do cancro da mama humano (ductais e lobulares) (Lester e Cotran, 1999), observam-se formas diferentes de expressão da caderina E (Berx e van Roy, 2001).

A maioria dos carcinomas lobulares tem ausência de expressão da caderina E (Berx *et al*., 1995; Berx e van Roy, 2001; Dillon *et al*., 1998; Gamallo *et al*., 1993; Goldstein *et al*., 2001; Mastracci *et al*., 2005; Parker *et al*., 2001), enquanto que os carcinomas ductais não têm perda de expressão ou têm perda parcial de expressão da caderina E (Berx *et al*., 1995; Berx e van Roy, 2001; Gamallo *et al*., 1993; Goldstein *et al*., 2001; Parker *et al*., 2001). Desta forma, a expressão da caderina E parece ser útil para distinguir lesões lobulares de lesões ductais (Gamallo *et al*., 1993; Goldstein *et al*., 2001; Han, 2004; Harigopal *et al*., 2005; Parker *et al*., 2001), apesar de terem sido descritos casos que diferiram deste padrão de expressão (Harigopal *et al*., 2005; Kowalski *et al*., 2003).

Em estudos de avaliação da expressão da caderina E em neoplasias mamárias malignas de felídeos (Dias Pereira e Gärtner, 2003) e de canídeos (Matos *et al*., 2006; Sarli *et al*., 2004), foi observada uma diminuição de células marcadas e da intensidade da marcação nos carcinomas sólidos, em comparação com os tubulares e tubulopapilares. Restucci *et al*., 1997 em carcinomas mamários de canídeos, para além da diminuição da positividade intercelular para a caderina E, com distribuição heterogénea e citoplasmática, chegaram mesmo a observar carcinomas sólidos e carcinomas de células escamosas com ausência de marcação para esta molécula de adesão. Noutro estudo com carcinomas de canídeos (Sarli *et al*., 2004) foi observado, nos carcinomas tubulopapilares predomínio do padrão membranar para a caderina E, nos carcinomas mistos predomínio do padrão citoplasmático, enquanto que nos carcinomas solidos o padrão era citoplasmático. Isto sugere que a expressão reduzida e a distribuição anormal da caderina E podem estar relacionadas com o grau de diferenciação das neoplasias (Restucci *et al*., 1997).

Num estudo imunohistoquímico realizado por Shiozaki *et al*., 1991 em tumores de esófago, estômago e de mama humanos, observaram que as células epiteliais normais expressavam sempre caderina E nos limites célula-célula, e que a expressão da caderina E estava reduzida em 45% dos tumores malignos. Para além disso, 68% dos tumores com diminuição da expressão da caderina E tinham expressão heterogénea de caderina E, sendo que algumas células tumorais com expressão heterogénea de caderina E, apresentavam um padrão difuso no citoplasma (Shiozaki *et al*., 1991). A diminuição da expressão da caderina E, perda de expressão membranar e expressão citoplasmática, é observada em muitas neoplasias malignas, sendo um indicador de função anormal da caderina E

(Campbell e Pignatelli, 2002). Assim, em carcinomas mamários humanos, o nível de expressão de caderina E pode ser reduzido e a sua localização celular anormal, ou seja, não restrita aos locais de interacção célula-célula (membranar) e com marcação citoplasmática para esta molécula (Knudsen e Wheelock, 2005; Kowalski *et al*., 2003; Parker *et al*., 2001). Esta situação pode dever-se a um defeito do mecanismo de transporte da proteína para a membrana ou por localização anormal ou ruptura da catenina $\alpha$, que pode levar a falha de ancoramento da proteína à membrana (Parker *et al*., 2001).

Num estudo sobre a expressão da caderina E em tumores mamários caninos, 50% dos carcinomas tinham diminuição da expressão da caderina E e metade deles tinha expressão heterogénea desta molécula de adesão (Sarli *et al*., 2004). Foi ainda verificado que na glândula mamária normal e em tumores mamários benignos predominava o padrão membranar, enquanto que o padrão citoplasmático foi mais frequente em tumores malignos, com incidência para os carcinomas sólidos. Sarli *et al*., 2004, sugerem que o padrão de expressão da caderina E tem maior valor que a intensidade de expressão, quando se comparam tumores benignos e malignos ou tipos histológicos.

Durante a tumorigénese epitelial, a adesividade da caderina E é frequentemente reduzida ou perdida por diferentes mecanismos (Braga, 1999; Pećina-Šlaus, 2003), nomeadamente genéticos e epigenéticos (Christofori, 2003; Hirohashi, 1998). Assim, as células tumorais possuem mecanismos reversíveis e irreversíveis de perda, *downregulation* ou silenciamento da caderina E (Conacci-Sorrell *et al*., 2002). Estes mecanismos têm sido implicados na carcinogénese mamária e a prevalência de cada um está relacionada com o subtipo histológico do cancro da mama (Cowin *et al*., 2005).

O gene da caderina E (CDH1) tem um papel na transformação celular maligna (Pećina-Šlaus, 2003), em que mutações ou delecções do gene CDH1 (Oda *et al*., 1994; Semb e Christofori, 1998) e perda da heterozigotia (LOH) em 16q22.1 são acontecimentos comuns em tumores humanos (Hirohashi, 1998; Pećina-Šlaus, 2003). A perda de heterozigotia em 16q é um dos eventos mais comuns (52,3%) em casos de cancro da mama, o que indica um papel significativo dos genes desta região cromossómica, nomeadamente do gene CDH1, neste tipo de cancro. Este evento parece estar associado com a perda da caderina E em carcinomas mamários humanos (Berx e van Roy, 2001).

A disfunção da caderina E pode resultar de um mecanismo de *two-hits*, uma combinação da perda de um alelo do CDH1 e mutação (Hirohashi, 1998; Huiping *et al*., 2001; Oda *et al*., 1994) ou metilação do promotor (Machado *et al*., 2001) no alelo restante, de forma similar ao mecanismo de inactivação de genes supressores tumorais clássicos. Em carcinomas lobulares o gene da caderina E também preenche os critérios de um gene supressor tumoral (Berx *et al*., 1995; Berx e van Roy, 2001; Cleton-Jansen, 2002). Assim, mutações somáticas adquiridas no gene CDH1 (mutações truncadas) foram encontradas em cerca de 56% dos tumores mamários lobulares, em combinação, em mais de 90% dos casos, com a perda do alelo *wild-type* (LOH do 16q22.1) (Berx e van Roy, 2001).

Num estudo realizado por Berx *et al*., 1995, todas as mutações descritas em carcinomas lobulares sem expressão da caderina E, eram na sequência HAV carboxi-terminal. Não foram encontradas mutações em carcinomas ductais (Berx *et al*., 1995; Berx e van Roy, 2001). Assim, apesar de também ocorrer LOH nos carcinomas ductais, a diminuição da expressão da caderina E deve-se a

outros mecanismos (Cleton-Jansen, 2002), tais como eventos epigenéticos por hipermetilação do promotor ou repressão transcripcional (Cowin *et al*., 2005).

A expressão do CDH1 em tumores mamários pode ser regulada por diversos mecanismos, nomeadamente inactivação por mutação, metilação da região promotora do CDH1 (hipermetilação da região promotora CpG island), delecção física de um alelo e *downregulation* transcripcional (Hiraguri *et al*., 1998), por factores de transcrição tais como Snail-1, factor transformante do crescimento β e SIP-1 (ZEB2), E2box *binding zink finger protein*, sobreexpressão do erbB-2 (Berx e van Roy, 2001; D'souza e Taylor-Papadimitriou, 1994), SLUG, ZEB-1, catenina β, Kaiso, E12/E47 e Twist (Cowin *et al*., 2005). Pasquali *et al*., 2007 não encontraram, no entanto, um aumento significativo da metilação do gene CDH1 em carcinomas mamários.

No que diz respeito a mutações germinativas no gene da caderina E, estas têm um papel importante no desenvolvimento do cancro gástrico (Brooks-Wilson *et al*., 2004; Gayther *et al*., 1998; Oliveira *et al*., 2002), no entanto a sua relação com a predisposição para o cancro da mama ainda não está provada (Keller *et al*., 1999; Salahshor *et al*., 2001).

A observação de que a frequência de tumores mamários positivos a receptores de estrogénio (Palacios *et al*., 1995; Parker *et al*., 2001) e progesterona é significativamente maior em casos de preservação da expressão da caderina E, do que os que têm redução da sua expressão, sugere que as hormonas esteróides podem modular, pelo menos em parte, a expressão da caderina E (Palacios *et al*., 1995). Assim, em tumores mamários existe uma relação entre o estadio ER-negativo e a perda de caderina E com o mau prognóstico (Cowin *et al*., 2005).

A progressão para o fenótipo metastático pode envolver a diminuição reversível da expressão da caderina E ao nível transcripcional (Conacci-Sorrell *et al*., 2002). Um achado interessante é que nos carcinomas mamários primários, a perda total ou parcial da expressão da caderina E não se reflete na expressão desta molécula a nível dos focos metastáticos (Berx e van Roy, 2001; Kowalski *et al*., 2003), sugerindo que mecanismos transitórios de *downregulation* do gene da caderina E possam estar envolvidos (Berx e van Roy, 2001). Assim, existem evidências crescentes de que as células cancerígenas podem re-expressar a caderina E quando invadem ou metastizam para locais diferentes do local do tumor primário (Kowalski *et al*., 2003).

Glukhova *et al*., 1995 sugerem que a interacção da caderina E com o citoesqueleto pode estar comprometida em muitas células que expressam caderina E na sua superfície. Assim, alterações na expressão das proteínas que fazem parte do complexo de adesão da caderina E, também prejudicam a adesão célula-a-célula mediada por esta (Semb e Christofori, 1998), nomeadamente a catenina α (Shimoyama *et al*., 1992) e a catenina β (Huiping *et al*., 2001; Kawanishi *et al*., 1995).

Juntamente com a perda da expressão da caderina E nos carcinomas lobulares infiltrativos na mulher, tem sido observada perda simultânea da expressão da catenina α e da catenina β (Berx e van Roy, 2001). Também em canídeos existe uma forte e significativa correlação entre a expressão da caderina E e da catenina β (Brunetti *et al*., 2005; Gama *et al*., 2008; Matos *et al*., 2007), com uma

diminuição da expressão membranar da caderina E e de catenina β em tumores mamários malignos comparativamente à glândula mamária normal (Gama *et al*., 2008). No entanto, a avaliação simultânea da expressão membranar da catenina β e da caderina E em tumores mamários de canídeos, não provou ter valor adicional na identificação de tumores mais agressivos, quando comparado com a avaliação unicamente da expressão da caderina E (Matos *et al*., 2007). Em carcinomas mamários caninos existe ainda uma relação inversa entre a expressão das moléculas de adesão $sLe^x$ e caderina E. A transformação maligna da glândula mamária é acompanhada pela expressão da $sLe^x$, sugerindo o seu uso como marcador de prognóstico tumoral (Pinho *et al*., 2007).

Shibata *et al*., 2004 mostraram que em células de cancro da mama deficientes em caderina E, a catenina $p120^{ctn}$ localizava-se no citoplasma, o que pode contribuir para o fenótipo invasivo destas células. A catenina $p120^{ctn}$ e a catenina β frequentemente exibem redução da sua marcação membranar ou citoplasmática, associadas à perda de caderina E. No que diz respeito à catenina β, a sua expressão citoplasmática está relacionada com o prognóstico (Paredes *et al*., 2008). Dillon *et al*., 1998 não encontraram correlação entre os níveis de expressão de $p120^{ctn}$ e os de caderina E, cateninas α e β, sugerindo uma regulação independente, apesar de haver uma correlação significativa entre a caderina E e as cateninas α e β.

A diminuição da caderina E em células de carcinomas da mama está muitas vezes relacionada com a expressão inapropriada de caderinas mesenquimais, tais como a caderina N e caderina 11 (Berx e van Roy, 2001; Christofori, 2003). A expressão da caderina N está relaccionada com a invasão e motilidade, sugerindo associação com maior agressividade (Berx e van Roy, 2001).

O modelo *multistep* da carcinogénese mamária, que sugere a transição de epitélio normal para carcinoma invasivo, via hiperplasia atípica e não atípica e carcinoma *in situ* ainda não está clarificado e a classificação morfológica de lesões pré-invasivas ainda é controversa (Reis-Filho e Lakhani, 2003). Embora a perda de expressão de caderina E seja um evento associado tanto a lesões lobulares *in situ* como a lesões invasivas, as bases moleculares que levam a essa perda são diferentes. Assim, as lesões lobulares *in situ,* pensa-se serem de risco para desenvolver doença invasiva, mas não lesões precursoras (Mastracci *et al*., 2005; Rieger-Christ *et al*., 2001). No entanto, novas tecnologias de genética molecular podem ajudar a identificar tecido ou lesões mamárias com risco elevado de desenvolvimento de cancro da mama invasivo (Anderson, 2002; Jeffrey e Pollack, 2003; Reis-Filho e Lakhani, 2003).

### 3.1.2. CADERINA P

A caderina P não tem sido investigada de forma tão intensiva como a caderina E, o que leva a que o seu papel em células normais e tumorais permaneça pouco conhecido (Taniuchi *et al*., 2005). No entanto, esta caderina pensa-se estar implicada na carcinogénese pancreática (Taniuchi *et al*., 2005),

endometrial (Stefansson *et al*., 2004), vesical (Mandeville *et al*., 2008) e mamária (Gamallo *et al*., 2001; Kovács *et al*., 2003; Palacios *et al*., 1995; Paredes *et al*., 2002a, 2002b, 2002c, 2005).

No tecido mamário humano normal não lactante, a caderina P e a caderina E são diferencialmente expressas (Palacios *et al*., 1995). A caderina P é expressa apenas nas células mioepiteliais (Gamallo *et al*., 2001; Kovács e Walker, 2003; Palacios *et al*., 1995; Paredes *et al*., 2002a; Peralta Soler *et al*., 2002; Wheelock *et al*., 2001) e nas células *cap* da glândula mamária, que são consideradas a população de *stem cell* da mama adulta (Wheelock *et al*., 2001). Contrariamente à caderina E, não está presente nas células epiteliais luminais (Gamallo *et al*., 2001; Palacios *et al*., 1995; Peralta Soler *et al*., 2002). Na glândula mamária canina normal não lactante, a caderina P também se encontra restrita às células mioepiteliais (Gama *et al*., 2002). Palacios *et al*., 1995 encontraram um padrão de expressão de caderina P em lesões mamárias benignas semelhante ao da glândula normal.

No tecido mamário humano normal lactante, a caderina P parece ser uma proteína secretada pelas células epiteliais luminais, mais do que uma proteína de adesão celular. No leite humano está presente um fragmento solúvel de 80kDa do domínio extracelular da caderina P (caderina-sP) em elevadas concentrações. Embora não seja claro se a caderina-sP tem origem nas células epiteliais ou nas mioepiteliais, parece ter localização epitelial, uma vez que a marcação imunohistoquímica parece ser citoplasmática, na superfície apical das células epiteliais. É possível que a caderina-sP tenha origem na clivagem proteolítica do domínio extracelular da caderina P e seja armazenada em vesículas no interior das células epiteliais, antes de ser secretada para o lúmen dos ductos; desconhece-se no entanto o seu papel. O padrão de expressão da caderina E nestes casos mantém-se inalterado (Peralta Soler *et al*., 2002). Também no tecido mamário canino lactante, pseudolactante ou em áreas com hiperplasia mamária pseudolactante, a caderina P foi encontrada em células epiteliais luminais secretoras e na secreção de leite (Gama *et al*., 2002).

Na glândula mamária normal, as células mioepiteliais parecem desempenhar um papel importante na manutenção da integridade tecidular (Glukhova *et al*., 1995) e parecem inibir as funções das células tumorais, através de uma combinação de supressão do crescimento, invasão e angiogénese (Adriance *et al*., 2005; Deugnier *et al*., 2002). A caderina P expressa nas células mioepiteliais da glândula mamária humana parece actuar como um regulador negativo do crescimento celular luminal (Adriance *et al*., 2005) e da diferenciação celular da glândula mamária (Radice *et al*., 1997). No tecido prostático normal, a caderina P representa um marcador epitelial basal, enquanto que no cancro da próstata se verifica a sua perda de expressão (Jarrard *et al*., 1997).

A perda da função mioepitelial está associada a carcinomas da mama e as células mioepiteliais malignas, por sua vez, em vez de actuarem como supressoras tumorais, podem induzir o crescimento, migração e invasão das células do carcinoma da mama e destruir a integridade da membrana basal (Adriance *et al*., 2005).

A caderina P é um marcador de carcinomas mamários do tipo basal (Arnes *et al*., 2005; Paredes *et al*., 2007b) e os tumores mamários de canídeos parecem ser modelos ideais para o estudo da expressão da caderina P, devido à elevada frequência de tumores com características de histogénese/diferenciação mioepitelial/células basais (Gama *et al*., 2002).

Apesar da caderina P não ser expressa no tecido mamário epitelial normal, um subtipo de carcinomas mamários humanos tem expressão aberrante de caderina P (Gamallo *et al*., 2001; Kovács *et al*., 2003; Palacios *et al*., 1995; Paredes *et al*., 2002a, 2002b, 2002c, 2005), nomeadamente os carcinomas ductais (Knudsen e Wheelock, 2005). Em canídeos também foi identificado um subtipo de tumores mamários com expressão aberrante da caderina P (Gama *et al*., 2004, 2008).

A expressão da caderina P em carcinomas da mama sugere a existência de carcinomas com características semelhantes a mioepitélio (Kovács *et al*., 2003; Palacios *et al*., 1995; Paredes *et al*., 2005). No entanto, a expressão da caderina P em tumores da mama não parece estar relacionado com fenótipo mioepitelial (Gamallo *et al*., 2001; Palacios *et al*., 1995), mas sim com expressão aberrante de marcadores mioepiteliais em células epiteliais (Palacios *et al*., 1995). Existem no entanto, tumores mamários com diferenciação mioepitelial (Foschini e Eusebi, 1998).

Várias teorias têm sido propostas para explicar a expressão aberrante da caderina P. Shimoyama e Hirohashi, 1991 propõem que a caderina P seja um membro da família das proteínas oncofetais, uma vez que se trata de uma molécula presente durante a embriogénese, mas com expressão fraca e focal nos tecidos adultos. Referem ainda que a sua expressão pode indicar a capacidade proliferativa dos carcinomas onde são aberrantemente expressas. Outra hipótese é que possa estar relacionada com uma origem histogenética nas células *cap* (Peralta Soler *et al*.,1999) ou com a aquisição de um fenótipo tumoral com características similares a este tipo celular (Gamallo *et al*., 2001; Peralta Soler *et al*., 1999). Estas células caracterizam-se pelo seu elevado índice proliferativo e por serem negativas a caderina E, negativas a ER e positivas a caderina P (Gamallo *et al*., 2001). Segundo Palacios *et al*., 1995, a expressão da caderina P pode indicar a capacidade proliferativa adquirida pelas células tumorais, em resposta à *downregulation* da caderina E, para a formação e manutenção de ninhos de células neoplásicas.

Apesar de o significado biológico da expressão da caderina P em carcinomas da mama (Gamallo *et al*., 2001; Palacios *et al*., 1995) e o seu papel na carcinogénese mamária não ser conhecido (Paredes *et al*., 2007a; Peralta Soler *et al*.,1999), esta molécula pode ser considerada um marcador de progressão do cancro da mama (Gamallo *et al*., 2001) e está associada com a perda da polaridade das células tumorais (Paredes *et al*., 2002c).

A expressão aberrante da caderina P em carcinomas mamários humanos parece estar correlacionada com o tamanho da lesão (Gamallo *et al*., 2001; Kovács *et al*., 2003), o grau histológico (Gamallo *et al*., 2001; Kovács *et al*., 2003; Palacios *et al*., 1995; Paredes *et al*., 2002a, 2002b, 2002c, 2005), o índice proliferativo (Paredes *et al*., 2002a, 2002b), a invasão (Paredes *et al*., 2004), o

comportamento tumoral agressivo (Paredes *et al*., 2002a, 2002b) e a metastização ganglionar (Gamallo *et al*., 2001). Também em carcinomas mamários de canídeos, a expressão aberrante da caderina P é sugerida como um marcador de agressividade biológica, significativamente relacionada com a malignidade e com o crescimento infiltrativo, mas sem associação com o grau de diferenciação tumoral (Gama *et al*., 2004; 2008).

Em carcinomas mamários humanos a expressão aberrante da caderina P parece também estar associada a tumores com ausência de receptores de estrogénio (Gamallo *et al*., 2001; Kovács *et al*., 2003; Paredes *et al*., 2002a, 2002b, 2002c, 2004, 2005) e de progesterona (Knudsen e Wheelock, 2005; Kovács *et al*., 2003), a tumores com expressão de EGF-R (Kovács *et al*., 2003; Paredes *et al*., 2007a), de c-erbB2 (Paredes *et al*., 2002a; Paredes *et al*., 2005) e de p53 (Paredes *et al*., 2005).

No que diz respeito ao tipo histológico dos carcinomas mamários, parece haver uma correlação com a expressão da caderina P (Palacios *et al*., 1995), em que quase metade dos carcinomas ductais invasivos da mama (cerca de 30 a 50%) apresentam expressão, sendo pouco frequente nos lobulares (Paredes *et al*., 2007a). Assim, a expressão da caderina P parece ser relevante na patogénese dos carcinomas do tipo ductal (Paredes *et al*., 2002c, 2007a), enquanto que nos lobulares o principal evento oncogénico é a perda da expressão da caderina E (Paredes *et al*., 2007a). Em carcinomas mamários de canídeos foi também encontrada uma associação entre a expressão da caderina P e o tipo histológico, com 100% de imunorreactividade à caderina P em carcinoma de células escamosas, carcinossarcomas e osteossarcomas (Gama *et al*., 2004).

Alguns autores (Gamallo *et al*., 2001; Palacios *et al*., 1995) observaram uma correlação significativa entre a expressão de caderina P e a redução da expressão da caderina E em carcinomas ductais invasivos. Gama *et al*., 2008 não encontraram em canídeos essa correlação entre a caderina E e a P.

Os distintos padrões da expressão da caderina P e da caderina E sugerem que ambas as caderinas têm papéis diferentes na carcinogénese mamária humana (Palacios *et al*., 1995) e que podem ser reguladas por vias celulares opostas (Gamallo *et al*., 2001; Paredes *et al*., 2002a, 2002b). Provavelmente, a expressão de caderina P em carcinomas da mama está relaccionada com um fenótipo independente das hormonas circulantes (Gamallo *et al*., 2001; Paredes *et al*., 2002a, 2002b), o que apoia a hipótese da regulação da expressão da caderina P por uma via independente de estrogénios (Paredes *et al*., 2002a). O gene CDH3 pode ser considerado como um gene reprimido por estrogénios e pensa-se que a falta de sinalização ER-$\alpha$ seja responsável pelo aumento da caderina P (Paredes *et al*., 2004, 2007a). Assim, a expressão aberrante da caderina P pode resultar da falta de sinalização de ER (Paredes *et al*., 2004).

A hipometilação do promotor do gene CDH3, tem sido um mecanismo proposto como regulador do gene da caderina P, uma vez que foi encontrada uma correlação estatisticamente significativa entre os padrões de metilação da citosina da região promotora do CDH3 da caderina P e os seus níveis de expressão proteica aberrante em carcinomas da mama (Paredes *et al*., 2005). A expressão da caderina

P também parece ser controlada pela via catenina-β, com a actividade do promotor da caderina P *up-regulated* pela activação desta catenina (Faraldo *et al*., 2007).

A expressão da caderina P foi considerada um factor de mau prognóstico por diversos autores (Han, 2004; Han *et al*., 1999; Paredes *et al*., 2002a, 2002b, 2005, 2007a; Peralta Soler *et al*., 1999). Contrariamente, Madhavan *et al*., 2001 consideraram a caderina P como um marcador de bom prognóstico e correlacionada com a expressão da caderina E, sugerindo uma via de regulação comum. Segundo Paredes *et al*., 2007a estes resultados contraditórios provavelmente podem resultar do uso de um anticorpo monoclonal com reacção cruzada com outras caderinas.

Peralta Soler *et al*., 1999 são da opinião de que a expressão da caderina P em carcinomas da mama representa um melhor factor de prognóstico do que a expressão alterada de outras caderinas ou cateninas, incluindo a diminuição da expressão da caderina E.

A perda da polaridade celular é um dos indicadores de indiferenciação celular e as moléculas de adesão normalmente permitem a estruturação espacial para o estabelecimento de um epitélio polarizado (Paredes *et al*., 2007a). A progressão do fenótipo epitelial polarizado normal para o fenótipo invasivo maligno pode ser atribuída, em parte, a uma perda da adesão intercelular mediada pela caderina E, com um aumento da motilidade celular e perda da polaridade celular (Paredes *et al*., 2002c). No entanto, estudos têm sugerido que outros mecanismos sejam capazes de induzir a perda de polaridade celular sem a perda de expressão da caderina E. Assim, a expressão aberrante da caderina P pode também ser responsável pela perda da polaridade celular (Paredes *et al*., 2007a).

Paredes *et al*., 2008 demonstraram que a maioria dos tumores mamários da mulher com expressão de caderina P e de caderina E estavam relacionados com a expressão citoplasmática das cateninas, essencialmente $p120^{ctn}$, e apresentavam pior sobrevida. Esta situação pode de alguma forma explicar a baixa sobrevida dos pacientes e a maior agressividade dos carcinomas da mama ductais, que mantêm a expressão da caderina E e expressam aberrantemente a caderina P. Colocaram a hipótese de provavelmente a caderina E ser importante para manter a agregação entre as células do cancro durante a invasão e o processo metastático, e de a caderina P ser a força condutora para tornar as células invasivas (Paredes *et al*., 2008). Assim, e apesar dos domínios justamembranares das caderinas P e E diferirem só em alguns aminoácidos, estas exercem funções opostas nas células tumorais: caderina E como supressor da motilidade (Paredes *et al*., 2007a) e caderina P fundamental na indução da invasão (Paredes *et al*., 2004, 2007a). Taniuchi *et al*., 2005 mostraram em adenocarcinomas ductais pancreáticos uma sobreexpressão da caderina P associada a um aumento da motilidade das celulas neoplásicas. Observaram também que a expressão da caderina P se encontrava correlacionada com a expressão citoplasmática de $p120^{ctn}$. Propõem que estas alterações possam estar associadas ao elevado grau de agressividade e ao potencial invasivo e metastático característicos deste tipo de tumores, ou seja, que a sobreexpressão da caderina P esteja relacionada com a agressividade biológica dos adenocarcinomas ductais pancreáticos.

# OBJECTIVOS

O presente trabalho teve como objectivo contribuir para o conhecimento da carcinogénese mamária em felídeos, bem como correlacionar com os conhecimentos já existentes da carcinogénese mamária em humanos e em canídeos, nomeadamente no que diz respeito às moléculas de adesão intercelular, caderina P e caderina E. Pretendeu-se colaborar no desenvolvimento e expansão na área da investigação da tumorigénese mamária felina, bem como despertar novos pontos de interesse para futuras investigações. Neste sentido, foram delineados vários objectivos específicos:

- Caracterizar do ponto de vista clínico-patológico e histopatológico as lesões mamárias em felídeos;
- Aplicar a técnica de imunohistoquímica automatizada nas amostras de tecidos mamários felinos;
- Determinar e avaliar a distribuição da expressão da caderina P pela técnica de imunohistoquímica na glândula mamária felina normal, lesões mamárias hiperplásicas e lesões neoplásicas;
- Determinar e avaliar a distribuição da expressão da caderina E pela técnica de imunohistoquímica na glândula mamária felina normal, lesões mamárias hiperplásicas e lesões neoplásicas;
- Correlacionar a imunoexpressão da caderina P e caderina E nos diferentes tecidos mamários;
- Determinar a imunoexpressão da caderina P em tumores mamários felinos como parâmetro de agressividade biológica.

# MATERIAL E MÉTODOS

# 1. MATERIAL

O material de estudo deste trabalho foi constituído por amostras de glândula mamária normal e de diferentes tipos de lesões mamárias de felídeos, pertencentes ao arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar - Universidade do Porto. As amostras de glândula mamária normal foram recolhidas em necrópsias do Serviço de Anatomia Patológica Veterinária do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar. As amostras de lesões mamárias foram obtidas por exéreses cirúrgicas de nódulos mamários de felídeos atendidos em clínicas veterinárias privadas da região Norte de Portugal e no Serviço de Cirurgia do Hospital Veterinário do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar.

O material enviado para o laboratório foi previamente fixado em formaldeído tamponado a 10%, sendo o tempo de fixação desconhecido, e posteriormente processado e incluído em parafina. As peças cirúrgicas eram acompanhadas de uma ficha de requisição de análise que incluía a identificação do animal e história clínica relevante, ainda que muitas vezes incompleta.

De entre o material disponível no arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, entre os anos 2005 e 2008, foram seleccionadas 61 amostras que incluíam glândula mamária normal (*n*=4), hiperplasia mamária (*n*=12), tumor mamário benigno (*n*=6) e tumor mamário maligno (*n*=39), procedentes de 54 felídeos do sexo feminino.

De cada lesão foram realizados cortes histológicos com 3µm de espessura para estudo histopatológico e imunohistoquímico.

# 2. MÉTODOS

## 2.1. AVALIAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA

De cada gata com lesões mamárias foram registados, sempre que possível, a raça, a idade, o estado reprodutivo e se submetida a terapia anticoncepcional. Foram também determinados parâmetros macroscópicos das lesões mamárias, tais como a localização na cadeia mamária (par torácico *vs* par abdominal), tamanho (cm) e presença de ulceração cutânea. É de notar que esta avaliação teve como base a informação disponível nas fichas de requisição que acompanhavam o material enviado ao laboratório.

## 2.2. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

De cada caso, foram efectuados cortes histológicos com 3 µm de espessura e corados pela coloração de rotina hematoxilina-eosina (H-E). Dois anatomopatologistas veterinários independentes foram responsáveis pelo diagnóstico histológico das lesões, de acordo com os critérios de diagnóstico propostos pela Organização Mundial de Saúde para tumores da glândula mamária de felídeos (Misdorp *et al*., 1999) (Quadro 1 - Introdução). Quando na mesma lesão se observaram áreas com diferentes padrões histológicos, a classificação foi feita com base no padrão morfológico predominante, tal como referido por Misdorp *et al*., 1999.

Como na gata, ao contrário do verificado na cadela, não existem ainda dados suficientes que permitam classificar os carcinomas mamários em função do valor prognóstico das diversas alterações histológicas (Misdorp *et al*., 1999), quando coexistiram várias neoplasias no mesmo animal, optou-se por considerar cada uma das lesões como uma entidade única.

Os tumores epiteliais malignos foram classificados segundo o seu grau histológico de acordo com a classificação modificada do sistema de *Bloom* e *Richardson* para as neoplasias mamárias humanas (Método de *Nottingham*) (Elston e Ellis, 1998) (Quadro 2).

### 2.2.1. MÉTODO DE *NOTTINGHAM*

O grau histológico tumoral foi determinado com base em três características morfológicas: a formação de túbulos, o pleomorfismo nuclear e a contagem de mitoses.

Pelo método de *Nottingham*, cada um dos parâmetros é pontuado numa escala de 1 a 3, o que resulta num total de 3 a 9 pontos. Para cada neoplasia a soma das pontuações é indicativa do grau histológico (grau 1, grau 2 e grau 3).

O grau histológico baseia-se na divisão arbitrária do total de pontos, nomeadamente: grau 1 (neoplasia bem diferenciada) - 3 a 5 pontos; grau 2 (neoplasia moderadamente diferenciada) - 6 a 7 pontos; grau 3 (neoplasia pouco diferenciada) - 8 a 9 pontos (Elston e Ellis, 1998) (Quadro 2).

**Quadro 2.** Resumo do método semi-quantitativo para determinação do grau histológico em carcinomas da mama (Adaptado de Elston e Ellis, 1998).

| ***Parâmetros avaliados*** | ***Pontuação*** |
|---|---|
| Formação de túbulos | |
| Frequente (>75%) | 1 |
| Moderada (10-75%) | 2 |
| Reduzida ou ausente (<10%) | 3 |
| Pleomorfismo nuclear | |
| Núcleos uniformes e regulares | 1 |
| Aumento moderado do tamanho e variabilidade | 2 |
| Variação marcada | 3 |
| Contagem de mitoses (Axioskop 40, 40x)* | |
| 0-8 mitoses | 1 |
| 9-18 mitoses | 2 |
| >19 mitoses | 3 |

*Na contagem de mitoses, a pontuação é calculada de acordo com a área tumoral observada. Estes valores referem-se à área observada num microscópio *Axioskop 40* , na objectiva de 40x (área=0,259mm$^2$).

Na determinação do número de figuras de mitose foram contados 10 campos de grande ampliação na periferia do tumor. Para minimizar a variabilidade associada aos diferentes modelos de microscópios, no que diz respeito ao diâmetro do campo de observação, recorreu-se ao auxílio de um gráfico que correlaciona o número de mitoses com o diâmetro do campo do microscópio utilizado (Gráfico 1).

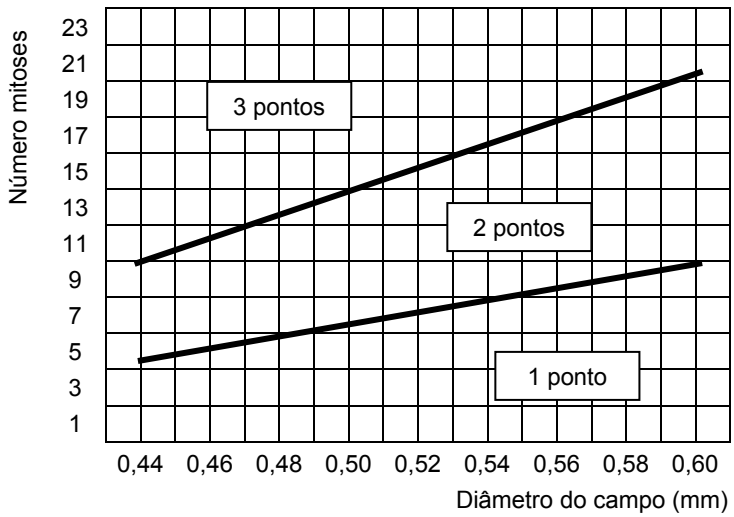



**Gráfico 1.** Correlação entre o diâmetro do campo do microscópio e o número de mitoses (Adaptado de Elston e Ellis, 1998).

No presente trabalho foi utilizado um microscópio Axioskop 40, com diâmetro de campo de observação de 0,575mm, na objectiva de 40x, pelo que, e de acordo com o Gráfico 1, 1 ponto corresponde a um número de mitoses até 8, 2 pontos a um número de mitoses entre 9 e 18, sendo que a 19 ou mais figuras de mitose correspondem 3 pontos.

Histologicamente, foi ainda determinada a presença de infiltrado inflamatório e de necrose, bem como o padrão de crescimento da lesão.

Nos carcinomas mamários com suspeita de produção de substância mucinosa, realizou-se a técnica de coloração de ácido periódico-*Schiff* (PAS) e PAS após diastase, segundo o protocolo descrito no Anexo I.

## 2.3. AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA

O uso de técnicas de imunohistoquímica em patologia veterinária tem algumas limitações devido à falta de anticorpos específicos para marcadores celulares em animais, uma vez que a maioria dos anticorpos específicos de marcadores celulares desenvolvidos nos últimos anos, foram preparados para reconhecer antigénios humanos (Cassali *et al*., 2001). No entanto, Cassali *et al*., 2001 demonstraram que através de um sistema de imunohistoquímica automatizado é possível usar marcadores humanos em patologia veterinária.

### 2.3.1. ANTICORPOS

A expressão da caderina P foi avaliada em cortes histológicos usando um anticorpo monoclonal de rato anti-caderina P humana, que reconhece o domínio extracelular desta molécula de adesão (clone 56, BD Transduction Laboratories, Lexington, Kentucky, USA).

A expressão da caderina E foi avaliada em cortes histológicos usando um anticorpo monoclonal de rato anti-caderina E humana, que reconhece o domínio citoplasmático desta molécula de adesão (clone 4A2C7, Zymed Laboratories, S. Francisco, California, USA).

De forma a determinar o fenótipo epitelial ou mioepitelial das células neoplásicas, foram utilizados anticorpos monoclonais contra proteínas específicas em cortes seriados. Como marcadores epiteliais foram utilizadas citoqueratinas de alto peso molecular, anticorpo monoclonal de rato anti-citoqueratina AE1/AE3 humana, que reconhece as queratinas epidermais humanas (clone AE1/AE3 (6,7), Chemicon International, Temecula, USA), com padrão de imunomarcação membranar/citoplasmática das células epiteliais. O marcador mioepitelial utilizado foi a proteína p63

(clone 4A4, Lab Vision Corporation - NeoMarkers, Fremont, USA) presente nas camadas basais e progenitoras de diversos tecidos epiteliais, com padrão de imunomarcação nuclear.

### 2.3.2. PROTOCOLO

Para a realização da técnica de imunohistoquímica, foram efectuados cortes histológicos com 3µm de espessura, para cada um dos anticorpos que se predendeu estudar. Os cortes foram colados em lâminas Dako REAL™ Capillary Gap Microscope Slides, Code. S2024 (75µm), lâminas essas providas de uma carga positiva que permite a adesão electrostática dos cortes às lâminas. A secagem dos cortes na lâmina efectuou-se numa estufa a 56ºC, durante a noite.

Para se obter uma optimização dos resultados, todas as técnicas de imunohistoquímica foram realizadas num aparelho de processamento automatizado DAKO TechMate$^{TM}$ 500 Plus Biotek Solutions, no Laboratório de Histopatologia do Instituto Português de Oncologia de Coimbra. Neste aparelho utilizam-se lâminas Dako REAL™ Capillary Gap Microscope Slides, Code. S2024 (75µm), que permitem que os fragmentos entrem em contacto com os reagentes por capilaridade. O protocolo de processamento imunohistoquímico automatizado encontra-se descrito no Anexo II. As grandes vantagens da imunohistoquímica automatizada são a qualidade melhorada, a reprodutibilidade, rapidez e a estandardização (Cassali *et al*., 2001).

Os anticorpos utilizados, respectivas diluições, tempos e temperaturas de incubação, bem como tratamentos efectuados para recuperação antigénica, encontram-se resumidos no Quadro 3.

O mamilo de mama humana foi utilizado como controlo positivo para os anticorpos caderina P, caderina E e proteína p63. No caso do anticorpo AE1/AE3 foi utilizado um fragmento de apêndice humano. Sempre que possível utilizou-se como controlo intrínseco positivo a pele e/ou glândula mamária normal adjacente às lesões mamárias.

**Quadro 3.** Anticorpos utilizados, respectivas diluições, tempos, temperaturas de incubação e tratamentos efectuados para recuperação antigénica.

| *Anticorpo* | *Mono/Policlonal* | *Marca* | *Clone* | *Diluição* | *Recuperação Antigénica* |
|---|---|---|---|---|---|
| Caderina P | monoclonal | BD Transduction Laboratories | 56 | 1:50 | EDTA pH 8, 2 ciclos de 10 minutos |
| Caderina E | monoclonal | Zymed | 4A2C7 | 1:100 | Tris/EDTA pH 9, 2 ciclos de 10 minutos |
| Citoqueratinas AE1/AE3 | monoclonal | Chemicon International | AE1, AE3 (6,7) | 1:1500 | Citrato pH 6, 2 ciclos de 10 minutos |
| p63 | monoclonal | Lab Vision – Neomarkers | 4A4 | 1:150 | Citrato pH 6, 2 ciclos de 10 minutos |

Numa primeira fase, a técnica de imunohistoquímica para a caderina E foi realizada com o anticorpo monoclonal de rato anti-caderina E (clone HECD-1, Zymed Laboratories, S. Francisco, California, USA), em diluições de 1:100 e de 1:50 e com recuperação antigénica em EDTA pH 8 e em EDTA pH 9, não se tendo conseguido obter qualquer marcação.

### 2.3.3. QUANTIFICAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO

#### 2.3.3.1. CADERINA P

A determinação da expressão da caderina P baseou-se numa avaliação semi-quantitativa de acordo com a percentagem de células epiteliais imunorreactivas, com um padrão de distribuição celular membranar e/ou citoplasmática. Utilizaram-se os seguintes parâmetros para classificar as lesões: 0 - <10% de células positivas; 1 - 10-25% de células positivas; 2 - 26-50% de células positivas; 3 - >50% de células positivas (Gama *et al*., 2004) (Quadro 4).

**Quadro 4.** Avaliação semi-quantitativa da imunoexpressão da caderina P.

| *Grupo* | *% de células imunopositivas* |
|---|---|
| 0 | <10% |
| 1 | 10-25% |
| 2 | 26-50% |
| 3 | >50% |

#### 2.3.3.2. CADERINA E

A expressão da caderina E foi determinada com base na percentagem estimada de células epiteliais com imunomarcação. De acordo com a percentagem de células positivas, as lesões mamárias foram agrupadas da seguinte forma: 0 - <25% de células positivas; 1 - 25-50% de células positivas; 2 - 50-75% de células positivas; 3 - >75% de células positivas (Matos *et al*., 2006) (Quadro 5).

**Quadro 5.** Avaliação semi-quantitativa da imunoexpressão da caderina E.

| *Grupo* | *% de células imunopositivas* |
|---|---|
| 0 | <25% |
| 1 | 25-50% |
| 2 | 50-75% |
| 3 | >75% |

Na avaliação imunohistoquímica da caderina E foi ainda determinado o padrão de expressão da molécula. A avaliação do padrão de expressão de caderina E baseou-se no local de marcação do anticorpo anti-caderina E, membranar e/ou citoplasmático. De acordo com o local de marcação na célula, as lesões mamárias foram agrupadas da seguinte forma: C - imunomarcação maioritariamente citoplasmática; M+C - imunomarcação equitativamente membranar e citoplasmática; M - imunomarcação maioritariamente membranar.

Para determinar o fenótipo epitelial ou mioepitelial das células das lesões mamárias utilizaram-se, respectivamente, os anticorpos monoclonais AE1/AE3 (positivo quando se observou marcação membranar/citoplasmática) e p63 (positivo quando se observou marcação nuclear).

### 2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise estatística foram efectuadas tabelas de contigência e o teste de *Likelihood Ratio Chi-Square*, utilizando o programa SAS/STAT®, 1989 (SAS Institute Inc., Cary NC, USA). As associações observadas foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p<0,05$. Os resultados da análise estatística foram expressos em frequências absolutas e relativas e organizados em quadros e gráficos para facilitar a sua exposição.

# RESULTADOS

**TECIDOS MAMÁRIOS FELINOS**

Os tecidos mamários em estudo (*n*=61) incluíam quatro glândulas mamárias normais (*n*=4; 6,56%), doze hiperplasias mamárias (*n*=12; 19,67%) e quarenta e cinco tumores mamários (*n*=45; 73,77%), dos quais seis foram classificados como benignos (*n*=6; 9,84%) e trinta e nove como malignos (n=39; 63,93%). As frequências absolutas dos tecidos mamários estudados encontram-se representadas no Gráfico 2.

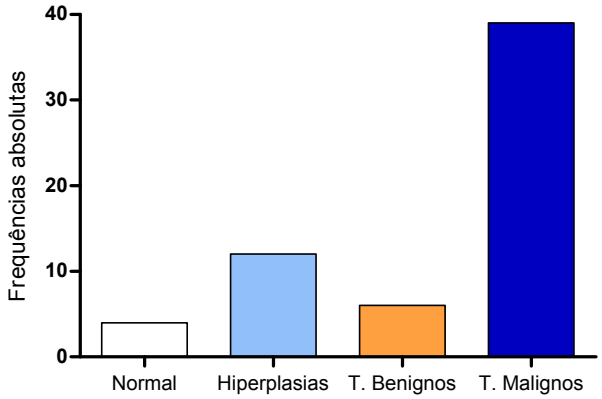



**Gráfico 2.** Frequências absolutas dos tecidos mamários estudados.

O principal objectivo do estudo foi caracterizar a expressão da caderina P na glândula mamária normal, hiperplásica e neoplásica, de forma a avaliar a caderina P como uma possível molécula marcadora de agressividade tumoral, e a sua comparação com a expressão de caderina E. Desta forma, revelou-se importante caracterizar os casos em estudo em termos clínico-patológicos.

## 1. AVALIAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA

No Quadro 6 encontram-se discriminadas as frequências absolutas e relativas de cada uma das variáveis clínico-patológicas analisadas, seguindo-se a sua descrição mais pormenorizada.

**Quadro 6.** Variáveis clínico-patológicas e respectivas frequências absolutas e relativas.

| ***Variáveis clínico-patológicas*** | ***n*** | ***%*** |
|---|---|---|
| Raça (*n*=51) | | |
| Europeu comum | 41 | 80,39 |
| Siamês | 10 | 19,61 |
| Idade (*n*=52) | | |
| <8 anos | 17 | 32,69 |
| 8-11 anos | 25 | 48,08 |
| >11 anos | 10 | 19,23 |
| Ovariectomia (*n*=48) | | |
| Não | 29 | 60,42 |
| Sim | 19 | 39,58 |
| Anticoncepcionais (*n*=34) | | |
| Não | 9 | 26,47 |
| Sim | 25 | 73,53 |
| Localização (*n*=41) | | |
| Torácica | 17 | 41,46 |
| Abdominal | 24 | 58,54 |
| Tamanho (*n*=46) | | |
| <2 cm | 19 | 41,30 |
| 2-3 cm | 12 | 26,09 |
| >3 cm | 15 | 32,61 |
| Ulceração (*n*=57) | | |
| Ausente | 49 | 85,96 |
| Presente | 8 | 14,04 |

*RAÇA*

Dos animais estudados, cuja raça se conhecia, predominaram os felídeos Europeu comum (*n*=41; 80,39%), sendo os restantes Siameses (*n*=10; 19,61%) (Quadro 6).

*IDADE*

A idade do animal era conhecida em 52 casos, tendo-se verificado que a idade média foi de 8,8 anos, num intervalo que variou entre os 2 e os 16 anos. Predominaram os felídeos com idades no intervalo entre os 8 e 11 anos (*n*=25; 48,08%) (Quadro 6). Nas alterações hiperplásicas da glândula mamária (*n*=9) a idade média foi de 5,22 anos (2-11 anos), nos tumores benignos (*n*=4) foi de 8,75 anos (4-11 anos) e nos tumores malignos (*n*=39) foi de 9,97 anos (6-16 anos).

*ESTADO REPRODUTIVO*

Relativamente ao estado reprodutivo dos animais estudados, não foi possível obter dados em 9 animais. Dos restantes 48 animais, 19 eram gatas castradas (ovariectomia/ovário-histerectomia) (39,58%) e 29 eram inteiras (60,42%) (Quadro 6). No que diz respeito às gatas inteiras sabia-se que 20 eram submetidas a terapia anticoncepcional, 4 não faziam este tipo de medicação, desconhecendo-se a situação das 5 restantes (Quadro 7).

**Quadro 7.** Historial reprodutivo dos animais em função das lesões mamárias.

| ***Lesões mamárias*** | ***Total de casos*** | ***Casos com história reprodutiva conhecida*** | ***Animais inteiros*** | ***Animais com terapia anticoncepcional*** | ***Animais castrados*** |
|---|---|---|---|---|---|
| Hiperplasias | 12 | 10 | 9 | 6 | 1 |
| Tumores benignos | 6 | 5 | 4 | 3 | 1 |
| Tumores malignos | 39 | 33 | 16 | 11 | 17 |

No grupo de animais com alterações hiperplásicas da glândula mamária, somente uma gata tinha sido submetida a castração, enquanto que das 9 que se sabia serem inteiras, 6 (66,67%) estavam sujeitas a terapia anticoncepcional. Nos animais com tumores benignos só uma gata tinha sido castrada, sendo que das 4 inteiras, 3 faziam medicação anticoncepcional, desconhecendo-se a situação da quarta. Quanto às gatas que desenvolveram tumores malignos, 17 (51,52%) tinham sido submetidas a castração e 16 (48,48%) eram inteiras. Destas últimas 11 eram sujeitas a terapia anticoncepcional (Quadro 7).

*LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES*

Relativamente à localização, dos dados disponíveis em 41 animais, a maioria das lesões mamárias foram detectadas ao nível das glândulas mamárias abdominais (*n*=24; 58,54%) (Quadro 6).

*TAMANHO*

No que diz respeito ao tamanho, a maioria dos tecidos mamários em estudo revelou dimensões iguais ou inferiores a 3 cm (*n*=31; 67,39%) (Quadro 6).

*ULCERAÇÃO CUTÂNEA*

Das 57 lesões mamárias estudadas apenas 8 (14,04%) apresentaram ulceração cutânea (Quadro 6).

## 2. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

### 2.1. CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA

A classificação histológica das lesões mamárias em estudo foi realizada de acordo com a classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para tumores mamários de felídeos, em cortes histológicos corados pela coloração de rotina hematoxilina-eosina (H-E) (Quadro 1, Introdução).

Os tipos histológicos da presente série, para além de glândula mamária normal, foram hiperplasias lobulares e alterações fibroadenomatosas, adenomas simples, fibroadenomas e um papiloma ductal, carcinomas tubulopapilares, carcinomas sólidos e um carcinoma cribiforme (Quadro 8) (Figuras 3 a 12).

Alguns dos carcinomas observados apresentavam áreas com produção de substância mucinosa, confirmada com a coloração de PAS e PAS após diastase (Figuras 13 a 15).

No Quadro 8 encontra-se discriminada a classificação histológica das lesões mamárias, bem como as frequências absolutas e relativas de cada uma das lesões observadas.

**Quadro 8.** Classificação histológica das lesões mamárias e respectivas frequências absolutas e relativas.

| ***Classificação histológica*** | ***n*** | ***%*** |
|---|---|---|
| Hiperplasias (*n*=12) | | |
| Hiperplasia lobular | 3 | 5,26 |
| Alteração fibroadenomatosa | 9 | 15,80 |
| Tumores benignos (*n*=6) | | |
| Adenoma simples | 2 | 3,51 |
| Fibroadenoma | 3 | 5,26 |
| Papiloma ductal | 1 | 1,75 |
| Tumores malignos (*n*=39) | | |
| Carcinoma tubulopapilar | 18 | 31,58 |
| Carcinoma sólido | 20 | 35,09 |
| Carcinoma cribiforme | 1 | 1,75 |

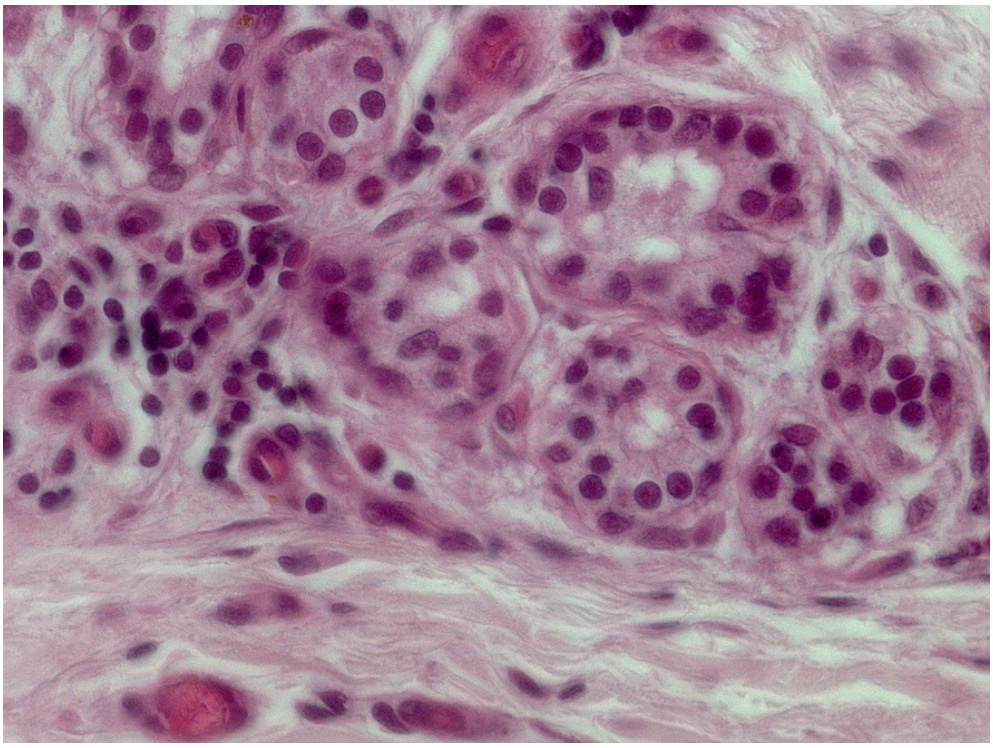


**Figura 3.** Glândula mamária: normal (Coloração de H-E, 630x).

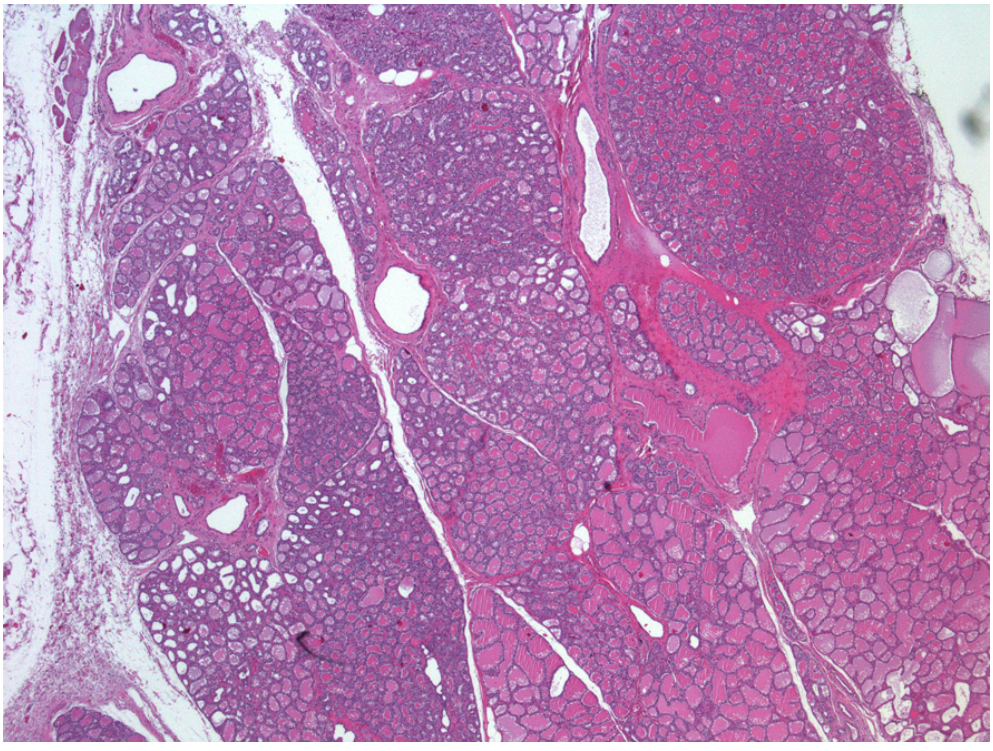


**Figura 4.** Glândula mamária: hiperplasia lobular (Coloração de H-E, 25x).

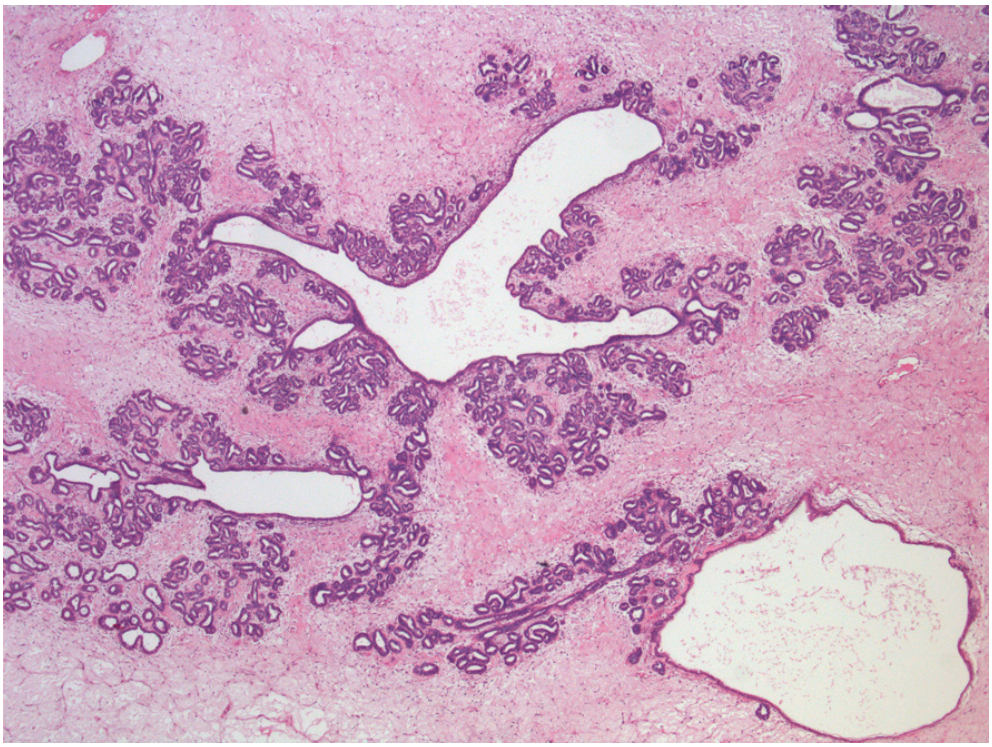


**Figura 5.** Glândula mamária: alteração fibroadenomatosa (Coloração de H-E, 25x).

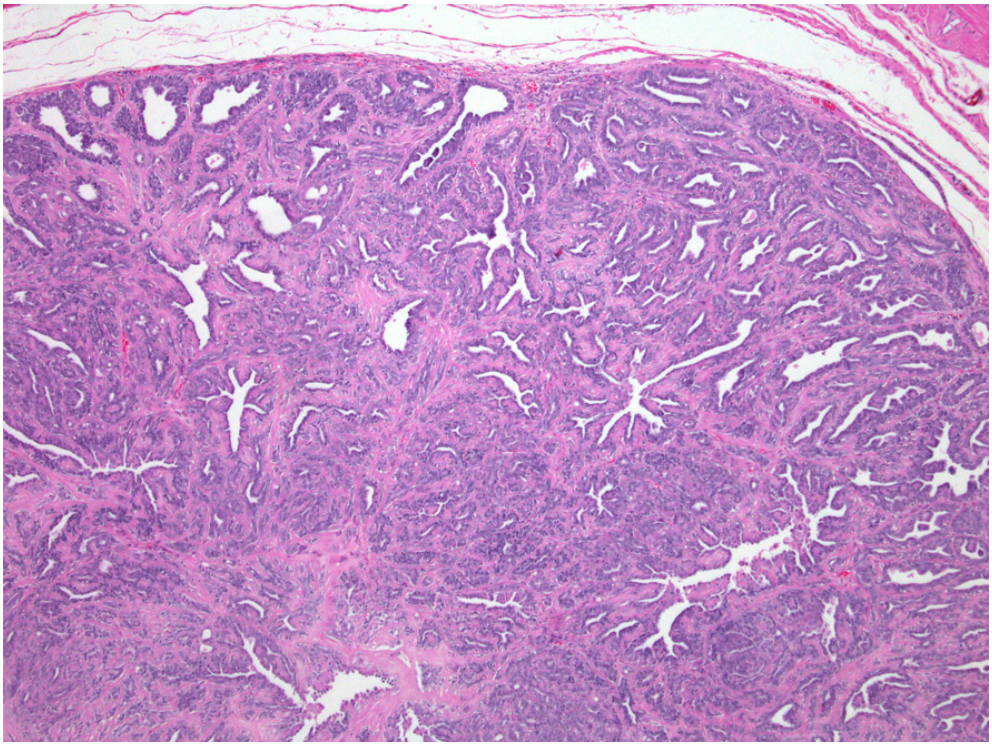


**Figura 6.** Glândula mamária: adenoma simples (Coloração de H-E, 50x).

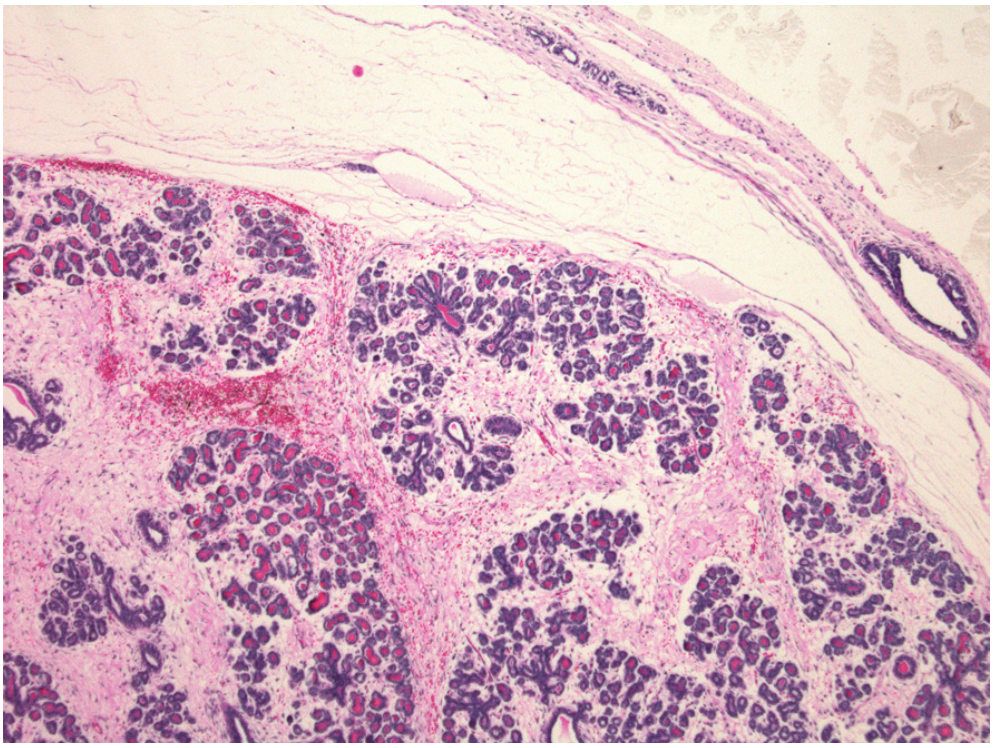


**Figura 7.** Glândula mamária: fibroadenoma (Coloração de H-E, 50x).

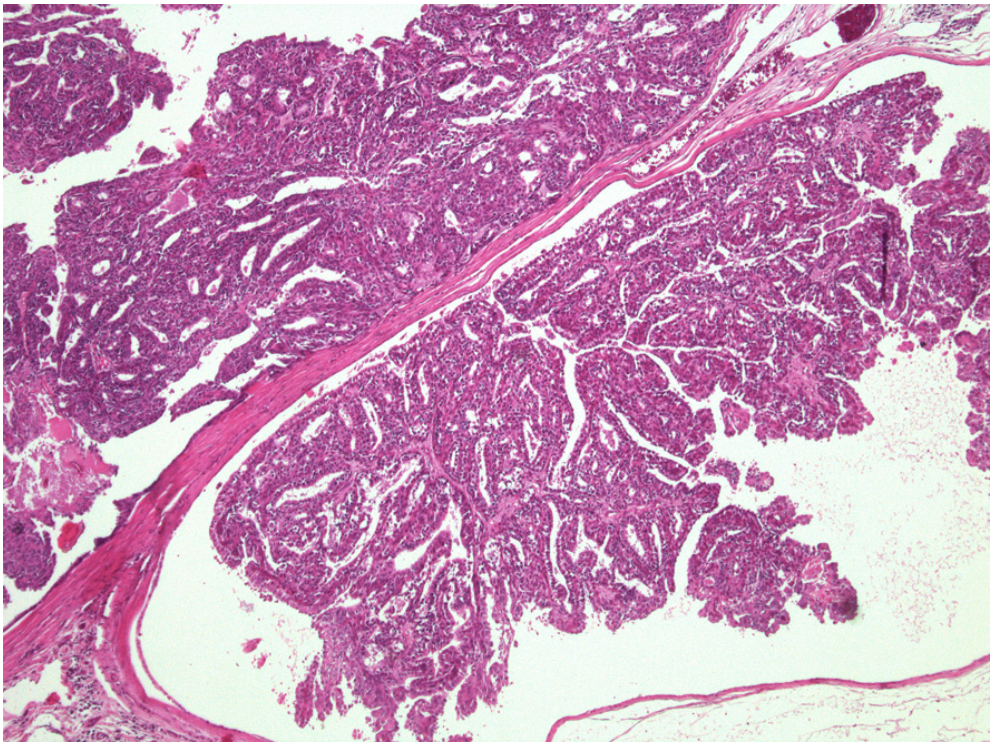


**Figura 8.** Glândula mamária: papiloma ductal (Coloração de H-E, 50x).

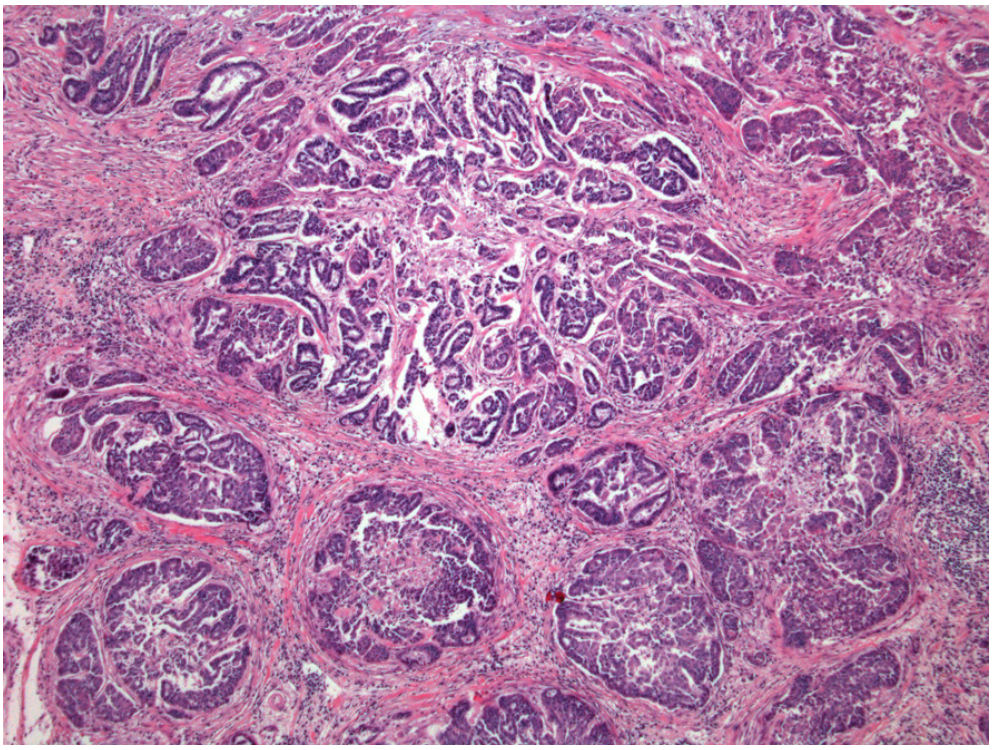


**Figura 9.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar (predominantemente tubular) (Coloração de H-E, 50x).

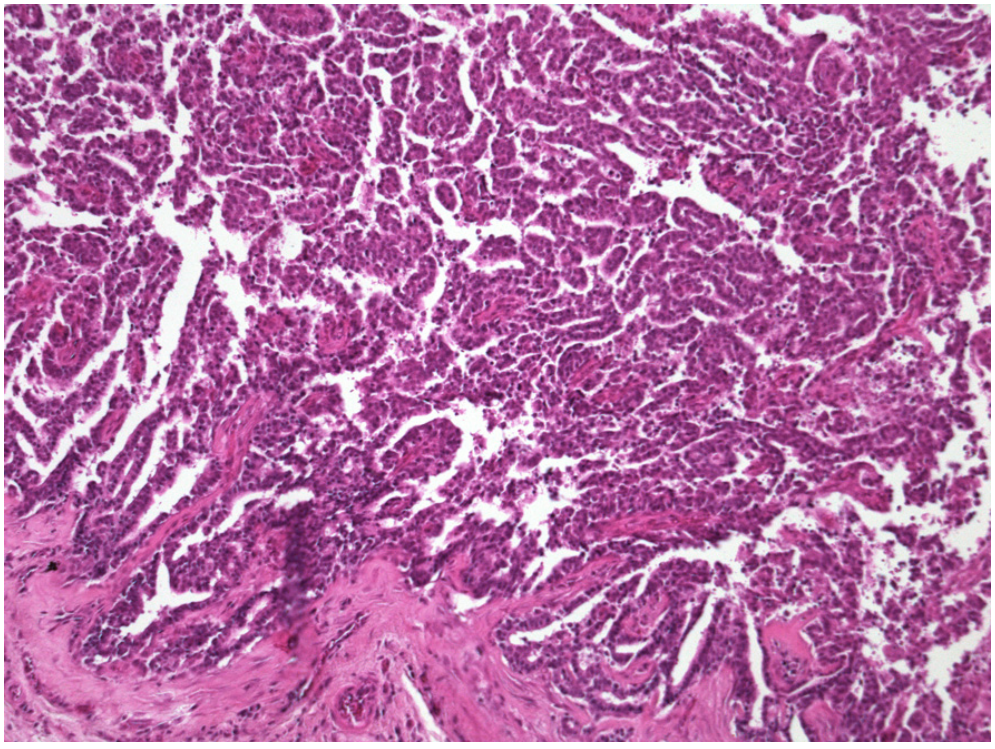


**Figura 10.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar (predominantemente papilar) (Coloração de H-E, 100x).

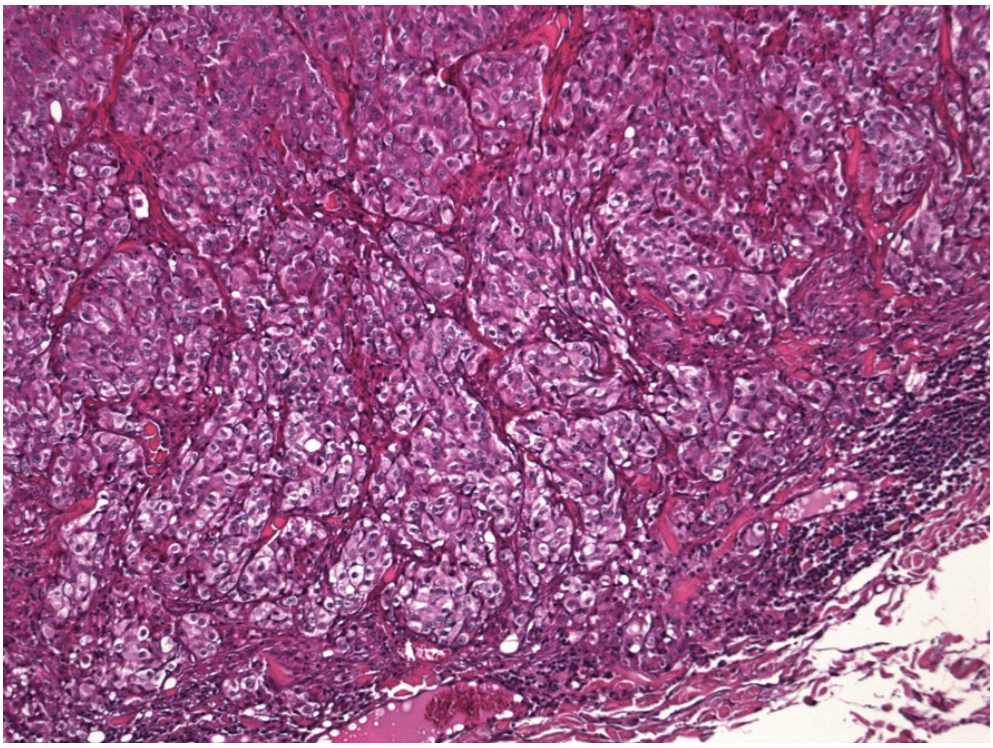


**Figura 11.** Glândula mamária: carcinoma sólido (Coloração de H-E, 100x).

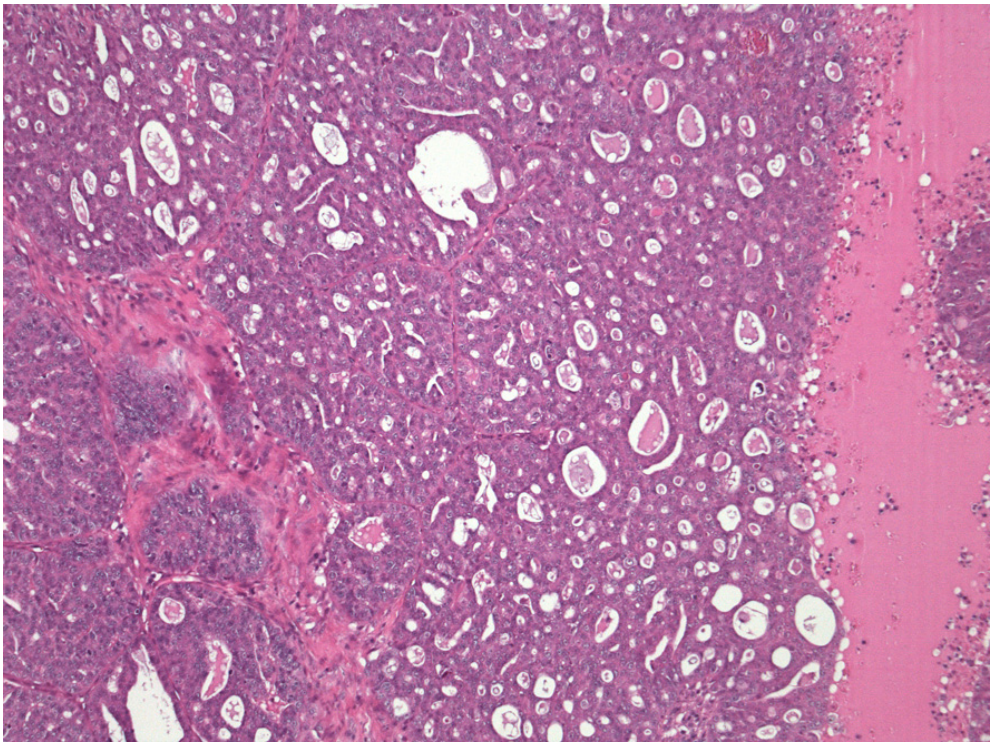


**Figura 12.** Glândula mamária: carcinoma cribiforme (Coloração de H-E, 100x).

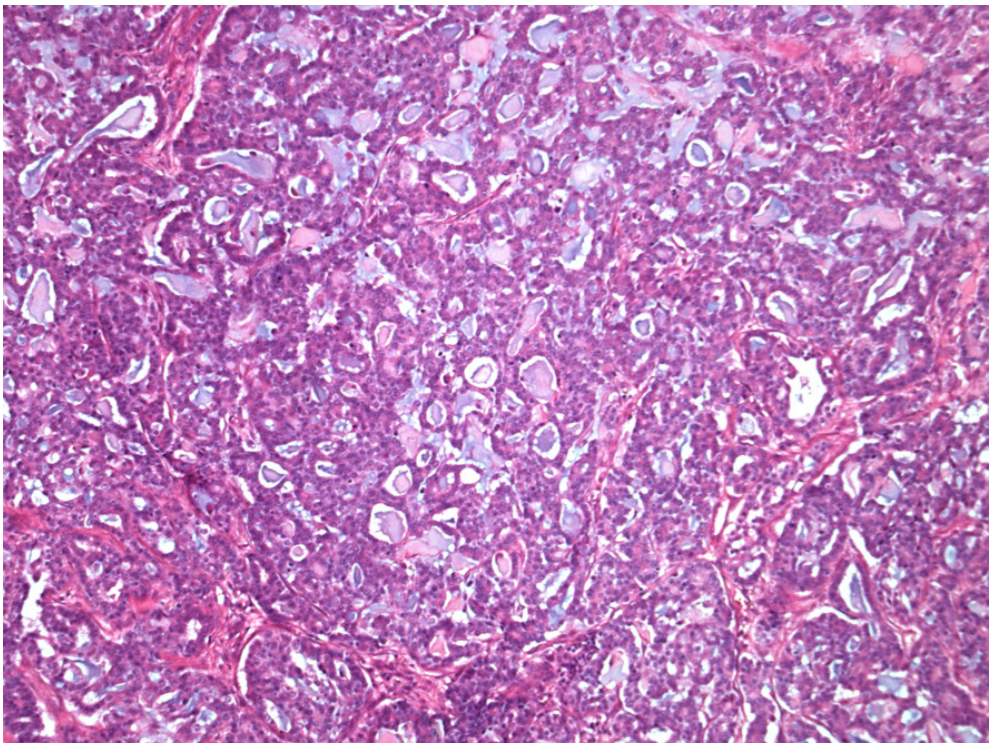


**Figura 13.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar com áreas com produção de substância mucinosa (Coloração de H-E, 100x).

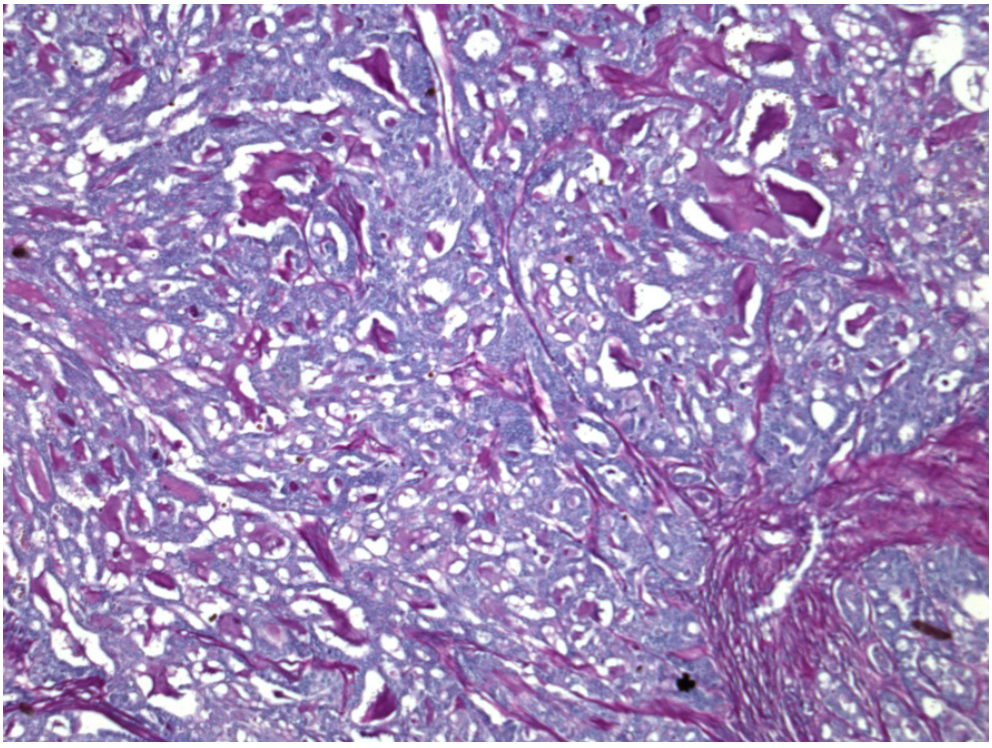


**Figura 14.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar com áreas com produção de substância mucinosa (Coloração de PAS, 100x).

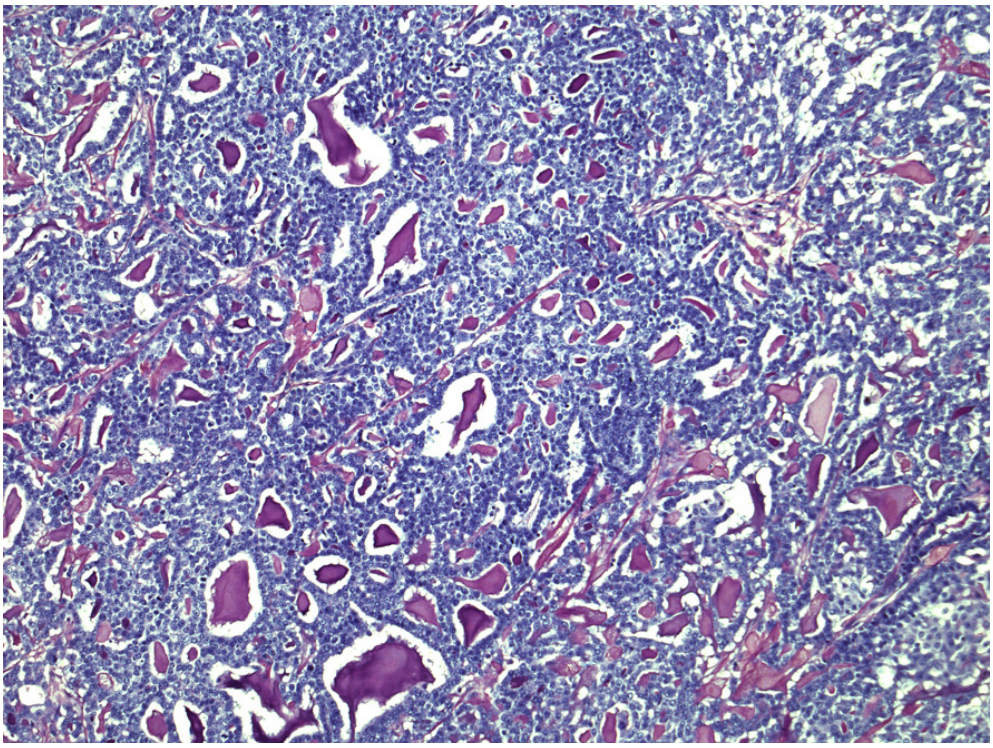


**Figura 15.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar com áreas com produção de substância mucinosa (Coloração de PAS após diastase, 100x).

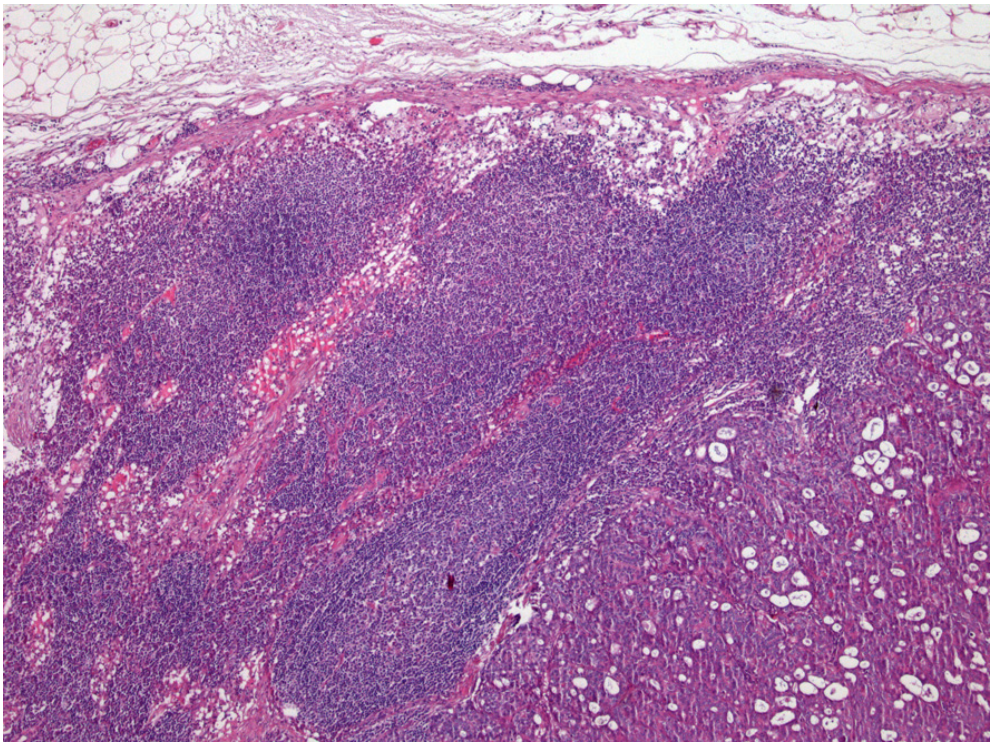


**Figura 16.** Gânglio linfático: metástase ganglionar de um carcinoma tubulopapilar (Coloração de H-E, 50x).

As frequências absolutas e relativas das variáveis clínico-patológicas nas diferentes lesões mamárias encontram-se resumidas no Quadro 9.

**Quadro 9.** Variáveis clínico-patológicas e suas frequências absolutas e relativas nas lesões mamárias.

| *Variáveis clínico-patológicas* | *Hiperplasias n (%)* | *Tumores benignos n (%)* | *Tumores malignos n (%)* | *Total n (%)* |
|---|---|---|---|---|
| Raça (*n*=51) | | | | |
| Europeu comum | 6 (75,00%) | 6 (100,00%) | 29 (78,38%) | 41 (80,39%) |
| Siamês | 2 (25,00%) | 0 (0,00%) | 8 (21,62%) | 10 (19,61%) |
| Idade (*n*=52) | | | | |
| <8 anos | 8 (88,89%) | 2 (40,00%) | 7 (18,42%) | 17 (32,69%) |
| 8-11 anos | 1 (11,11%) | 3 (60,00%) | 21 (55,26%) | 25 (48,08%) |
| >11 anos | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) | 10 (26,32%) | 10 (19,23%) |
| Ovariectomia (*n*=48) | | | | |
| Não | 9 (90,00%) | 4 (80,00%) | 16 (48,48%) | 29 (60,42%) |
| Sim | 1 (10,00%) | 1 (20,00%) | 17 (51,52%) | 19 (39,58%) |
| Anticoncepcionais (*n*=34) | | | | |
| Não | 2 (22,22%) | 0 (0,00%) | 7 (33,33%) | 9 (26,47%) |
| Sim | 7 (77,78%) | 4 (100,00%) | 14 (66,67%) | 25 (73,53%) |
| Localização (*n*=41) | | | | |
| Torácica | 1 (10,00%) | 4 (80,00%) | 12 (46,15%) | 17 (41,46%) |
| Abdominal | 9 (90,00%) | 1 (20,00%) | 14 (53,85%) | 24 (58,54%) |
| Tamanho (*n*=46) | | | | |
| <2 cm | 4 (36,36%) | 4 (66,67%) | 11 (37,93%) | 19 (41,30%) |
| 2-3 cm | 2 (18,18%) | 1 (16,67%) | 9 (31,03%) | 12 (26,09%) |
| >3 cm | 5 (45,45%) | 1 (16,67%) | 9 (31,03%) | 15 (32,61%) |
| Ulceração (*n*=57) | | | | |
| Ausente | 12 (100,00%) | 6 (100,00%) | 31 (79,49%) | 49 (85,96%) |
| Presente | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) | 8 (20,51%) | 8 (14,04%) |

As lesões mamárias foram ainda avaliadas em termos de infiltrado inflamatório, presença de necrose e padrão de crescimento, encontrando-se as frequências absolutas e relativas de cada uma das variáveis histopatológicas discriminadas no Quadro 10. De seguida apresenta-se a sua descrição mais pormenorizada.

**Quadro 10.** Variáveis histopatológicas e respectivas frequências absolutas e relativas.

| *Variáveis histopatológicas* | *n* | *%* |
|---|---|---|
| Infiltrado inflamatório (*n*=57) | | |
| Escasso/ausente | 25 | 43,86 |
| Moderado | 13 | 22,81 |
| Intenso | 19 | 33,33 |
| Necrose (*n*=57) | | |
| Ausente | 19 | 33,33 |
| Presente | 38 | 66,67 |
| Padrão de crescimento (*n*=57) | | |
| Expansivo | 20 | 35,09 |
| Infiltrativo | 37 | 64,91 |

*INFILTRADO INFLAMATÓRIO*

Em 56,14% (*n*=32) dos casos foi observado infiltrado de células inflamatórias moderado a intenso, na maioria das vezes no estroma peri-tumoral, constituído predominantemente por células da linha linfoplasmocitária (Quadro 10).

*NECROSE*

Observou-se a presença de necrose em 66,67% (*n*=38) dos tecidos avaliados. Caracterizou-se por focos isolados e/ou extensas áreas de células necrosadas (Quadro 10).

*PADRÃO DE CRESCIMENTO*

O padrão de crescimento infiltrativo foi o mais observado (*n*=37; 64,91%) nas lesões mamárias em estudo (Quadro 10).

As frequências absolutas e relativas das variáveis histopatológicas nas diferentes lesões mamárias encontram-se resumidas no Quadro 11.

**Quadro 11.** Variáveis histopatológicas e suas frequências absolutas e relativas nas lesões mamárias.

| *Variáveis histopatológicas* | *Hiperplasias* *n* (%) | *Tumores benignos* *n* (%) | *Tumores malignos* *n* (%) | *Total* *n (%)* |
|---|---|---|---|---|
| Infiltrado inflamatório (*n*=57) | | | | |
| Escasso/ausente | 11 (91,67%) | 5 (83,33%) | 9 (23,08%) | 25 (43,86%) |
| Moderado | 0 (0,00%) | 1 (16,67%) | 12 (30,77%) | 13 (22,81%) |
| Intenso | 1 (8,33%) | 0 (0,00%) | 18 (46,15%) | 19 (33,33%) |
| Necrose (*n*=57) | | | | |
| Ausente | 12 (100,00%) | 4 (66,67%) | 3 (7,69%) | 19 (33,33%) |
| Presente | 0 (0,00%) | 2 (33,33%) | 36 (92,31%) | 38 (66,67%) |
| Padrão de crescimento (*n*=57) | | | | |
| Expansivo | 12 (100,00%) | 6 (100,00%) | 2 (5,13%) | 20 (35,09%) |
| Infiltrativo | 0 (0,00%) | 0(0,00%) | 37 (94,87%) | 37 (64,91%) |

## 2.2. GRAU HISTOLÓGICO

Foi determinada a graduação histológica no grupo dos 39 tumores epiteliais malignos de acordo com os parâmetros descritos no Quadro 2 (Material e Métodos), encontrando-se as frequências absolutas e relativas de cada grau discriminadas no Quadro 12.

**Quadro 12.** Graduação histológica e respectivas frequências absolutas e relativas.

| ***Graduação histológica*** | ***n*** | ***%*** |
|---|---|---|
| Grau histológico (*n*=39) | | |
| Grau 1 | 17 | 43,59 |
| Grau 2 | 17 | 43,59 |
| Grau 3 | 5 | 12,82 |

Prevaleceram os graus histológicos 1 (*n*=17; 43,59%) e 2 (*n*=17; 43,59%), ou seja, as neoplasias bem diferenciadas e moderadamente diferenciadas.

No Quadro 13 podem visualizar-se os diferentes graus histológicos, em função do tipo histológico de carcinomas em estudo.

**Quadro 13.** Graduação histológica dos diferentes tipos histológicos de carcinomas avaliados.

| ***Tipo histológico*** | ***n*** | ***Grau 1*** ***n (%)*** | ***Grau 2*** ***n (%)*** | ***Grau 3*** ***n (%)*** |
|---|---|---|---|---|
| Carcinoma tubulopapilar | 18 | 14 (77,78%) | 3 (16,67%) | 1 (5,55%) |
| Carcinoma sólido | 20 | 3 (15,00%) | 13 (65,00%) | 4 (20,00%) |
| Carcinoma cribiforme | 1 | 0 (0,00%) | 1 (100,00%) | 0 (0,00%) |
| Total | 39 | 17 (43,59%) | 17 (43,59%) | 5 (12,82%) |

A maioria dos carcinomas tubulopapilares (*n*=14; 77,78%) era grau 1, enquanto que a maioria dos carcinomas sólidos (n=17; 85%) era graus 2 e 3.

## 2.3. METÁSTASES

Relativamente à ocorrência de metástases, apenas três casos apresentaram metastização na altura do diagnóstico (*n*=3; 5,26%), com envolvimento de gânglios linfáticos regionais (Figura 16), correspondentes a dois carcinomas tubulopapilares (grau 1) e a um carcinoma sólido (grau 3).

# 3. AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA

## 3.1 IMUNOEXPRESSÃO DA CADERINA P NO TECIDO MAMÁRIO FELINO

A determinação da expressão da caderina P ao nível das células epiteliais do tecido mamário normal e de lesões mamárias, de acordo com os parâmetros descritos no Quadro 4 (Material e Métodos), encontra-se resumida no Quadro 14 e descreve-se em seguida.

**Quadro 14.** Imunorreactividade dos tecidos mamários para o anticorpo anti-caderina P.

| *Tecidos mamários* | *n* | *Imunorreactividade para a caderina P* | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | *0* | *1* | *2* | *3* |
| Glândula mamária normal | 4 | 4 (100,00%) | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) |
| Hiperplasia lobular | 3 | 3 (100,00%) | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) |
| Alteração fibroadenomatosa | 9 | 9 (100,00%) | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) |
| Adenoma simples | 2 | 2 (100,00%) | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) |
| Fibroadenoma | 3 | 3 (100,00%) | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) |
| Papiloma ductal | 1 | 1 (100,00%) | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) |
| Carcinoma tubulopapilar | 18 | 6 (33,33%) | 5 (27,78%) | 4 (22,22%) | 3 (16,67%) |
| Carcinoma sólido | 20 | 7 (35,00%) | 5 (25,00%) | 4 (20,00%) | 4 (20,00%) |
| Carcinoma cribiforme | 1 | 1 (100,00%) | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) |
| Total | 61 | 36 (59,02%) | 10 (16,39%) | 8 (13,11%) | 7 (11,48%) |

**0** - <10%; **1** - 10-25%; **2** - 25-50%; **3** - >50%.

Nos tecidos mamários estudados os anticorpos AE1/AE3 e p63 exibiram imunomarcação diferencial. A p63 apresentou imunorreactividade apenas nas células mioepitelias, com marcação nuclear (Figura 17). A AE1/AE3 marcou as células epiteliais a nível membranar/citoplasmático (Figura 18).

### *3.1.1. GLÂNDULA MAMÁRIA NORMAL (n=4)*

Na glândula mamária normal não lactante, a caderina P encontrava-se restrita ao componente mioepitelial. A imunorreactividade nas células mioepiteliais foi observada a nível membranar como também a nível citoplasmático (Figura 19) (Quadro 14).

No tecido mamário lactante ou pseudo-lactante, a caderina P encontrava-se em algumas células epiteliais luminais secretoras e na secreção, para além da sua localização no mioepitélio. A expressão da caderina P nas células luminais secretoras foi essencialmente citoplasmática, com um padrão de expressão semelhante ao de células apócrinas epiteliais, com marcação na zona apical da célula (Figura 20).

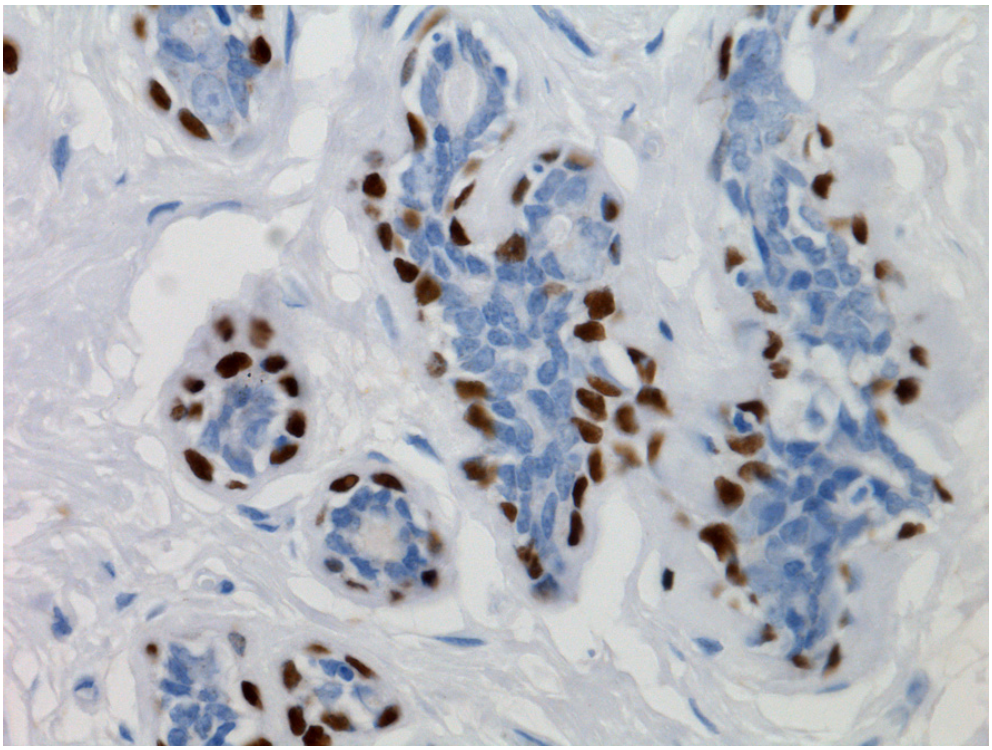


**Figura 17.** Glândula mamária: normal. Imunorreactividade nuclear para a p63 (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x).

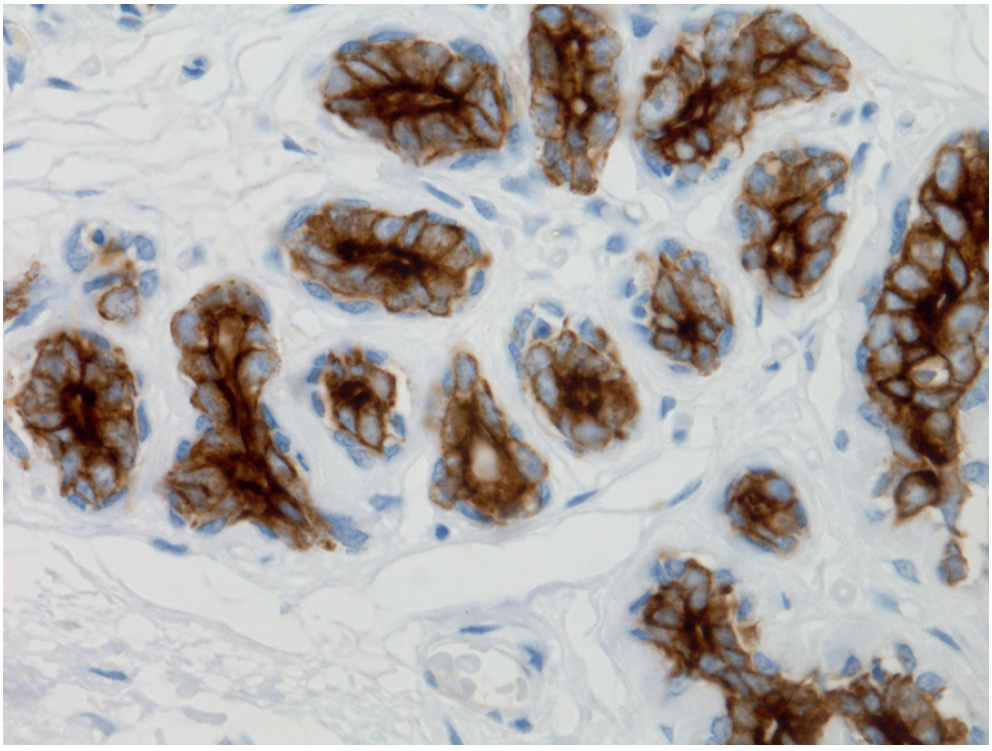


**Figura 18.** Glândula mamária: normal. Imunorreactividade membranar e citoplasmática para a AE1/AE3 (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x).

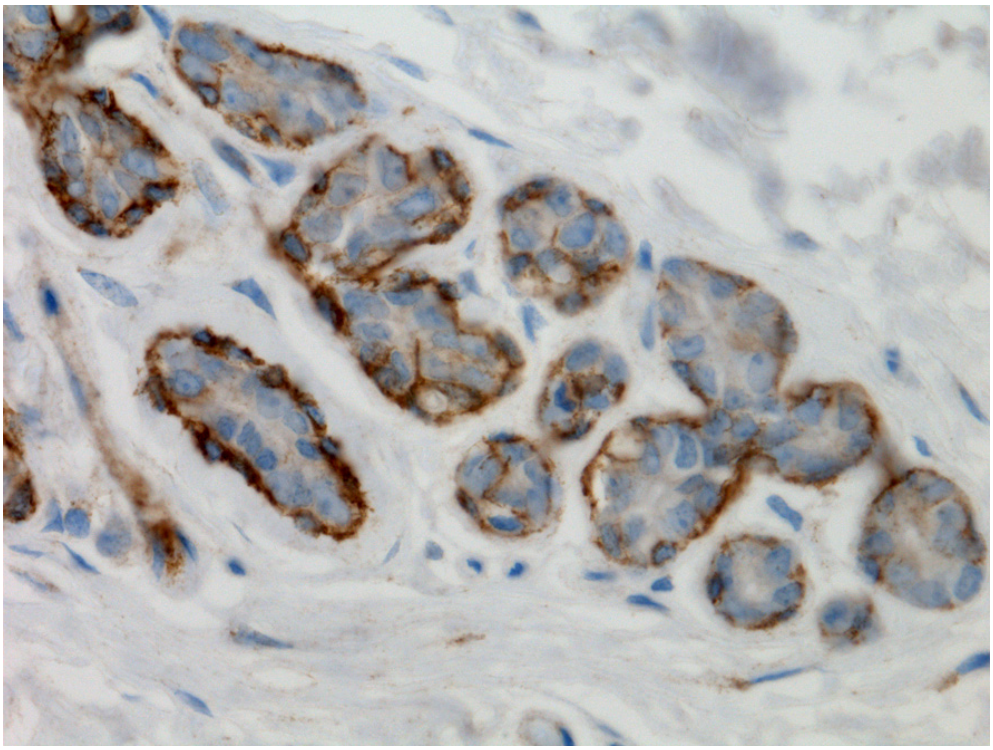


**Figura 19.** Glândula mamária: normal. Imunorreactividade membranar e citoplasmática para a caderina P nas células mioepiteliais (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x).

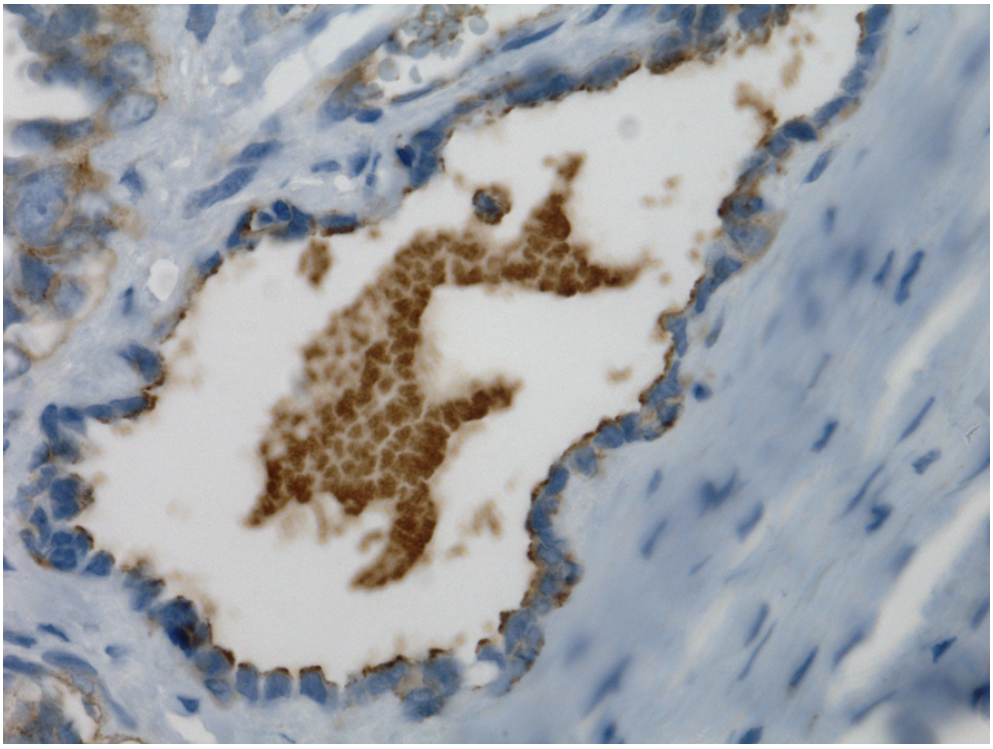


**Figura 20.** Glândula mamária: normal em lactação. Imunorreactividade para a caderina P no pólo apical das células epiteliais (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x).

*3.1.2. GLÂNDULA MAMÁRIA HIPERPLÁSICA (n=12)*

O tecido mamário hiperplásico mostrou padrão de marcação da caderina P, com expressão confinada às células mioepiteliais, semelhante ao descrito para a glândula mamária normal não lactante (Figuras 21 e 22) (Quadro 14).

*3.1.3. TUMORES MAMÁRIOS (n=45)*

Nos tumores mamários observou-se diferença na imunoexpressão da caderina P entre os tumores benignos e malignos.

*3.1.3.1. TUMORES MAMÁRIOS BENIGNOS (n=6)*

Nos tumores mamários benignos observados, a imunoexpressão da caderina P estava restrita às células mioepiteliais, semelhante ao descrito para a glândula mamária normal não lactante (Figuras 23 e 24). Nos casos em que havia imunoexpressão da caderina P em células epiteliais, esta foi inferior a 10% das células tumorais (Quadro 14).

*3.1.3.2. TUMORES MAMÁRIOS MALIGNOS (n=39)*

Nos tumores mamários malignos, a imunoexpressão da caderina P foi observada em células com fenótipo epitelial luminal (Figura 25). A expressão aberrante da caderina P (citoplasmática e/ou membranar) (Figura 26) foi encontrada em 64,1% (*n*=25) dos tumores mamários malignos observados, em que 38,46% (*n*=15) dos tumores malignos positivos apresentavam imunomarcação em mais de 25% das células. A expressão citoplasmática era muitas vezes do tipo granular (Figura 27).

Em alguns tumores positivos para a caderina P foi possível observar diferenças de imunomarcação desta molécula com a localização das células no tumor, havendo uma maior percentagem de células marcadas na periferia do tumor e maior intensidade de marcação (Figuras 28 e 29).

Relativamente aos tipos histológicos incluidos neste estudo, tanto o tipo sólido como o tipo tubulopapilar apresentaram expressão aberrante de caderina P (Figuras 30 a 33). O carcinoma cribiforme não revelou imunomarcação para esta caderina (Quadro 14).

Foi realizada imunohistoquímica dos tecidos mamários com marcadores epiteliais e mioepiteliais clássicos, que permitem o reconhecimento de tipos celulares específicos. O fenótipo mioepitelial das células foi confirmado pela expressão do marcador mioepitelial p63 e o fenótipo epitelial foi confirmado pela imunomarcação com o marcador epitelial AE1/AE3, confirmando que as células malignas positivas à caderina P não eram mioepiteliais, mas sim epiteliais (Figura 34).

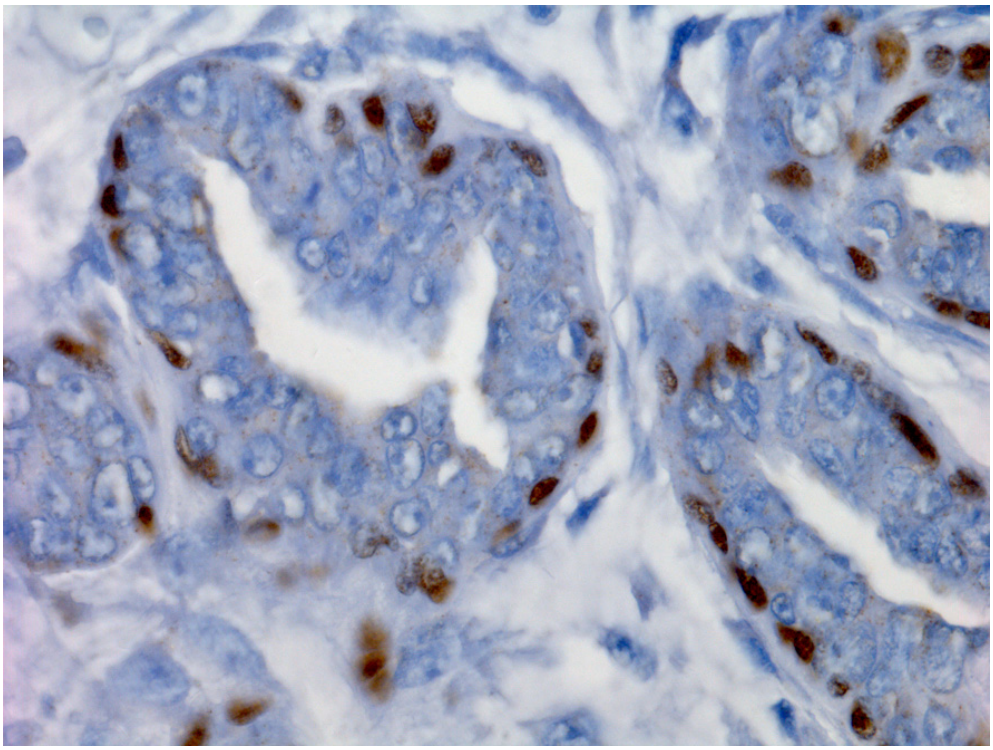


**Figura 21.** Glândula mamária: alteração fibroadenomatosa. Imunorreactividade nuclear para a p63 (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x).

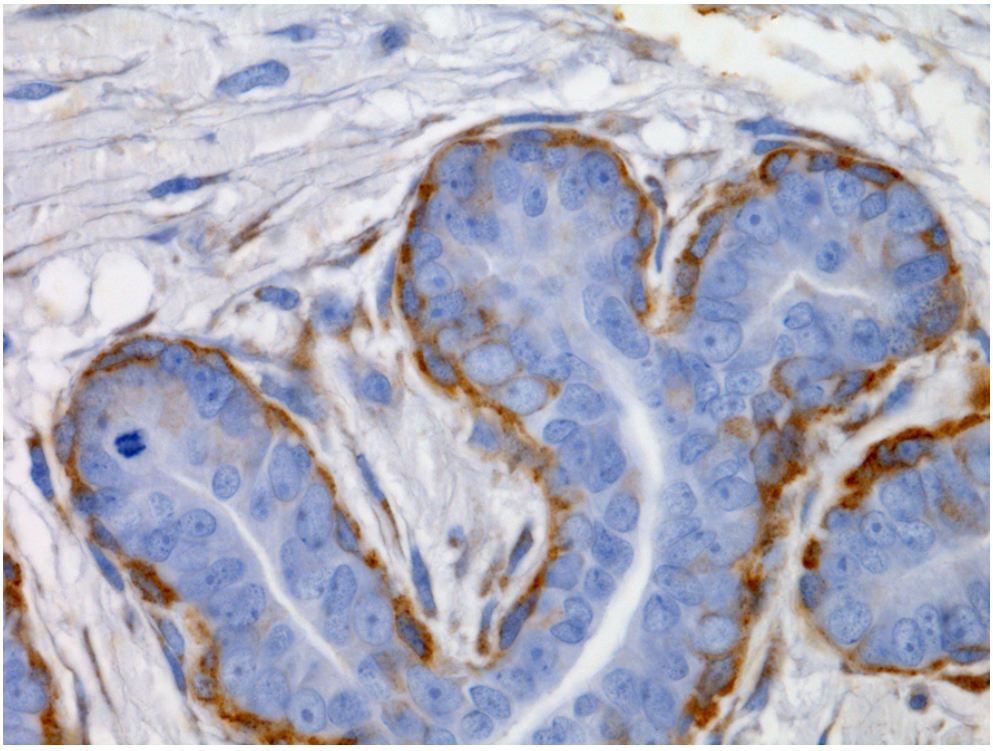


**Figura 22.** Glândula mamária: alteração fibroadenomatosa. Imunorreactividade membranar e citoplasmática para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x).

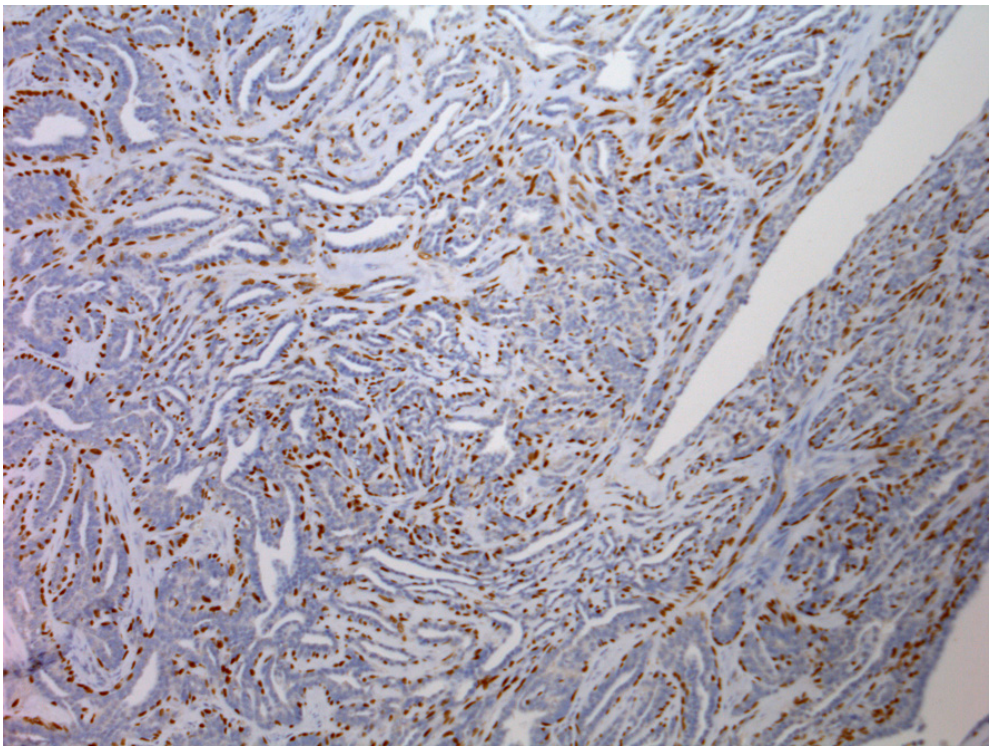


**Figura 23.** Glândula mamária: adenoma. Imunorreactividade nuclear para a p63 (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x).

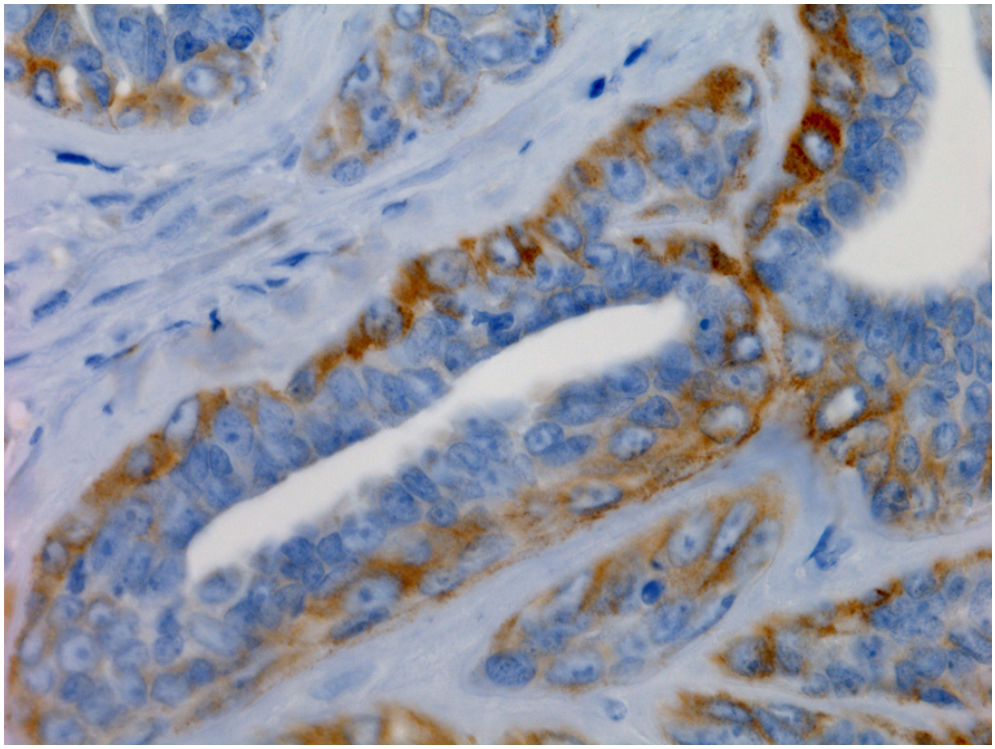


**Figura 24.** Glândula mamária: adenoma. Imunorreactividade membranar e citoplasmática para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x).

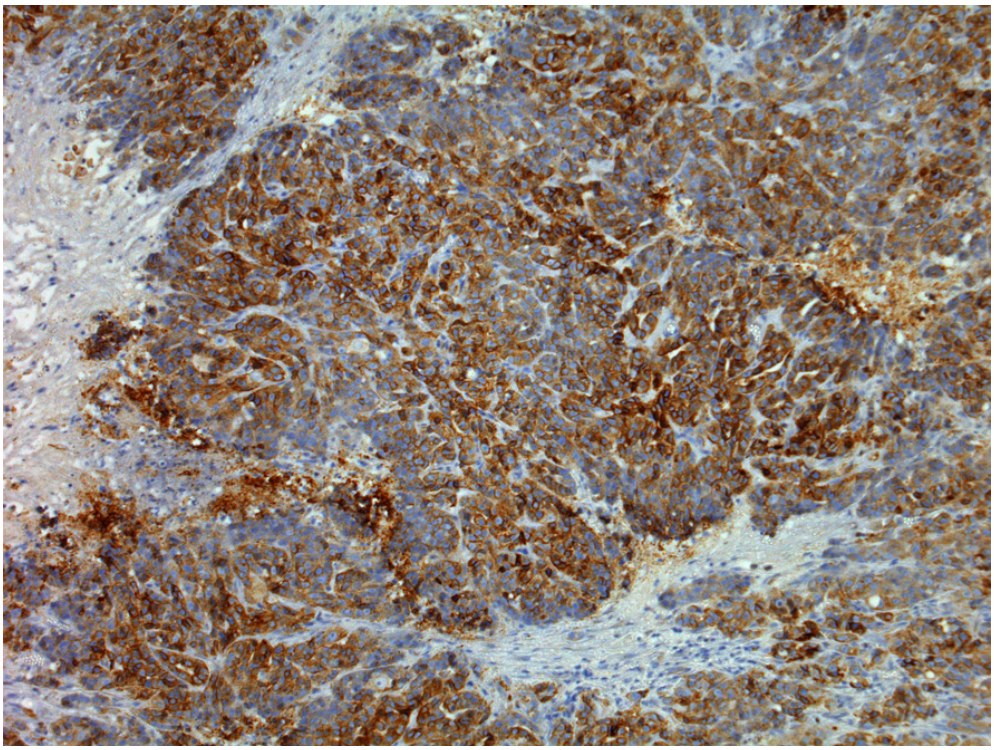


**Figura 25.** Glândula mamária: carcinoma sólido. Imunorreactividade para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x).

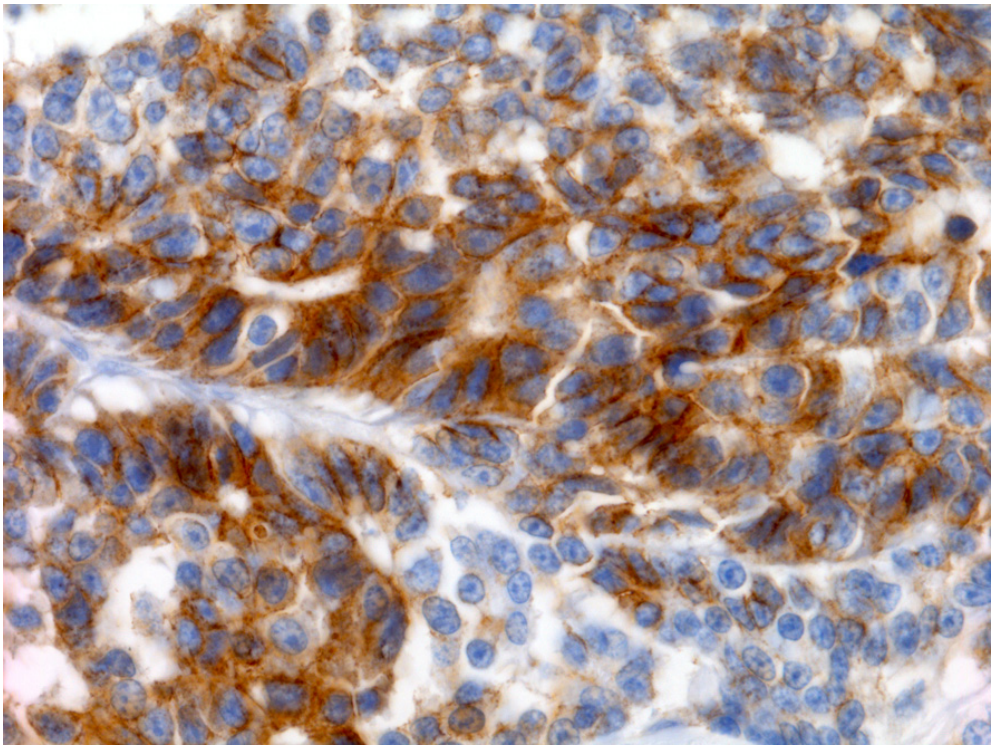


**Figura 26.** Glândula mamária: carcinoma sólido. Imunorreactividade membranar e citoplasmática para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x).

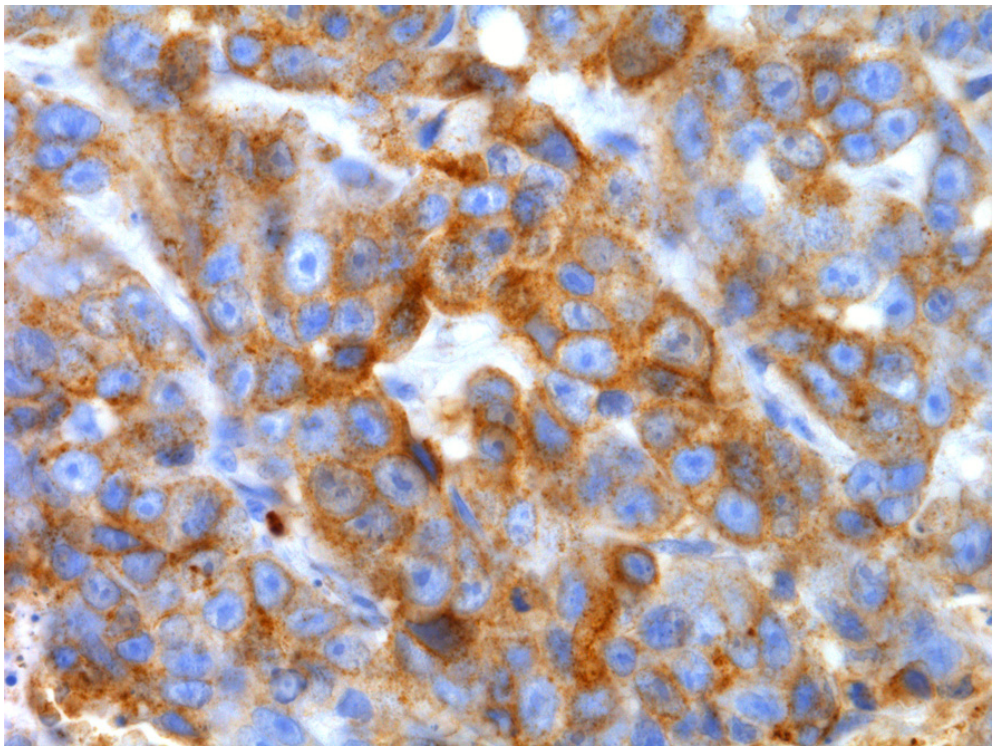


**Figura 27.** Glândula mamária: carcinoma sólido. Imunorreactividade membranar e citoplasmática granular para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x).

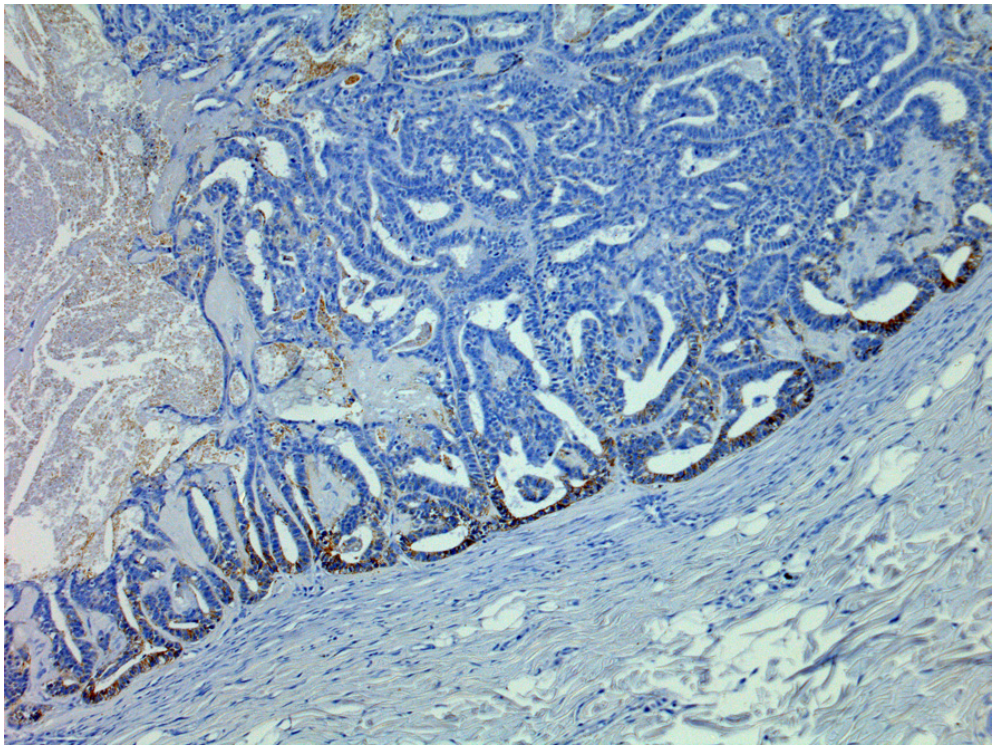


**Figura 28.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x).

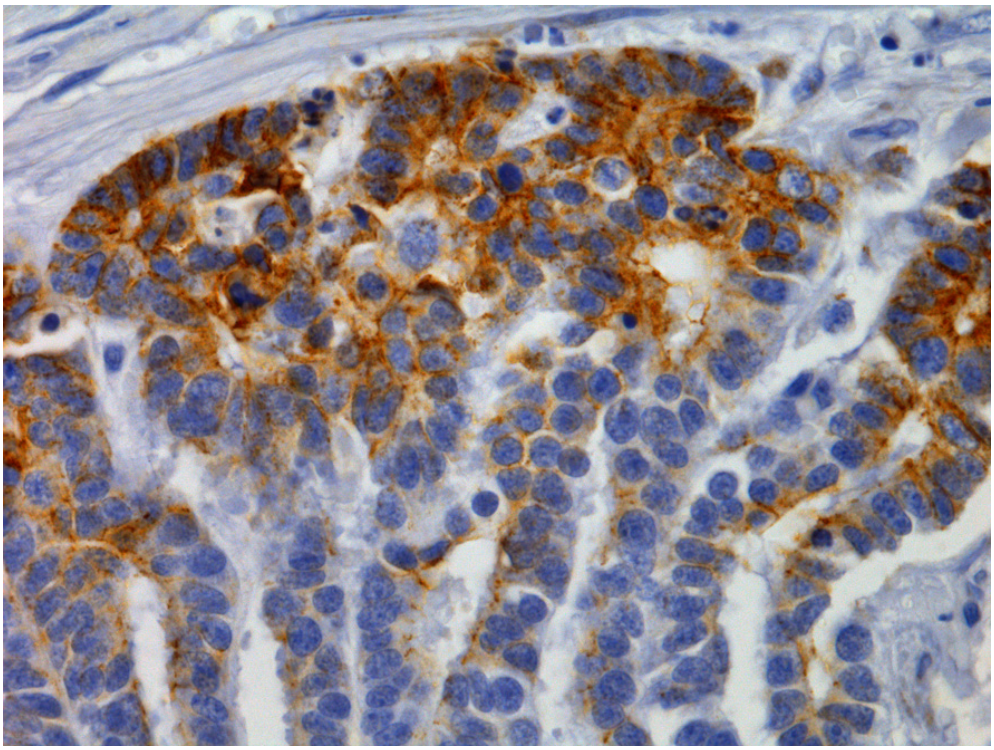


**Figura 29.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x).

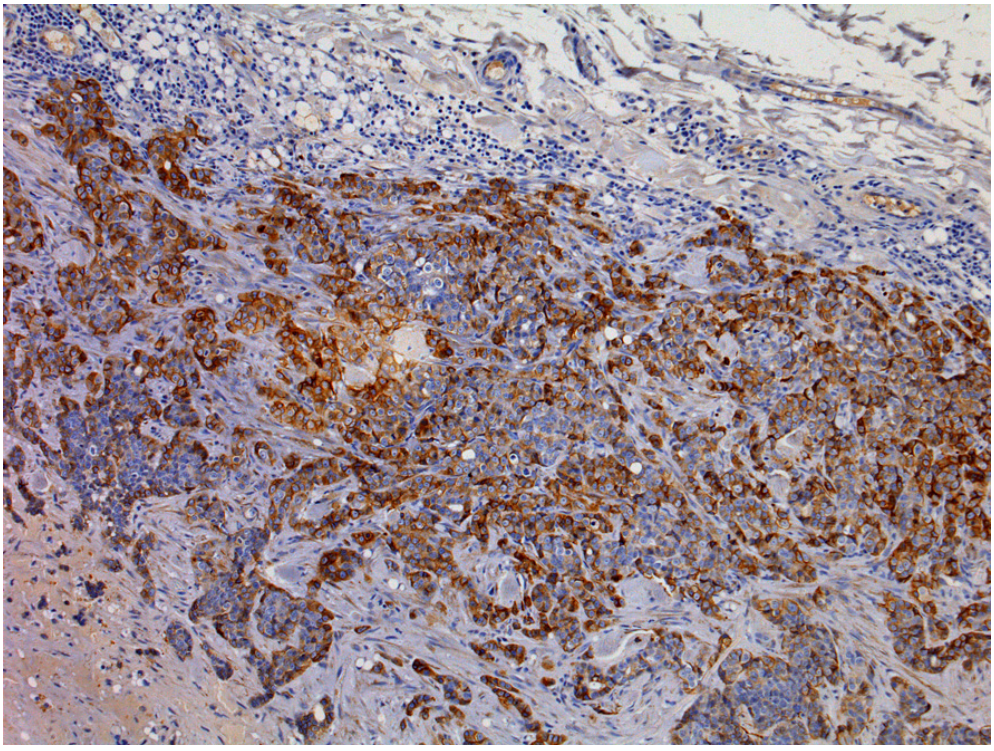


**Figura 30.** Glândula mamária: carcinoma sólido. Imunorreactividade para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x).

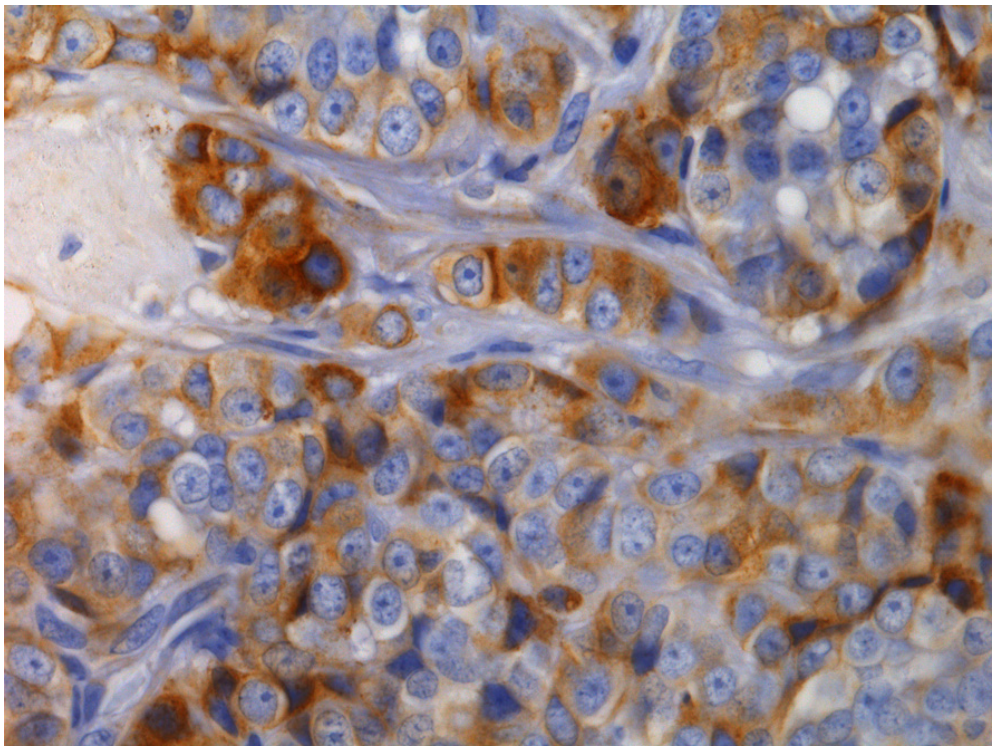


**Figura 31.** Glândula mamária: carcinoma sólido. Imunorreactividade para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x).

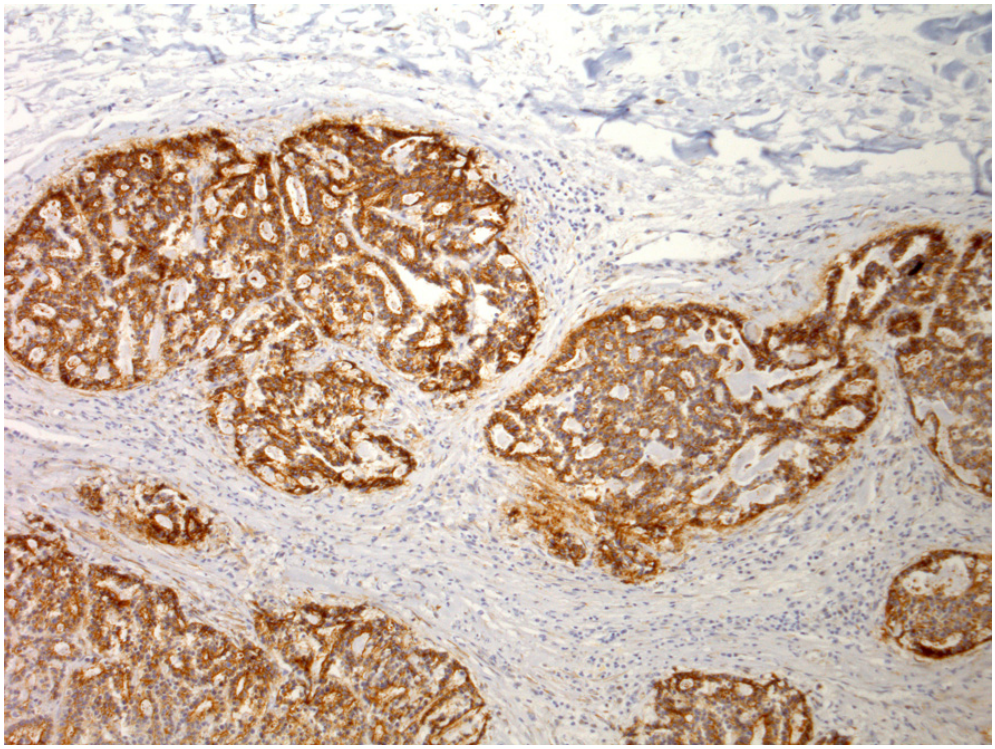


**Figura 32.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x).

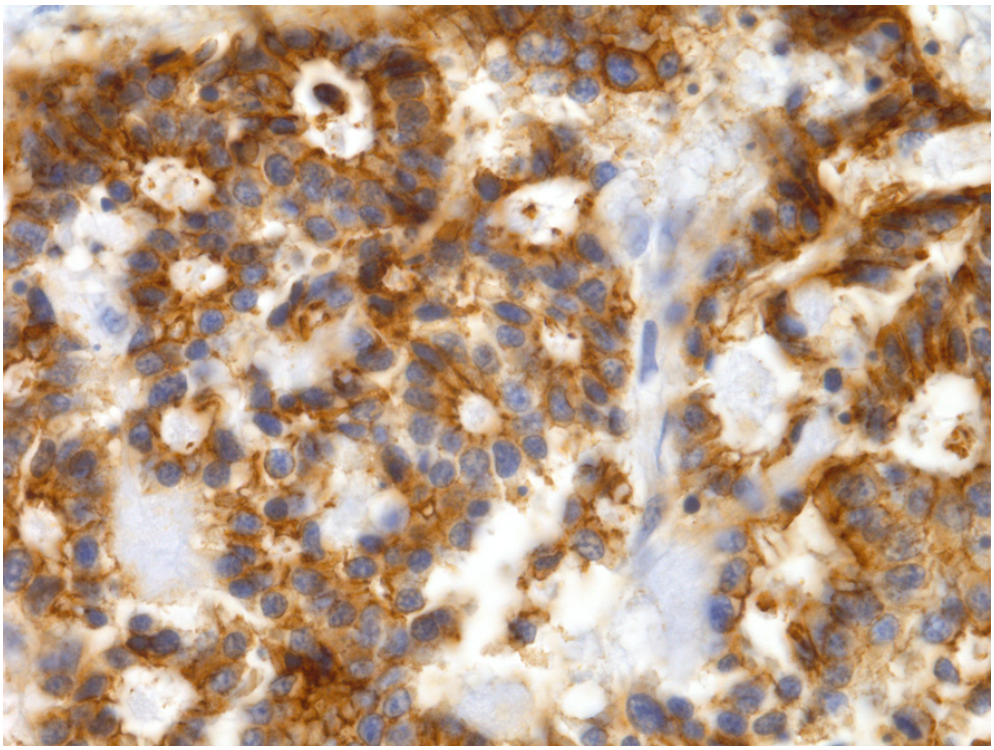


**Figura 33.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x).

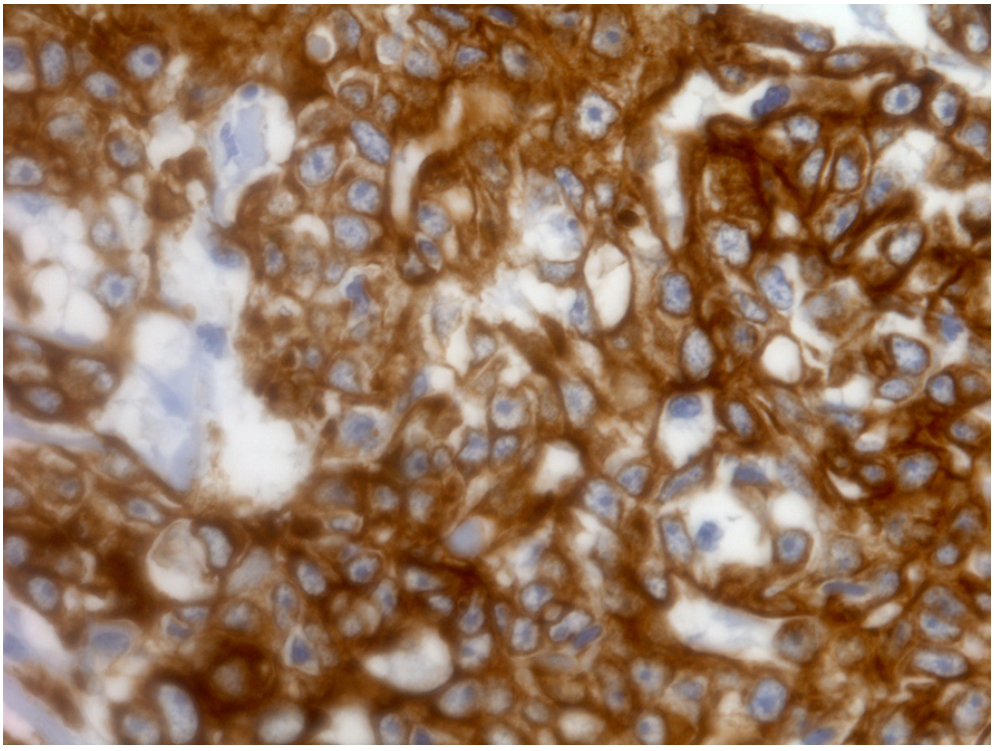


**Figura 34.** Glândula mamária: carcinoma sólido. Imunorreactividade para a AE1/AE3 (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x).

*3.1.4. METÁSTASES (n=3)*

Foi possível observar metástases ganglionares em três animais portadores de tumores malignos, um carcinoma sólido e dois carcinomas tubulopapilares.

Verificaram-se diferenças na imunoexpressão da caderina P entre o tumor primário e as metástases ganglionares. Assim, num dos carcinomas tubulopapilares (grau 1) o tumor primário apresentou imunomarcação para esta caderina em 10 a 25% das células tumorais, enquanto que mais de 50% das células metastáticas apresentaram imunorreactividade. No outro carcinoma tubulopapilar (grau 1), também com imunorreactividade em 10 a 25% das células do tumor primário, 25 a 50% das células metastáticas expressaram caderina P. No carcinoma sólido, embora o tumor primário tivesse mais de 50% das células imunorreactivas à caderina P, só 10 a 25% das células metastáticas apresentaram imunomarcação. Assim, as células metastáticas ganglionares dos carcinomas tubulopapilares apresentavam maior imunoexpressão do que o tumor primário, enquanto que no carcinoma sólido se verificou o oposto (Figuras 35 a 37).

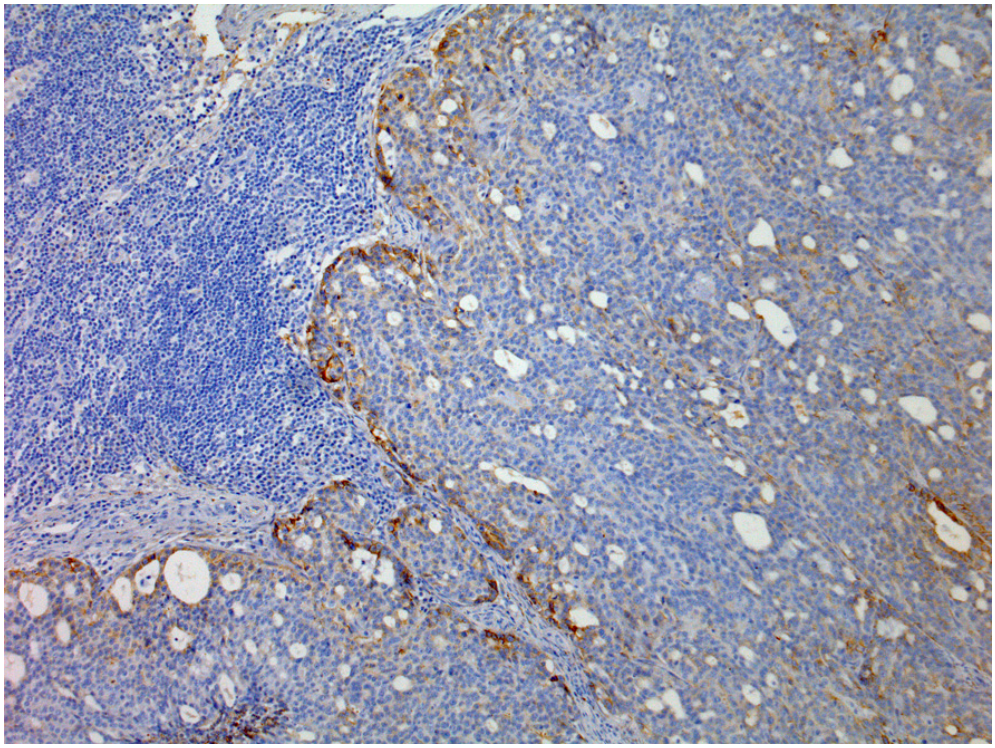


**Figura 35.** Gânglio linfático: metástase ganglionar de carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x).

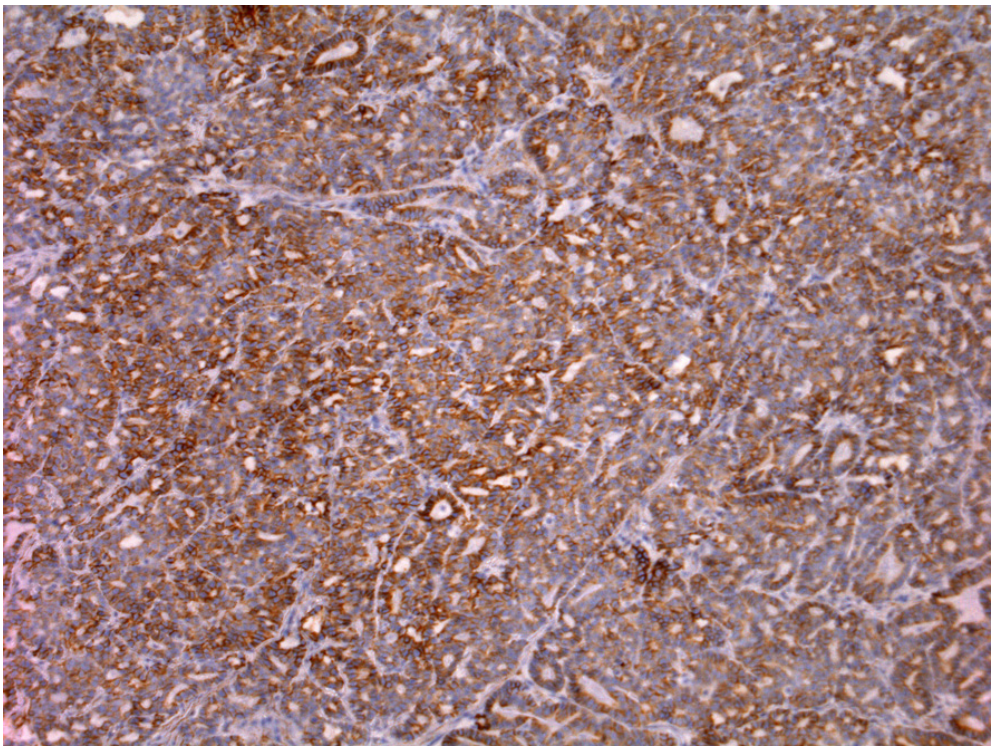


**Figura 36.** Gânglio linfático: metástase ganglionar de carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x).

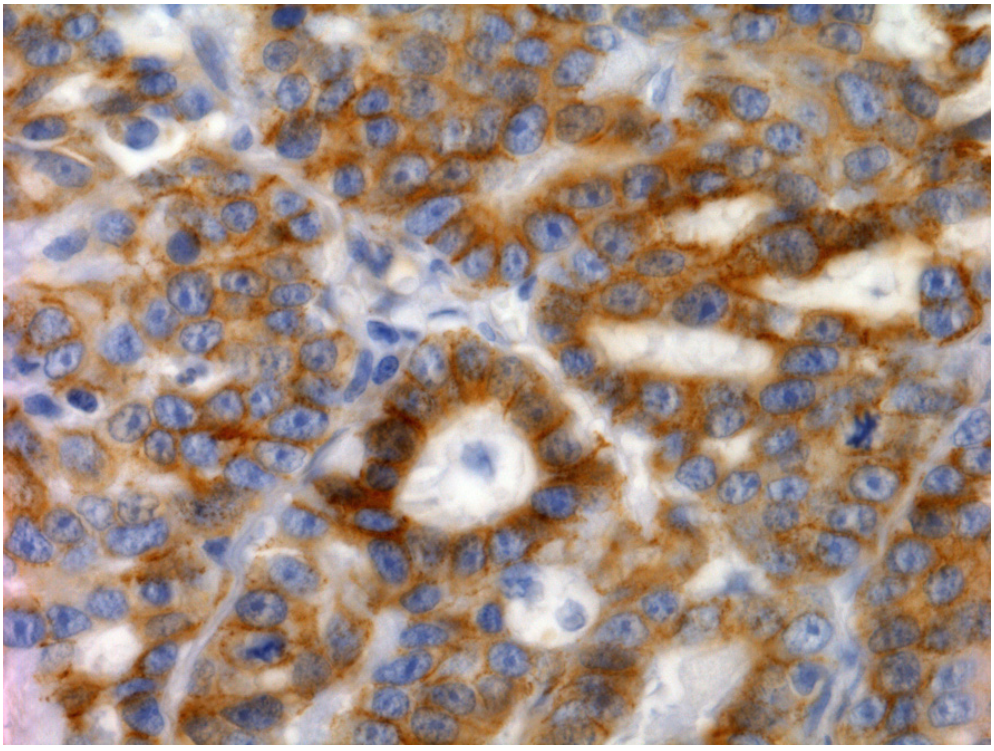


**Figura 37.** Gânglio linfático: metástase ganglionar de carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade membranar e citoplasmática para a caderina P (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x).

### 3.2. IMUNOEXPRESSÃO DA CADERINA E NO TECIDO MAMÁRIO FELINO

Procedeu-se à determinação da expressão da caderina E ao nível das células epiteliais do tecido mamário normal e de lesões mamárias, de acordo com os parâmetros descritos no Quadro 5 (Material e Métodos).

Na glândula mamária normal e em todas as lesões estudadas, a caderina E apresentou uma imunoexpressão em mais de 75% das células. Desta forma, o estudo foi reestruturado de forma a determinar o padrão da expressão da caderina E (membranar *vs* citoplasmática), de acordo com os parâmetros descritos em Material e Métodos.

No Quadro 15 encontram-se resumidas as observações do padrão de imunorreactividade para a caderina E, com a sua descrição de seguida.

**Quadro 15.** Padrão de imunorreactividade dos tecidos mamários para o anticorpo anti-caderina E.

| ***Tecidos mamários*** | ***n*** | ***Padrão de imunorreactividade para a caderina E*** | | |
|---|---|---|---|---|
| | | ***C*** | ***C+M*** | ***M*** |
| Glândula mamária normal | 4 | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) | 4 (100,00%) |
| Hiperplasia lobular | 3 | 0 (0,00%) | 1 (33,30%) | 2 (66,70%) |
| Alteração fibroadenomatosa | 9 | 0 (0,00%) | 2 (22,20%) | 7 (77,80%) |
| Adenoma simples | 2 | 0 (0,00%) | 1 (50,00%) | 1 (50,00%) |
| Fibroadenoma | 3 | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) | 3 (100,00%) |
| Papiloma ductal | 1 | 0 (0,00%) | 1 (100,00%) | 0 (0,00%) |
| Carcinoma tubulopapilar | 18 | 1 (5,56%) | 11 (61,11%) | 6 (33,33%) |
| Carcinoma sólido | 20 | 1 (5,00%) | 8 (40,00%) | 11 (55,00%) |
| Carcinoma cribiforme | 1 | 0 (0,00%) | 1(100,00%) | 0 (0,00%) |
| Total | 61 | 2 (3,30%) | 25 (41,00%) | 34 (55,70%) |

**C** - citoplasmática; **M** – membranar.

#### *3.2.1. GLÂNDULA MAMÁRIA NORMAL (n=4)*

Na glândula mamária normal a caderina E foi observada a nível das células epiteliais luminais, com marcação essencialmente membranar (Figura 38) (Quadro 15).

#### *3.2.2. GLÂNDULA MAMÁRIA HIPERPLÁSICA (n=12)*

O tecido mamário hiperplásico mostrou marcação para a caderina E em mais de 75% das células, com expressão nas células epiteliais luminais (Figuras 39 e 40). O padrão de expressão da caderina E foi maioritariamente membranar, sendo que em três lesões hiperplásicas (*n*=3; 25%) foi observada expressão membranar e citoplasmática em proporções semelhantes (Quadro 15).

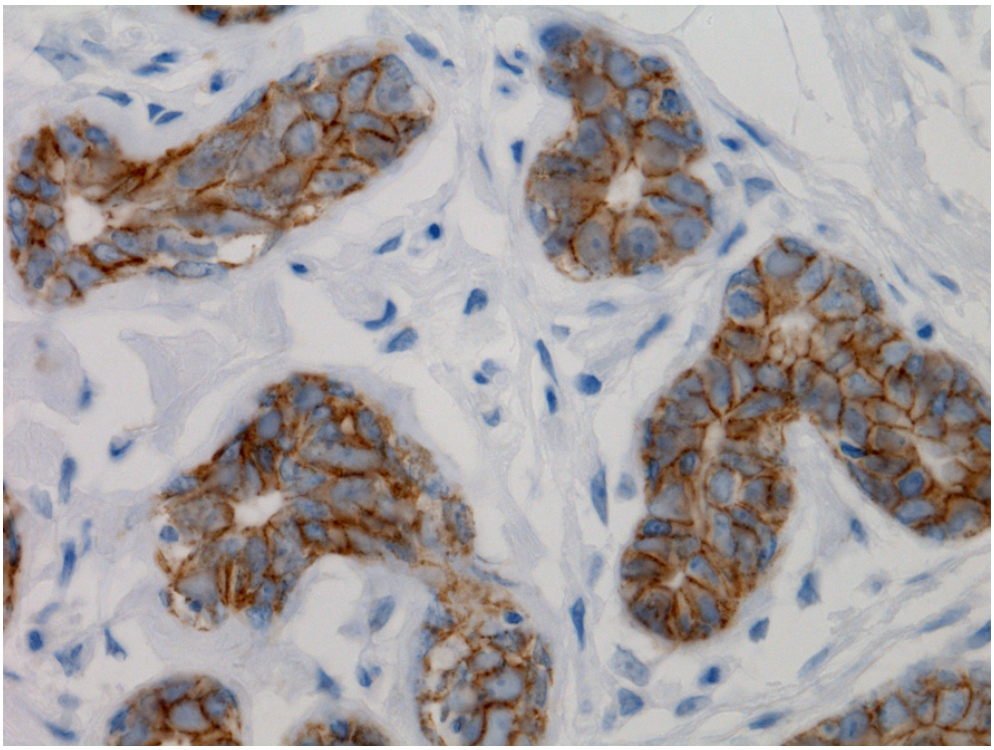


**Figura 38.** Glândula mamária: normal. Imunorreactividade membranar para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x).

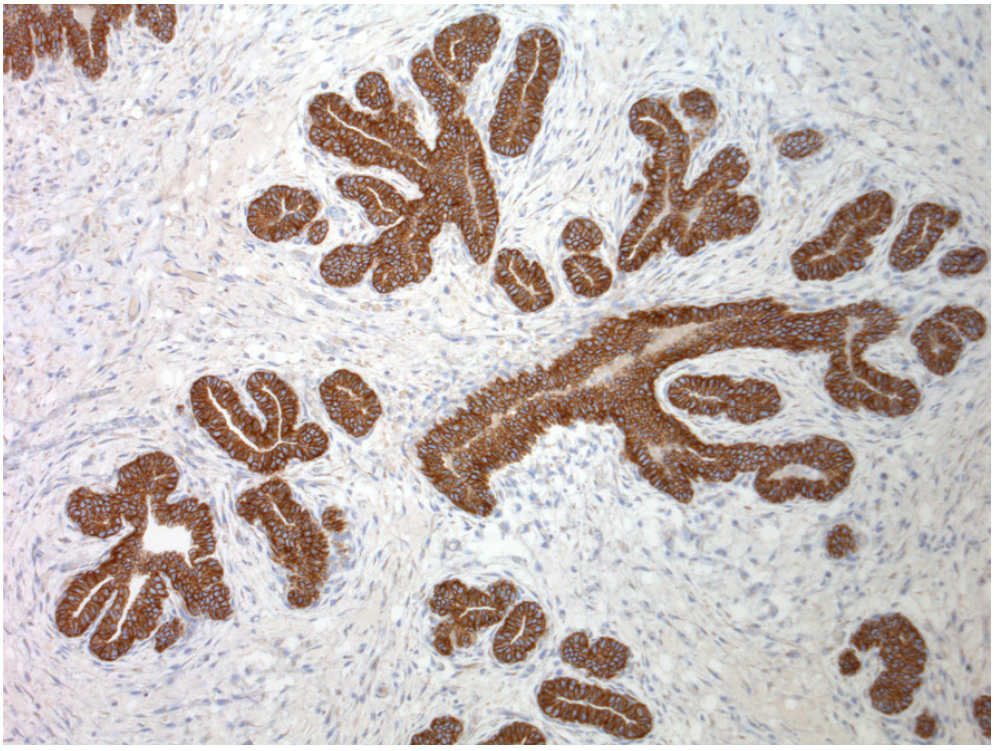


**Figura 39.** Glândula mamária: alteração fibroadenomatosa. Imunorreactividade para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x).

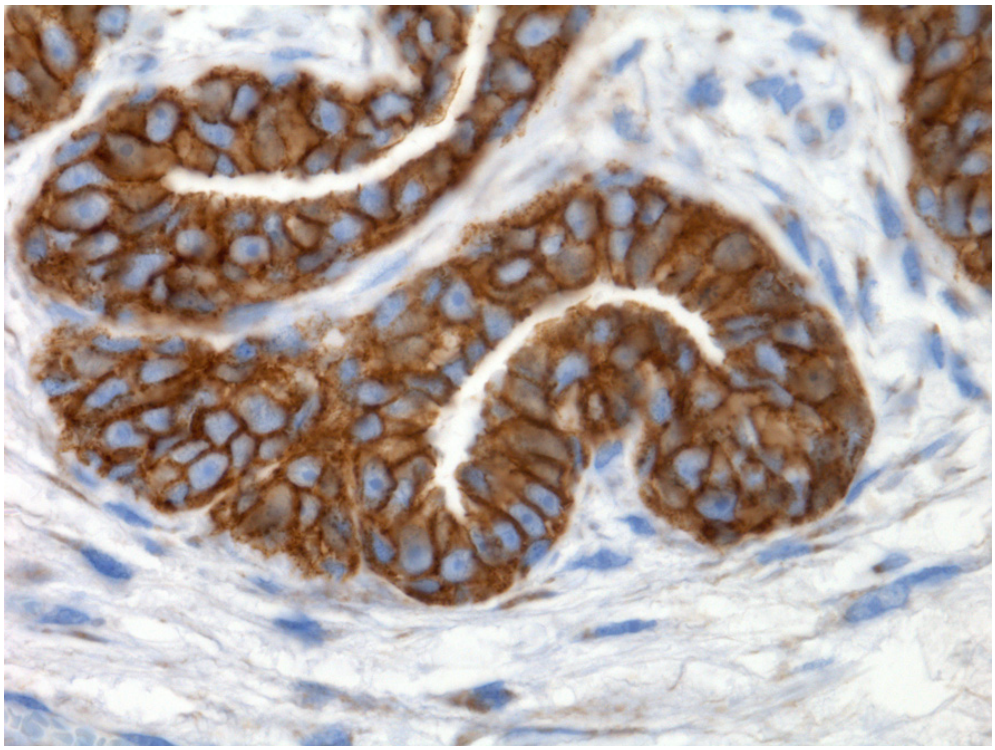


**Figura 40.** Glândula mamária: alteração fibroadenomatosa. Imunorreactividade para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x).

*3.2.3. TUMORES MAMÁRIOS (n=45)*

Nos tumores mamários avaliados, a imunoexpressão da caderina E foi observada nas células epiteliais luminais, em mais de 75 % das células tumorais. O padrão de expressão da caderina E foi variável.

*3.2.3.1. TUMORES MAMÁRIOS BENIGNOS (n=6)*

Nos tumores mamários benignos observados, a imunoexpressão da caderina E estava presente em mais de 75% das células epiteliais tumorais e com marcação essencialmente membranar (Figuras 41 e 42). Todas as neoplasias benignas avaliadas apresentaram marcação maioritariamente membranar, à excepção de um adenoma simples e do papiloma ductal que apresentaram tanto imunomarcação membranar como citoplasmática (Quadro 15).

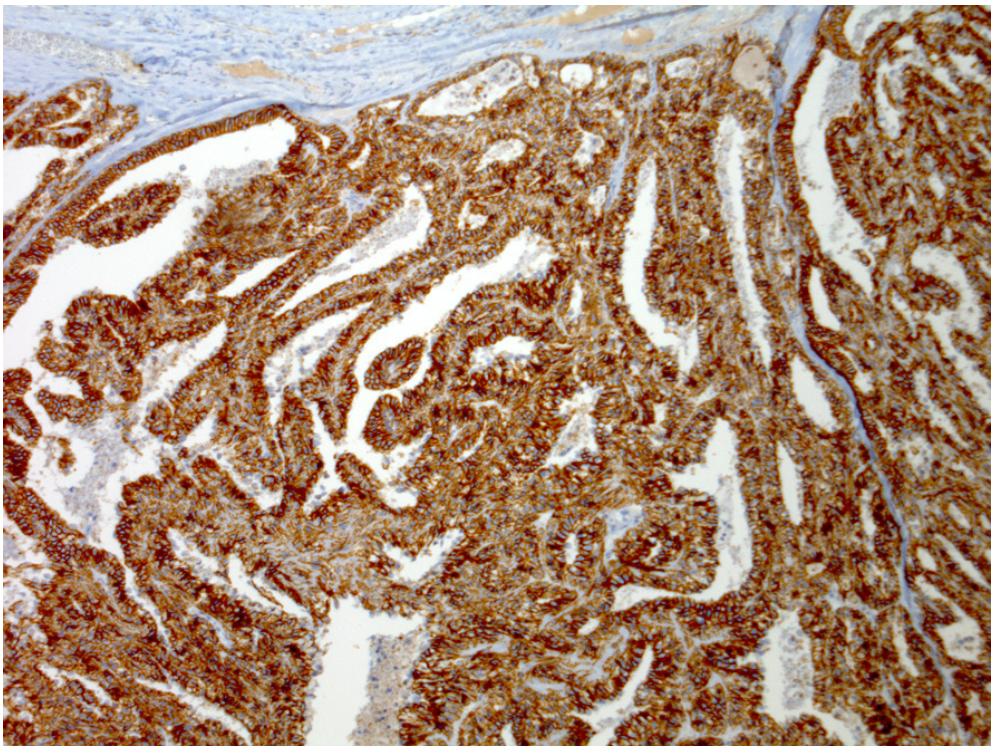


**Figura 41.** Glândula mamária: adenoma simples. Imunorreactividade para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x).

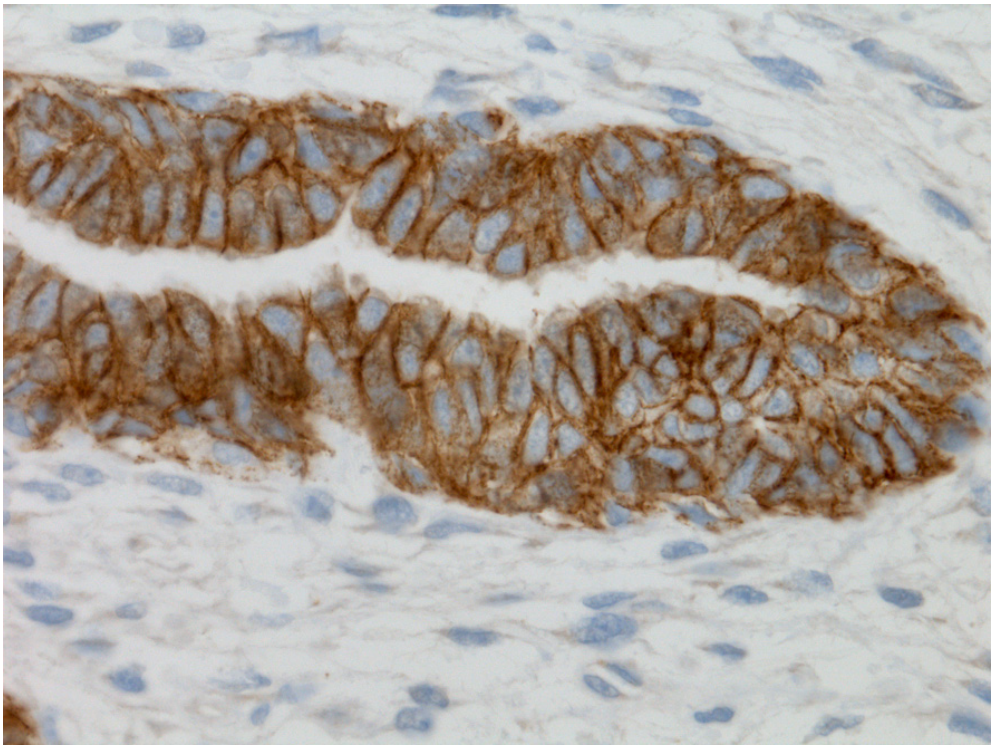


**Figura 42.** Glândula mamária: fibroadenoma. Imunorreactividade para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x).

*3.2.3.2. TUMORES MAMÁRIOS MALIGNOS (n=39)*

Nos tumores mamários malignos, a imunoexpressão da caderina E foi semelhante à da glândula mamária normal, lesões hiperplásicas e tumores mamários benignos, com mais de 75% das células imunorreactivas (Figuras 43 a 49). Foi, no entanto, possível observar em certas regiões de alguns tumores, uma diminuição da intensidade de marcação celular, principalmente nas áreas mais sólidas, comparativamente com as áreas tubulopapilares, mas sempre em mais de 75% das células (Figuras 50 e 51).

No que diz respeito ao padrão de marcação da caderina E em dois tumores malignos (*n*=2; 5,13%), observou-se marcação maioritariamente citoplasmática (Figura 52), sendo que na maioria dos tumores malignos (*n*=20; 51,28%) pôde observar-se simultaneamente marcação membranar e citoplasmática (Figura 53) (Quadro 15).

Relativamente aos tumores mamários malignos, todos os tipos histológicos incluídos neste estudo tinham algum grau de expressão citoplasmática de caderina E.

O fenótipo epitelial das células foi confirmado pela imunoexpressão da citoqueratina AE1/AE3 (Figura 54).

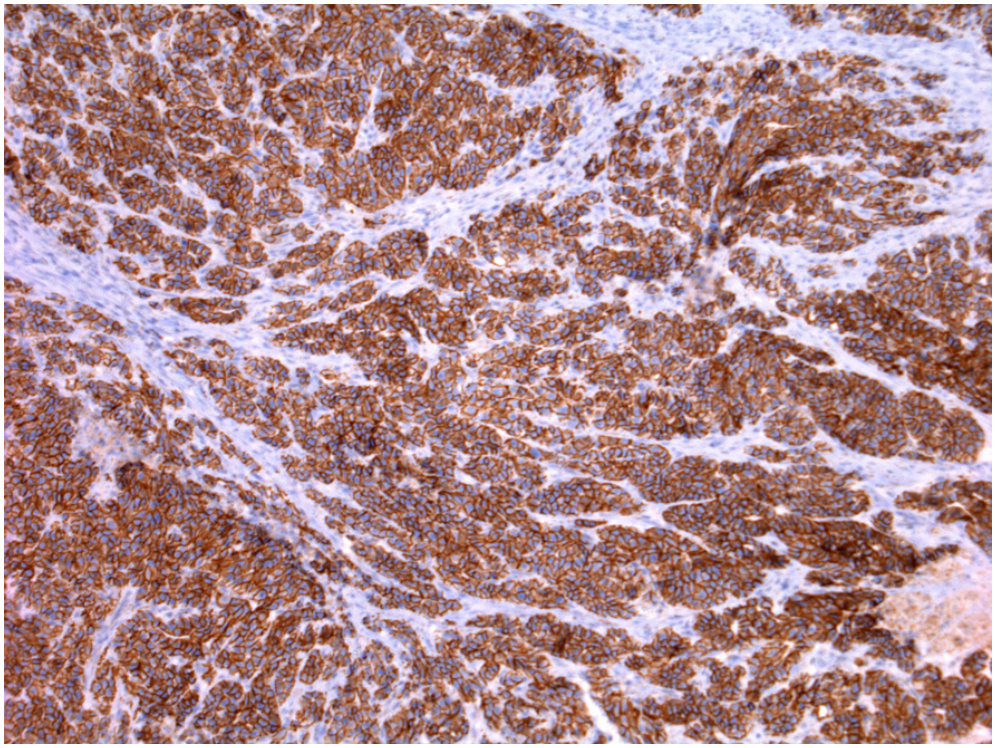


**Figura 43.** Glândula mamária: carcinoma sólido. Imunorreactividade para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x).

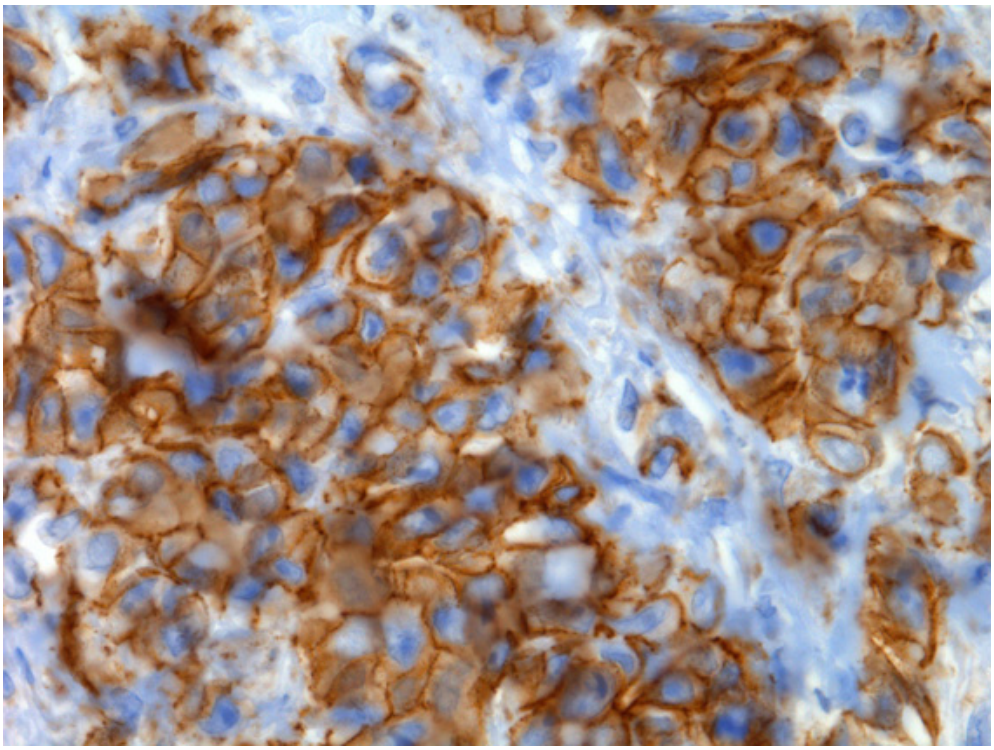


**Figura 44.** Glândula mamária: carcinoma sólido. Imunorreactividade membranar para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x).

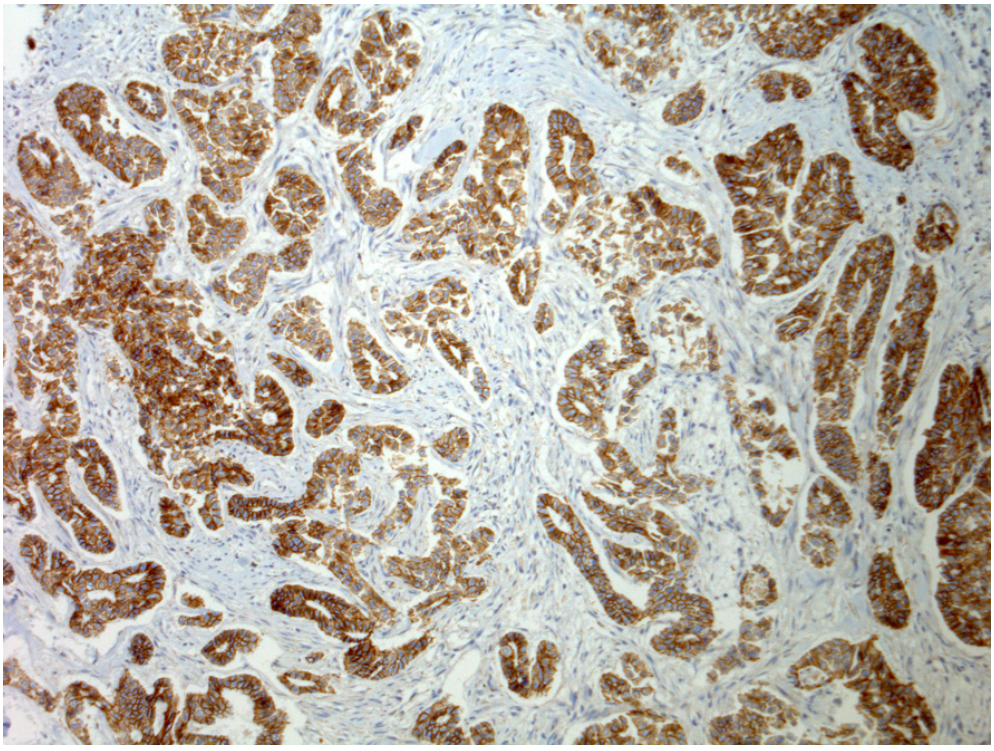


**Figura 45.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar (predominantemente tubular). Imunorreactividade para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x).

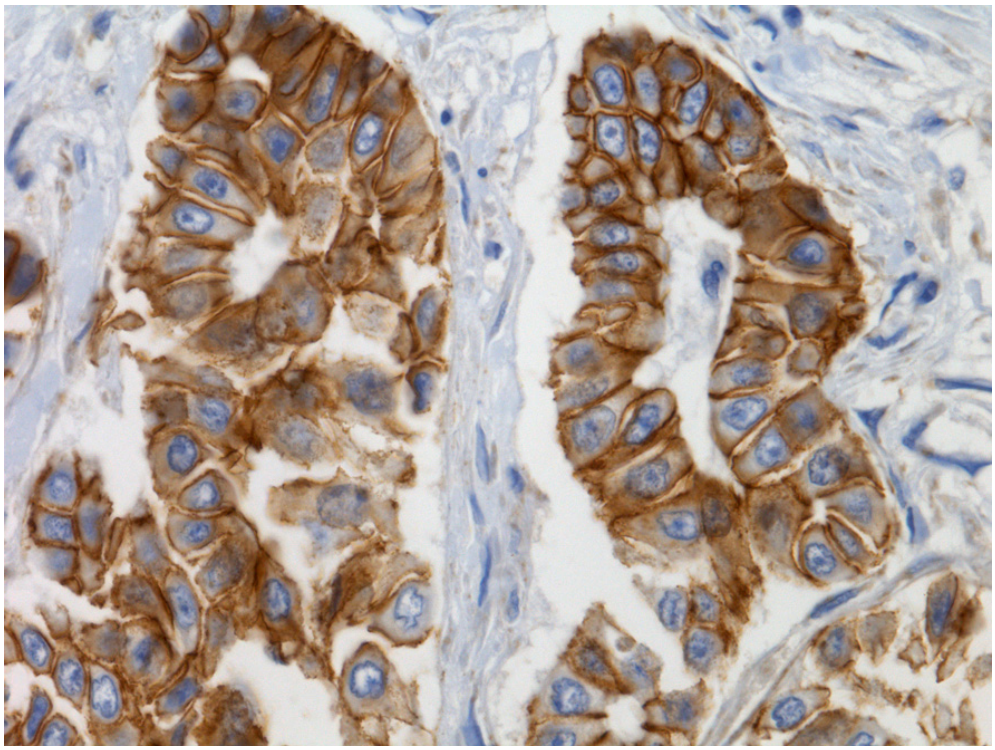


**Figura 46.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade membranar para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x).

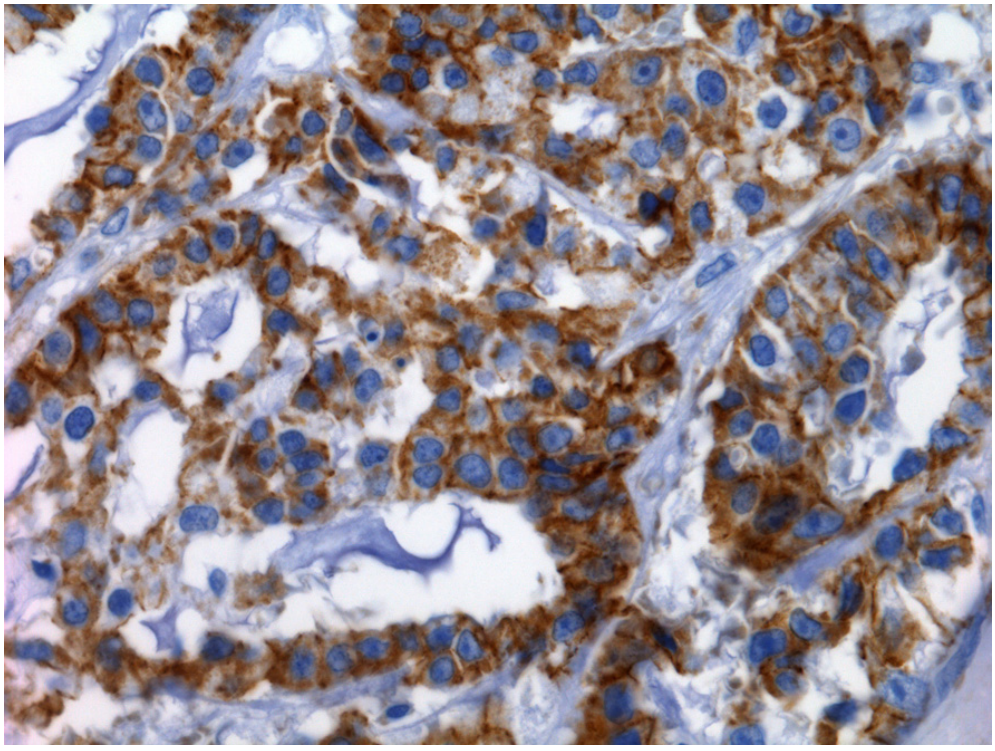


**Figura 47.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade membranar e citoplasmática para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x).

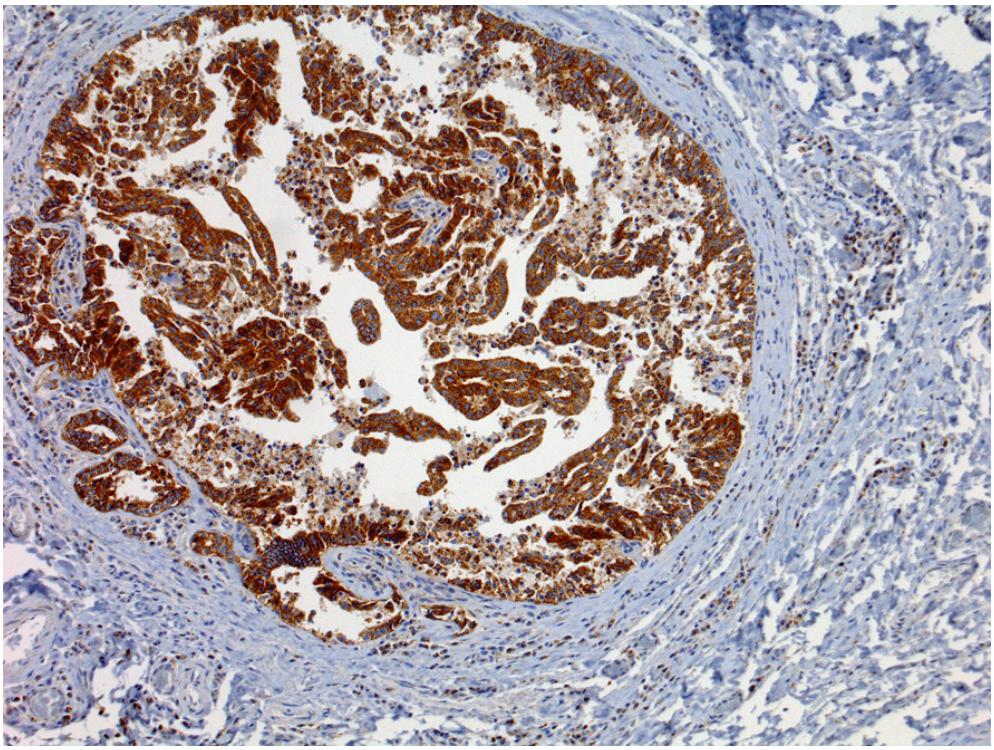


**Figura 48.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar (predominantemente papilar). Imunorreactividade para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x).

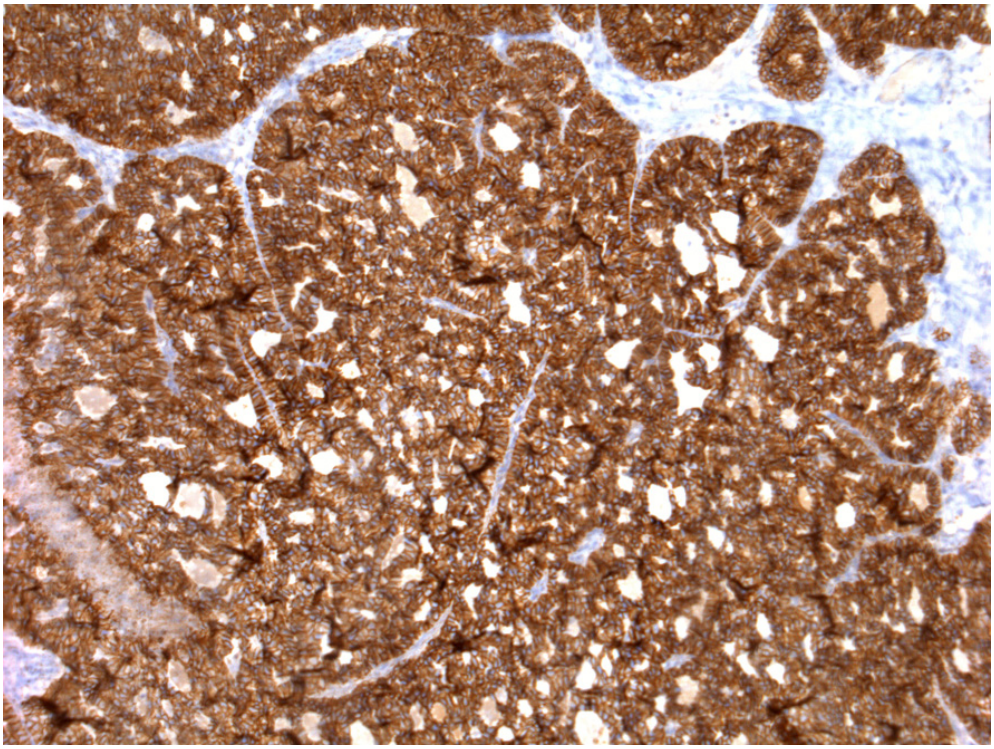


**Figura 49.** Glândula mamária: carcinoma cribiforme. Imunorreactividade para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x).

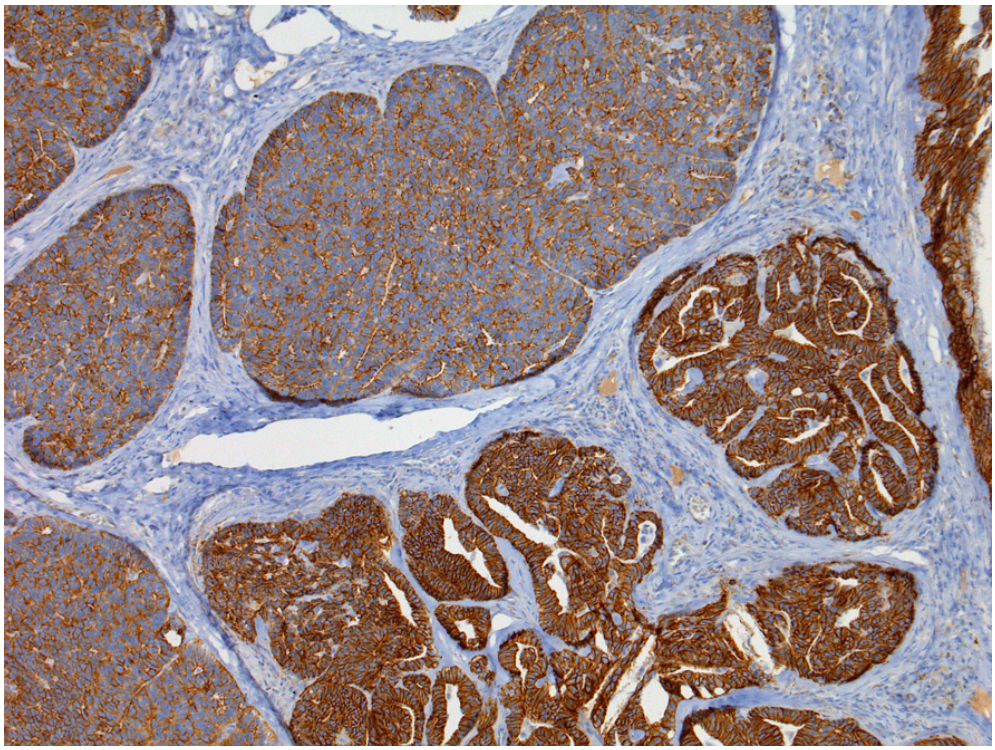


**Figura 50.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 100x).

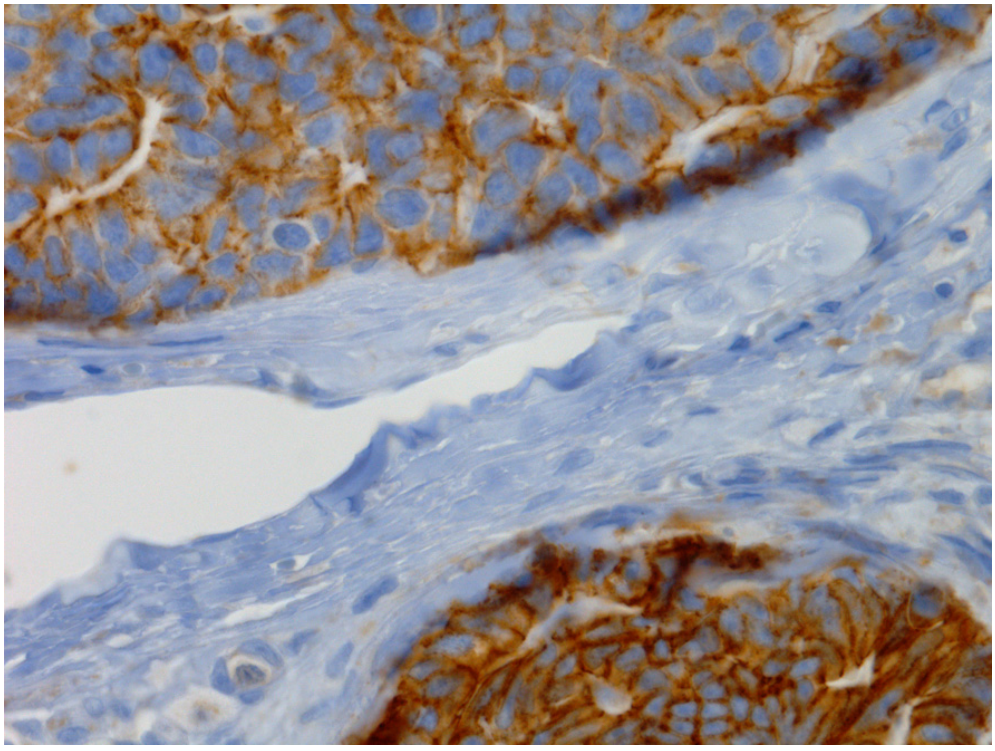


**Figura 51.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x).

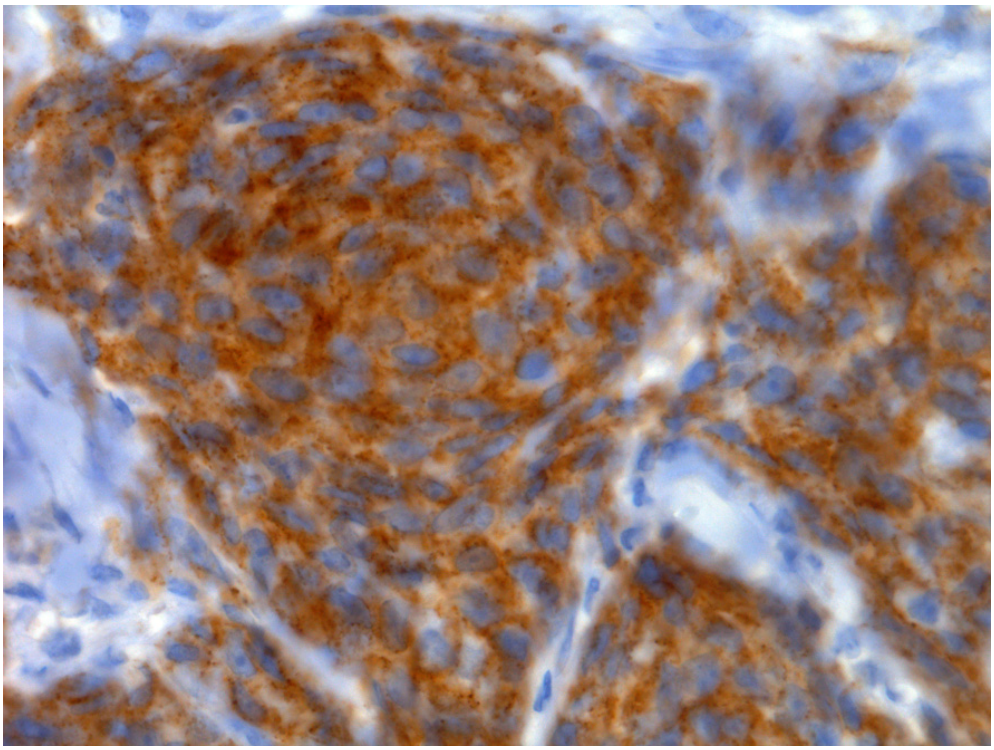


**Figura 52.** Glândula mamária: carcinoma sólido. Imunorreactividade citoplasmática granular para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x).

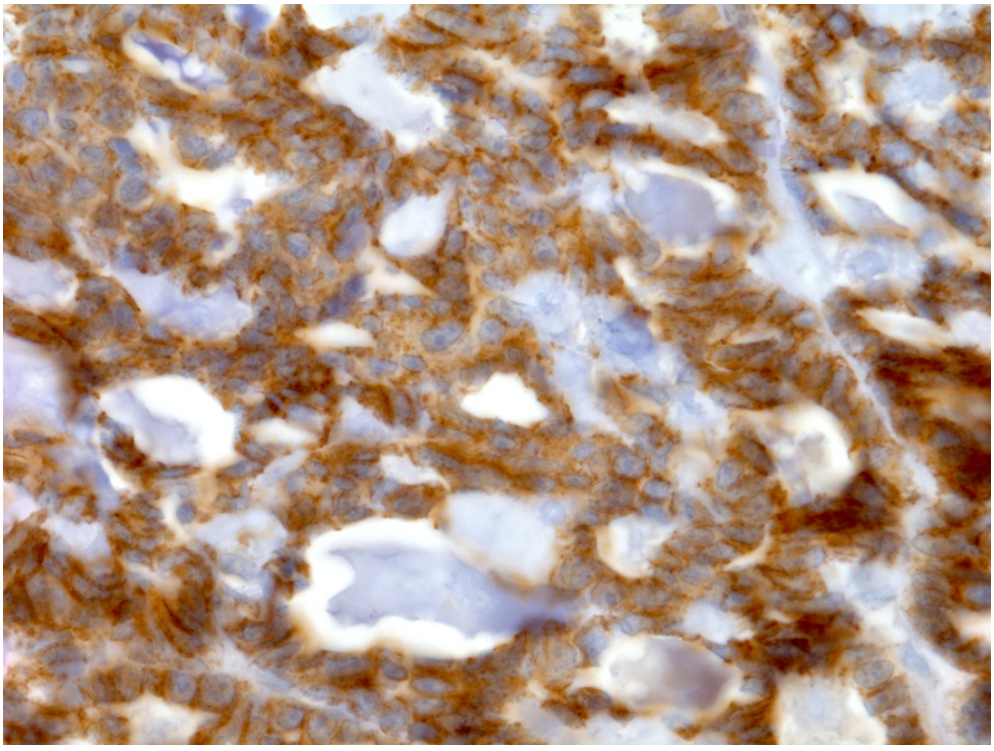


**Figura 53.** Glândula mamária: carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade membranar e citoplasmática granular para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x).

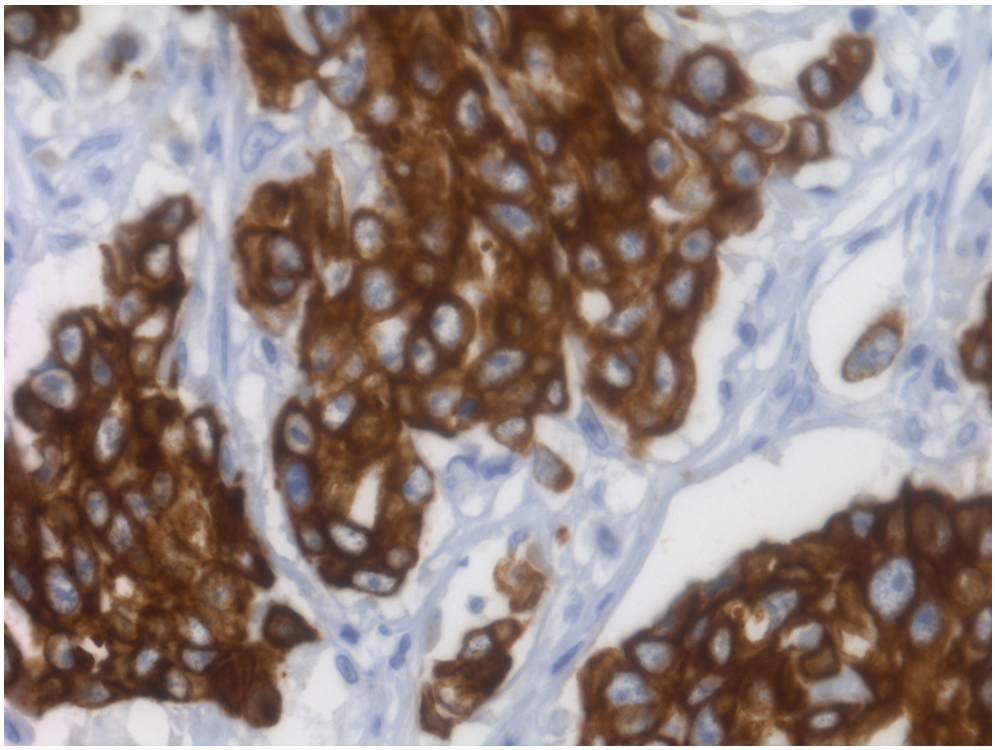


**Figura 54.** Glândula mamária: carcinoma sólido. Imunorreactividade para a AE1/AE3 (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x).

*3.2.4. METÁSTASES (n=3)*

Nas metástases ganglionares dos três tumores malignos, a expressão da caderina E foi distinta. Apesar de tanto no tumor primário como nas células metastáticas ganglionares a expressão ser em mais de 75% das células (Figura 55), houve diferenças em termos de padrão de expressão. Os tumores primários tubulopapilares apresentaram marcação para a caderina E quer a nível citoplasmático quer a nível membranar, enquanto que a expressão nas células metastáticas foi essencialmente membranar (Figura 56). No tumor sólido observou-se o inverso, no tumor primário a marcação foi essencialmente membranar, enquanto que nas metástases ganglionares foi membranar e citoplasmática.

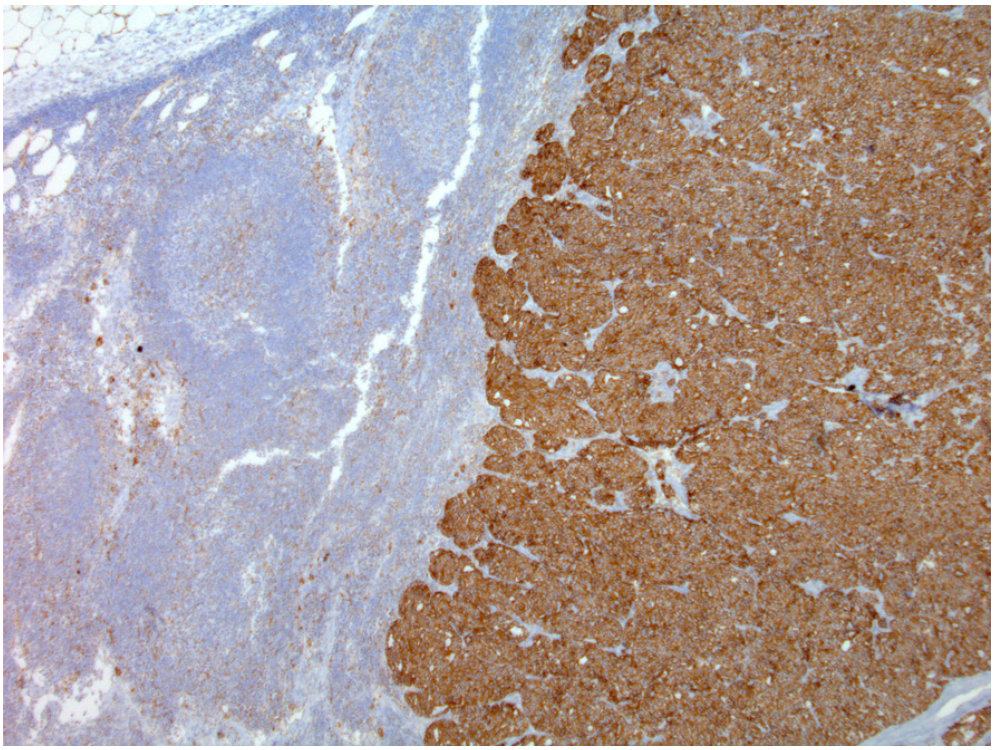


**Figura 55.** Gânglio linfático: metástase ganglionar de carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 50x).

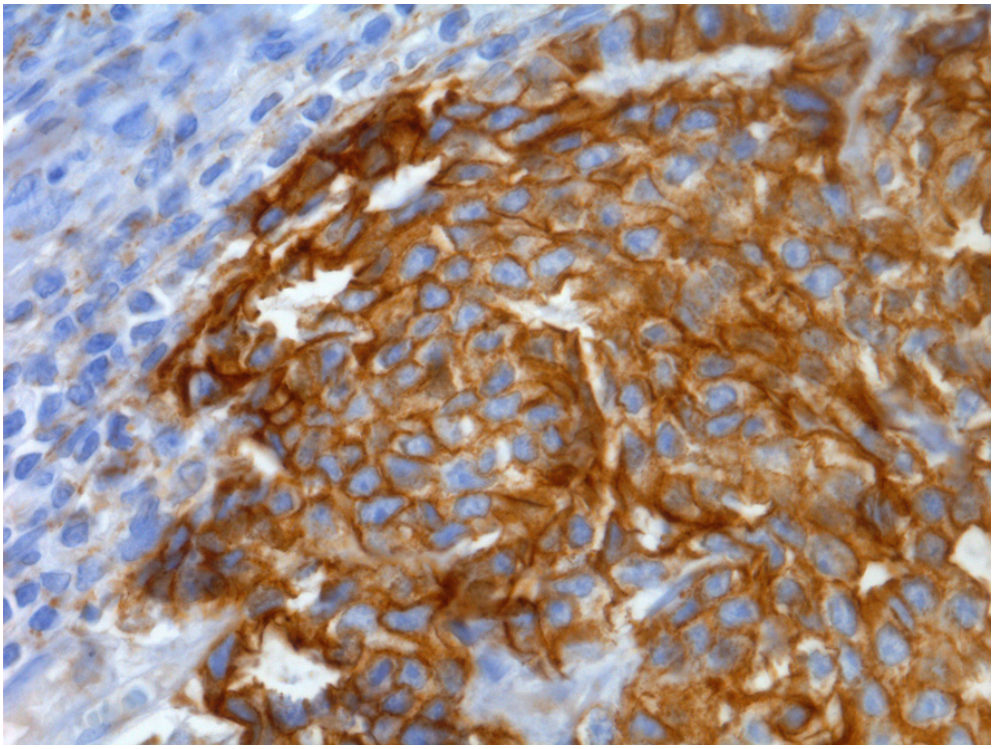


**Figura 56.** Gânglio linfático: metástase ganglionar de carcinoma tubulopapilar. Imunorreactividade para a caderina E (Método estreptavidina-biotina peroxidase, 630x).

# 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

## 4.1. ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E AS LESÕES MAMÁRIAS

As correlações estudadas entre as lesões mamárias estudadas (hiperplasias, tumores benignos e tumores malignos) e as variáveis clínico-patológicas, encontram-se resumidas no Quadro 16.

**Quadro 16.** Correlação entre as variáveis clínico-patológicas e as lesões mamárias.

| *Variáveis clínico-patológicas* | *Hiperplasias n (%)* | *Tumores benignos n (%)* | *Tumores malignos n (%)* | *p* |
|---|---|---|---|---|
| Raça (*n*=51) | | | | |
| Europeu comum | 6 (75,00%) | 6 (100,00%) | 29 (78,38%) | p=0,2404 |
| Siamês | 2 (25,00%) | 0 (0,00%) | 8 (21,62%) | N.S. |
| Idade (*n*=52) | | | | |
| <8 anos | 8 (88,89%) | 2 (40,00%) | 7 (18,42%) | **p=0,0007** |
| 8-11 anos | 1 (11,11%) | 3 (60,00%) | 21 (55,26%) | |
| >11 anos | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) | 10 (26,32%) | |
| Ovariectomia (*n*=48) | | | | |
| Não | 9 (90,00%) | 4 (80,00%) | 16 (48,48%) | **p=0,0270** |
| Sim | 1 (10,00%) | 1 (20,00%) | 17 (51,52%) | |
| Anticoncepcionais (*n*=34) | | | | |
| Não | 2 (22,22%) | 0 (0,00%) | 7 (33,33%) | p=0,2198 |
| Sim | 7 (77,78%) | 4 (100,00%) | 14 (66,67%) | N.S. |
| Localização (*n*=41) | | | | |
| Torácica | 1 (10,00%) | 4 (80,00%) | 12 (46,15%) | **p=0,0162** |
| Abdominal | 9 (90,00%) | 1 (20,00%) | 14 (53,85%) | |
| Tamanho (*n*=46) | | | | |
| <2 cm | 4 (36,36%) | 4 (66,67%) | 11 (37,93%) | p=0,5900 |
| 2-3 cm | 2 (18,18%) | 1 (16,67%) | 9 (31,03%) | N.S. |
| >3 cm | 5 (45,45%) | 1 (16,67%) | 9 (31,03%) | |
| Ulceração (*n*=57) | | | | |
| Ausente | 12 (100,00%) | 6 (100,00%) | 31 (79,49%) | **p=0,0358** |
| Presente | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) | 8 (20,51%) | |

N.S. Não significativo.

Com esta associação pretendeu-se estudar variáveis clínico-patológicas relacionáveis com o comportamento biológico das lesões mamárias.

Esta análise revelou correlação estatisticamente significativa entre as diferentes lesões mamárias e a idade, estado reprodutivo, localização da lesão e presença de ulceração cutânea.

A maioria dos animais com lesões hiperplásicas tinha menos de 8 anos de idade, enquanto que os animais com mais de 11 anos pertenciam todos ao grupo com tumores malignos (Gráfico 3).

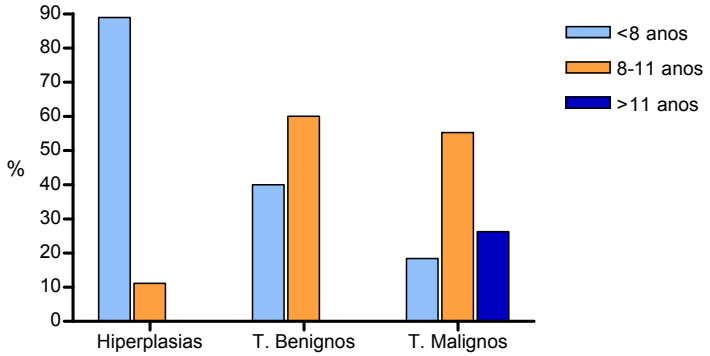



**Gráfico 3.** Associação entre a idade e as lesões mamárias (p=0,0007).

A maioria dos animais com hiperplasias e tumores benignos não eram castrados, enquanto que no grupo de animais com neoplasias malignas, não foram encontradas diferenças relevantes no que diz respeito ao estado reprodutivo (Gráfico 4).

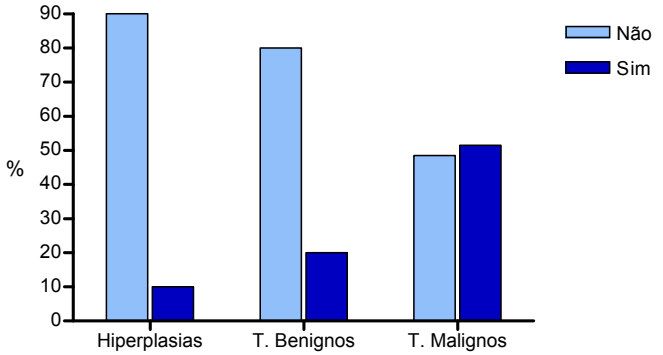



**Gráfico 4.** Associação entre o estado reprodutivo (ovariectomia) e as lesões mamárias (p=0,0270).

No que diz respeito aos tumores malignos, não se encontraram diferenças com a localização, enquanto que nas hiperplasias predominou a localização abdominal e nos tumores benignos a localização torácica (Gráfico 5).

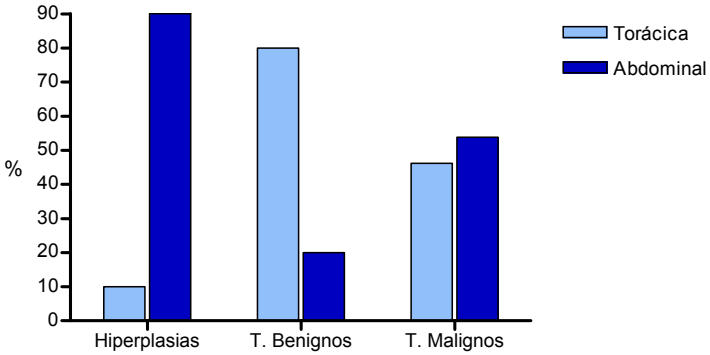



**Gráfico 5.** Associação entre a localização e as lesões mamárias (p=0,0162).

Em todos os casos observados, a presença de ulceração foi exclusiva do grupo de tumores malignos (Gráfico 6).

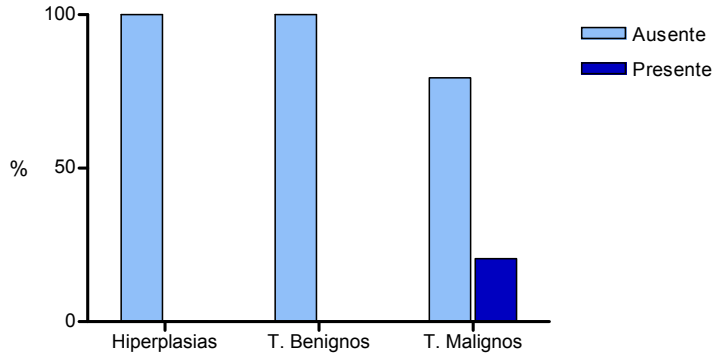



**Gráfico 6.** Associação entre a presença de ulceração e as lesões mamárias (p=0,0358).

## 4.2. ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS E AS LESÕES MAMÁRIAS

As correlações entre as variáveis histopatológicas (infiltrado inflamatório, necrose e padrão de crescimento) e as lesões mamárias, encontram-se resumidas no Quadro 17. Estas associações tiveram como objectivo verificar a validade das variáveis histopatológicas como factores relacionáveis com o comportamento biológico das lesões.

Foi observada correlação estatisticamente significativa entre as diferentes lesões mamárias e a presença de infiltrado inflamatório, de necrose e padrão de crescimento (Quadro 17).

**Quadro 17.** Correlação entre as variáveis histopatológicas e as lesões mamárias.

| ***Variáveis histopatológicas*** | ***Hiperplasias*** ***n (%)*** | ***Tumores benignos*** ***n (%)*** | ***Tumores malignos*** ***n (%)*** | ***p*** |
|---|---|---|---|---|
| Infiltrado inflamatório (*n*=57) | | | | |
| Escasso/ausente | 11 (91,67%) | 5 (83,33%) | 9 (23,08%) | **p<0,0001** |
| Moderado | 0 (0,00%) | 1 (16,67%) | 12 (30,77%) | |
| Intenso | 1 (8,33%) | 0 (0,00%) | 18 (46,15%) | |
| Necrose (*n*=57) | | | | |
| Ausente | 12 (100,00%) | 4 (66,67%) | 3 (7,69%) | **p<0,0001** |
| Presente | 0 (0,00%) | 2 (33,33%) | 36 (92,31%) | |
| Padrão de crescimento (*n*=57) | | | | |
| Expansivo | 12 (100,00%) | 6 (100,00%) | 2 (5,13%) | **p<0,0001** |
| Infiltrativo | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) | 37 (94,87%) | |

A presença de infiltrado inflamatório moderado ou intenso foi praticamente exclusiva de tumores malignos (Gráfico 7).

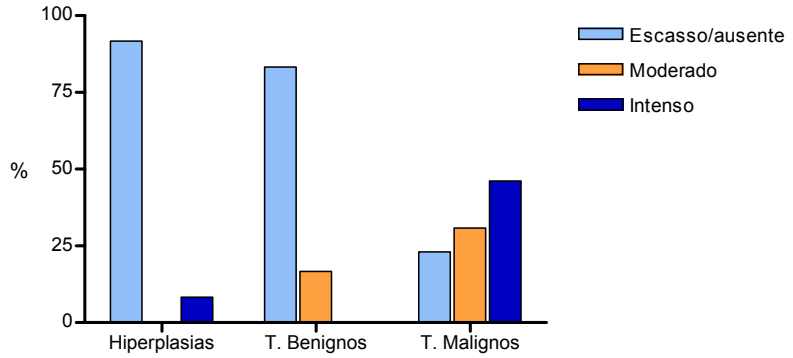



**Gráfico 7.** Associação entre a presença de infiltrado inflamatório e as lesões mamárias (p<0,0001).

A presença de necrose foi observada maioritariamente no grupo de tumores malignos, sendo que a maioria deles apresentava áreas de necrose (Gráfico 8).

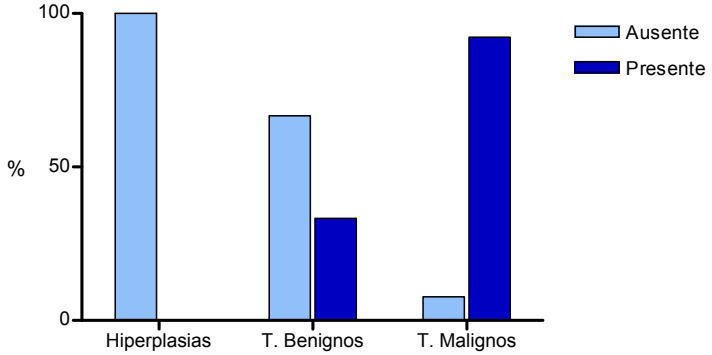



**Gráfico 8.** Associação entre a presença de necrose e as lesões mamárias (p<0,0001).

A maioria dos tumores malignos apresentaram crescimento do tipo expansivo, sendo no presente estudo um padrão de crescimento exclusivo deste tipo de lesões (Gráfico 9).

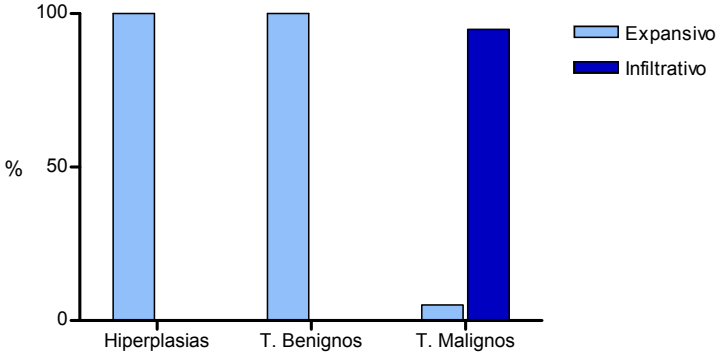



**Gráfico 9.** Associação entre o padrão de crescimento e as lesões mamárias (p<0,0001).

## 4.3. AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DA CADERINA P E A AGRESSIVIDADE BIOLÓGICA

### 4.3.1. ASSOCIAÇÃO ENTRE A IMUNOEXPRESSÃO DA CADERINA P E AS LESÕES MAMÁRIAS

As diferentes lesões mamárias encontraram-se estatisticamente associadas (p=0,0001) com o grau de imunoexpressão aberrante da caderina P (Quadro 18). Em 64,1% dos tumores malignos houve positividade epitelial para a caderina P, enquanto que nos tumores benignos e nas lesões hiperplásicas não se encontrou marcação aberrante para esta caderina.

**Quadro 18.** Correlação entre a expressão da caderina P e as lesões mamárias.

| ***Lesões mamárias*** | ***n*** | ***Imunorreactividade para a caderina P*** | | | | ***p*** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ***0*** | ***1*** | ***2*** | ***3*** | |
| Hiperplasias | 12 | 12 (100,00%) | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) | |
| T. Benignos | 6 | 6 (100,00%) | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) | **p=0,0001** |
| T. Malignos | 39 | 14 (35,90%) | 10 (25,64%) | 8 (20,51%) | 7 (17,95%) | |
| Total | 57 | 32 (56,14%) | 10 (17,54%) | 8 (14,04%) | 7 (12,28%) | |

**0** - <10%; **1** - 10-25%; **2** - 25-50%; **3** - >50%.

A imunoexpressão da caderina P em células epiteliais tumorais foi exclusivamente observada em tumores mamários malignos (Gráfico 10).

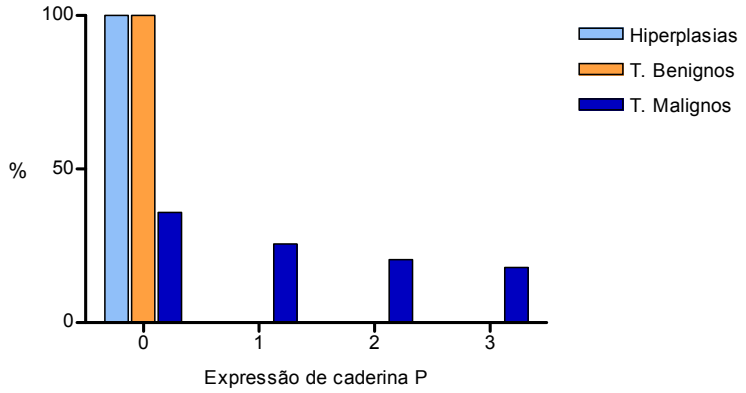



**Gráfico 10.** Associação entre as lesões mamárias e a imunoexpressão da caderina P (p=0,0001).

#### 4.3.2. ASSOCIAÇÃO ENTRE A IMUNOEXPRESSÃO DA CADERINA P E AS VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Os resultados da correlação entre a imunorreactividade aberrante da caderina P e as variáveis clínico-patológicas estudadas, encontram-se resumidas no Quadro 19.

Pôde observar-se uma correlação estatisticamente significativa entre a expressão da caderina P e o uso de anticoncepcionais.

**Quadro 19.** Correlação entre a imunoexpressão da caderina P e as variáveis clínico-patológicas.

| *Variáveis clínico-patológicas* | *Imunorreactividade para a caderina P* | | | | *p* |
|---|---|---|---|---|---|
| | *0* | *1* | *2* | *3* | |
| Raça (*n*=51) | | | | | |
| Europeu comum | 25 (60,98%) | 7 (17,07%) | 4 (9,76%) | 5 (12,20%) | p=0,1459 |
| Siamês | 3 (30,00%) | 2 (20,00%) | 4 (40,00%) | 1 (10,00%) | N.S. |
| Idade (*n*=52) | | | | | |
| <8 anos | 13 (76,47%) | 2 (11,76%) | 1 (5,88%) | 1 (5,88%) | p=0,2922 |
| 8-11 anos | 11 (44,00%) | 6 (24,00%) | 5 (20,00%) | 3 (12,00%) | N.S. |
| >11 anos | 4 (40,00%) | 2 (20,00%) | 1 (10,00%) | 3 (30,00%) | |
| Ovariectomia (*n*=48) | | | | | |
| Não | 19 (65,52%) | 4 (13,79%) | 3 (10,34%) | 3 (10,34%) | p=0,5939 |
| Sim | 9 (47,37%) | 4 (21,05%) | 4 (21,05%) | 2 (10,53%) | N.S. |
| Anticoncepcionais (*n*=34) | | | | | |
| Não | 3 (33,33%) | 2 (22,22%) | 0 (0,00%) | 4 (44,44%) | **p=0,0020** |
| Sim | 17 (68,00%) | 4 (16,00%) | 4 (16,00%) | 0 (0,00%) | |
| Localização (*n*=41) | | | | | |
| Torácica | 7 (41,18%) | 6 (35,29%) | 3 (17,65%) | 1 (5,88%) | p=0,2483 |
| Abdominal | 14 (58,33%) | 3 (12,50%) | 3 (12,50%) | 4 (16,67%) | N.S. |
| Tamanho (*n*=46) | | | | | |
| <2 cm | 13 (68,42%) | 2 (10,53%) | 3 (15,79%) | 1 (5,26%) | p=0,6506 |
| 2-3 cm | 6 (50,00%) | 1 (8,33%) | 2 (16,67%) | 3 (25,00%) | N.S. |
| >3 cm | 9 (60,00%) | 3 (20,00%) | 1 (6,67%) | 2 (13,33%) | |
| Ulceração (*n*=57) | | | | | |
| Ausente | 29 (59,18%) | 9 (18,37%) | 7 (14,29%) | 4 (8,16%) | p=0,2371 |
| Presente | 3 (37,50%) | 1 (12,50%) | 1 (12,50%) | 3 (37,50%) | N.S. |

N.S. Não significativo.
**0** - <10%; **1** - 10-25%; **2** - 25-50%; **3** - >50%.

A maioria das gatas que estavam sujeitas a terapia anticoncepcional correspondiam ao grupo com lesões mamárias negativas para a caderina P. As lesões mamárias que apresentavam expressão elevada para a caderina P pertenciam a gatas que não tinham sido submetidas aquela terapia hormonal (Gráfico 11).

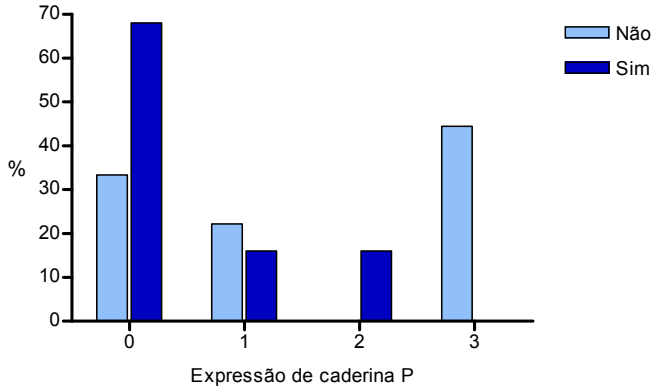



**Gráfico 11.** Associação entre o uso de anticoncepcionais e a imunoexpressão da caderina P (p=0,0020).

### 4.3.3. ASSOCIAÇÃO ENTRE A IMUNOEXPRESSÃO DA CADERINA P E AS VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS

Os resultados da correlação entre a imunorreactividade aberrante da caderina P e as variáveis histopatológicas estudadas, encontram-se resumidos no Quadro 20.

A análise revelou uma associação estatisticamente significativa entre a expressão da caderina P e a presença de infiltrado inflamatório, de necrose e o padrão de crescimento.

**Quadro 20.** Correlação entre a imunoexpressão da caderina P e as variáveis histopatológicas.

| ***Variáveis histopatológicas*** | ***Imunorreactividade para a caderina P*** | | | | ***p*** |
|---|---|---|---|---|---|
| | ***0*** | ***1*** | ***2*** | ***3*** | |
| Infiltrado inflamatório (*n*=57) | | | | | |
| Escasso/ausente | 20 (80,00%) | 2 (8,00%) | 2 (8,00%) | 1 (4,00%) | **p=0,0226** |
| Moderado | 4 (30,77%) | 5 (38,46%) | 1 (7,69%) | 3 (23,08%) | |
| Intenso | 8 (42,11%) | 3 (15,79%) | 5 (26,32%) | 3 (15,79%) | |
| Necrose (*n*=57) | | | | | |
| Ausente | 18 (94,74%) | 1 (5,26%) | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) | **p<0,0001** |
| Presente | 14 (36,84%) | 9 (23,68%) | 8 (21,05%) | 7 (18,42%) | |
| Padrão de crescimento (*n*=57) | | | | | |
| Expansivo | 20 (100,00%) | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) | **p<0,0001** |
| Infiltrativo | 12 (32,43%) | 10 (27,03%) | 8 (21,62%) | 7 (18,92%) | |

**0** - <10%; **1** - 10-25%; **2** - 25-50%; **3** - >50%.

A maioria dos casos com positividade para a caderina P (grupos 1, 2 e 3) apresentou infiltrado inflamatório moderado a intenso, enquanto que os casos negativos (grupo 0) na sua maioria apresentaram infiltrado inflamatório escasso ou mesmo ausente (Gráfico 12).

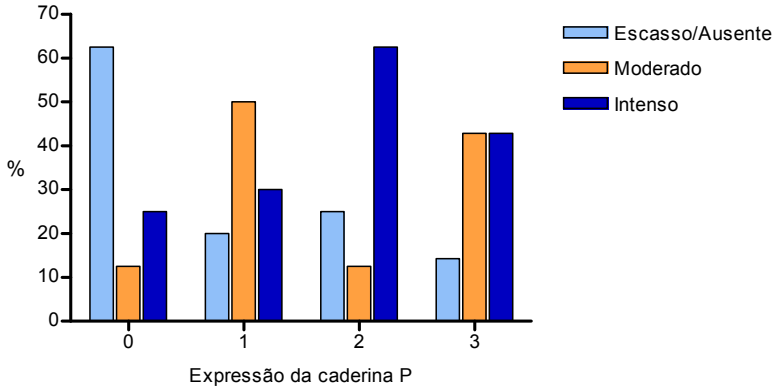



**Gráfico 12.** Associação entre a presença de infiltrado inflamatório e a imunoexpressão da caderina P (p=0,0226).

A grande maioria dos casos com imunorreactividade à caderina P tinha necrose (Gráfico 13).

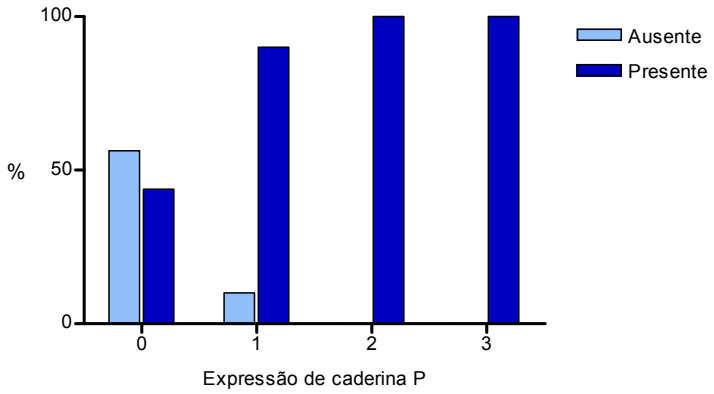



**Gráfico 13.** Associação entre a presença de necrose e a imunoexpressão da caderina P (p<0,0001).

A imunoexpressão aberrante da caderina P foi exclusiva de lesões mamárias com padrão de crescimento infiltrativo (Gráfico 14).

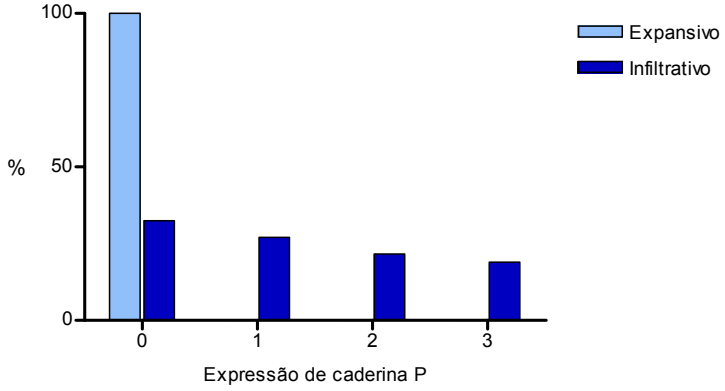



**Gráfico 14.** Associação entre o padrão de crescimento e a imunoexpressão da caderina P (p<0,0001).

#### 4.3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA NO GRUPO DE TUMORES MALIGNOS

##### 4.3.4.1. ASSOCIAÇÃO ENTRE A IMUNOEXPRESSÃO DA CADERINA P E O TIPO HISTOLÓGICO

No grupo de tumores malignos não se encontrou uma associação estatisticamente significativa entre a imunoexpressão da caderina P e o tipo histológico, tal como pode ser observado no Quadro 21.

**Quadro 21.** Correlação entre a imunoexpressão da caderina P e o tipo histológico dos tumores malignos.

| *Tipo histológico* | *n* | *Imunorreactividade para a caderina P* | | | | *p* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *0* | *1* | *2* | *3* | |
| Carcinoma tubulopapilar | 18 | 6 (33,33%) | 5 (27,78%) | 4 (22,22%) | 3 (16,67%) | p=0,8993 N.S. |
| Carcinoma sólido | 20 | 7 (35,00%) | 5 (25,00%) | 4 (20,00%) | 4 (20,00%) | |
| Carcinoma cribiforme | 1 | 1 (100,00%) | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) | |
| Total | 39 | 14 (35,90%) | 10 (25,64%) | 8 (20,51%) | 7 (17,95%) | |

N.S. Não significativo.
**0** - <10%; **1** - 10-25%; **2** - 25-50%; **3** - >50%.

##### 4.3.4.2. ASSOCIAÇÃO ENTRE A IMUNOEXPRESSÃO DA CADERINA P E O GRAU HISTOLÓGICO

Relativamente à expressão aberrante da caderina P e a sua correlação com o grau histológico dos tumores malignos, foi encontrada uma associação estatisticamente significativa (Quadro 22).

**Quadro 22.** Correlação entre a expressão da caderina P e o grau histológico dos tumores malignos.

| *Grau Histológico* | *n* | *Imunorreactividade para a caderina P* | | | | *p* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *0* | *1* | *2* | *3* | |
| Grau 1 | 17 | 4 (23,53%) | 6 (35,29%) | 4 (23,53%) | 3 (17,65%) | **p=0,0132** |
| Grau 2 | 17 | 10 (58,82%) | 4 (23,53%) | 2 (11,76%) | 1 (5,88%) | |
| Grau 3 | 5 | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) | 2 (40,00%) | 3 (60,00%) | |
| Total | 39 | 14 (35,90%) | 10 (25,64%) | 8 (20,51%) | 7 (17,95%) | |

**0** - <10%; **1** - 10-25%; **2** - 25-50%; **3** - >50%.

A maioria dos tumores malignos de grau 1 e grau 2 revelaram marcação de caderina P em menos de 25% das células (Quadro 15). Todos os tumores malignos de grau 3 apresentaram imunomarcação em mais de 25% das células (Gráfico 15).

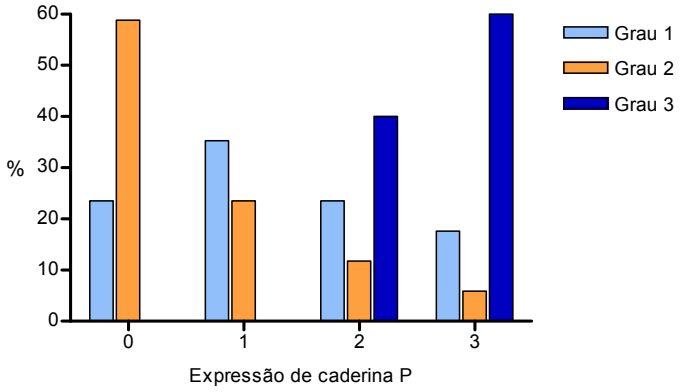



**Gráfico 15.** Associação entre o grau histológico e a imunoexpressão da caderina P (p=0,0132).

## 4.4. AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE IMUNOEXPRESSÃO DA CADERINA E E A AGRESSIVIDADE BIOLÓGICA

### 4.4.1. ASSOCIAÇÃO ENTRE O PADRÃO DE IMUNOEXPRESSÃO DA CADERINA E E AS LESÕES MAMÁRIAS

Não foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre o padrão de imunoexpressão da caderina E e as diferentes lesões mamárias (p=0,2714) (Quadro 23).

**Quadro 23.** Correlação entre o padrão de imunoexpressão da caderina E e as lesões mamárias.

| ***Lesões mamárias*** | ***n*** | ***Padrão de imunorreactividade para a caderina E*** | | | ***p*** |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ***C*** | ***C+M*** | ***M*** | |
| Hiperplasias | 12 | 0 (0,00%) | 3 (25,00%) | 9 (75,00%) | p=0,2714 N.S. |
| T. Benignos | 6 | 0 (0,00%) | 2 (33,33%) | 4 (66,67%) | |
| T. Malignos | 39 | 2 (5,13%) | 20 (51,28%) | 17 (43,59%) | |
| Total | 57 | 2 (3,51%) | 25 (43,86%) | 30 (52,63%) | |

N.S. Não significativo.
**C** - citoplasmática; **M** – membranar.

### 4.4.2. ASSOCIAÇÃO ENTRE O PADRÃO DE IMUNOEXPRESSÃO DA CADERINA E E AS VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Os resultados da correlação entre o padrão de marcação da caderina E e as variáveis clínico-patológicas estudadas, encontram-se resumidos no Quadro 24.

A análise não revelou associação estatisticamente significativa entre as variáveis clínico-patológicas e o padrão de expressão da caderina E.

**Quadro 24.** Correlação entre o padrão de imunoexpressão da caderina E e as variáves clínico-patológicas.

| *Variáveis clínico-patológicas* | *Padrão de imunorreactividade para a caderina E* | | | *p* |
|---|---|---|---|---|
| | *C* | *C+M* | *M* | |
| Raça *(n*=51) | | | | |
| Europeu comum | 2 (4,88%) | 17 (41,46%) | 22 (53,66%) | p=0,6266 |
| Siamês | 0 (0,00%) | 4 (40,00%) | 6 (60,00%) | N.S. |
| Idade (*n*=52) | | | | |
| <8 anos | 0 (0,00%) | 7 (41,18%) | 10 (58,82%) | p=0,6365 |
| 8-11 anos | 1 (4,00%) | 11 (44,00%) | 13 (52,00%) | N.S. |
| >11 anos | 1 (10,00%) | 5 (50,00%) | 4 (40,00%) | |
| Ovariectomia (*n*=48) | | | | |
| Não | 0 (0,00%) | 10 (34,48%) | 19 (65,52%) | p=0,3088 |
| Sim | 1 (5,26%) | 8 (42,11%) | 10 (52,63%) | N.S. |
| Anticoncepcionais (*n*=34) | | | | |
| Não | 1 (11,11%) | 3 (33,33%) | 5 (55,56%) | p=0,2435 |
| Sim | 0 (0,00%) | 8 (32,00%) | 17 (68,00%) | N.S. |
| Localização (*n*=41) | | | | |
| Torácica | 0 (0,00%) | 7 (41,18%) | 10 (58,82%) | p=0,5741 |
| Abdominal | 1 (4,17%) | 10 (41,67%) | 13 (54,17%) | N.S. |
| Tamanho (*n*=46) | | | | |
| <2 cm | 1 (5,26%) | 9 (47,37%) | 9 (47,37%) | p=0,7461 |
| 2-3 cm | 0 (0,00%) | 5 (41,67%) | 7 (58,33%) | N.S. |
| >3 cm | 1 (6,67%) | 5 (33,33%) | 9 (60,00%) | |
| Ulceração (*n*=57) | | | | |
| Ausente | 1 (2,04%) | 22 (44,90%) | 26 (53,06%) | p=0,4586 |
| Presente | 1 (12,50%) | 3 (37,50%) | 4 (50,00%) | N.S. |

N.S. Não significativo.
**C** - citoplasmática; **M** – membranar.

### 4.4.3. ASSOCIAÇÃO ENTRE O PADRÃO DE IMUNOEXPRESSÃO DA CADERINA E E AS VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS

Os resultados da associação entre o padrão de marcação da caderina E e as variáveis histopatológicas estudadas, encontram-se resumidos no Quadro 25.

Não se encontrou associação estatisticamente significativa entre as variáveis histopatológicas e o padrão de expressão da caderina E.

**Quadro 25.** Correlação entre o padrão de imunoexpressão da caderina E e as variáves histopatológicas.

| *Variáveis histopatológicas* | *Padrão de imunorreactividade para a caderina E* | | | *p* |
|---|---|---|---|---|
| | *C* | *C+M* | *M* | |
| Infiltrado inflamatório (*n*=57) | | | | |
| Escasso/ausente | 1 (4,00%) | 11 (44,00%) | 13 (52,00%) | p=0,7233 |
| Moderado | 1 (7,69%) | 6 (46,15%) | 6 (46,15%) | N.S. |
| Intenso | 0 (0,00%) | 8 (42,11%) | 11 (57,89%) | |
| Necrose (*n*=57) | | | | |
| Ausente | 0 (0,00%) | 7 (36,84%) | 12 (63,16%) | p=0,2816 |
| Presente | 2 (5,26%) | 18 (47,37%) | 18 (47,37%) | N.S. |
| Padrão de crescimento (*n*=57) | | | | |
| Expansivo | 0 (0,00%) | 7 (35,00%) | 13 (65,00%) | p=0,2050 |
| Infiltrativo | 2 (5,41%) | 18 (48,65%) | 17 (45,95%) | N.S. |

N.S. Não significativo.
**C** - citoplasmática; **M** - membranar.

#### 4.4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA NO GRUPO DE TUMORES MALIGNOS

##### 4.4.4.1. ASSOCIAÇÃO ENTRE O PADRÃO DE IMUNOEXPRESSÃO DA CADERINA E E O TIPO HISTOLÓGICO

A maioria dos tumores mamários malignos estudados (n=22; 56,41%) apresentou expressão aberrante de caderina E (expressão citoplasmática). No entanto, não se verificou associação estatisticamente significativa entre a expressão da caderina E e os tipos histológicos em estudo (Quadro 26).

**Quadro 26.** Correlação entre o padrão de imunoexpressão da caderina E e o tipo histológico dos tumores malignos.

| *Tipo Histológico* | *n* | *Padrão de imunorreactividade para a caderina E* | | | *p* |
|---|---|---|---|---|---|
| | | *C* | *C+M* | *M* | |
| Carcinoma tubulopapilar | 18 | 1 (5,56%) | 11 (61,11%) | 6 (33,33%) | p=0,5211 N.S. |
| Carcinoma sólido | 20 | 1 (5,00%) | 8 (40,00%) | 11 (55,00%) | |
| Carcinoma cribiforme | 1 | 0 (0,00%) | 1 (100,00%) | 0 (0,00%) | |
| Total | 39 | 2 (5,13%) | 20 (51,28%) | 17 (43,59%) | |

N.S. Não significativo.
**C** - citoplasmática; **M** – membranar.

#### 4.4.4.2. ASSOCIAÇÃO ENTRE O PADRÃO DE IMUNOEXPRESSÃO DA CADERINA E E O GRAU HISTOLÓGICO

Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a expressão da caderina E e o grau histológico (Quadro 27). No entanto, a maioria dos carcinomas de grau 1 (*n*=10; 59,82%) e de grau 3 (*n*=3; 60%) apresentaram expressão aberrante de caderina E (expressão citoplasmática).

**Quadro 27.** Correlação entre o padrão de imunoexpressão da caderina E e o grau histológico dos tumores malignos.

| ***Grau histológico*** | ***n*** | ***Padrão de imunorreactividade para a caderina E*** | | | ***p*** |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ***C*** | ***C+M*** | ***M*** | |
| Grau 1 | 17 | 1 (5,88%) | 9 (52,94%) | 7 (41,18%) | p=0,5196 N.S. |
| Grau 2 | 17 | 0 (0,00%) | 9 (52,94%) | 8 (47,06%) | |
| Grau 3 | 5 | 1 (20,00%) | 2 (40,00%) | 2 (40,00%) | |
| Total | 39 | 2 (5,13%) | 20 (51,28%) | 17 (43,59%) | |

N.S. Não significativo.
**C** - citoplasmática; **M** – membranar.

### 4.5. ASSOCIAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DA CADERINA E E A EXPRESSÃO DA CADERINA P

A análise não revelou correlação estatisticamente significativa entre o padrão de expressão da caderina E e a imunorreactividade à caderina P nas lesões mamárias em estudo (Quadro 28).

**Quadro 28.** Correlação entre o padrão de imunoexpressão da caderina E e a imunorreactividade à caderina P.

| ***Imunorreactividade para a caderina E*** | ***n*** | ***Imunorreactividade para a caderina P*** | | | | ***p*** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ***0*** | ***1*** | ***2*** | ***3*** | |
| C | 2 | 1 (3,13%) | 0 (0,00%) | 0 (0,00%) | 1 (14,29%) | p=0,6460 N.S. |
| M+C | 25 | 13 (40,63%) | 5 (50,00%) | 3 (37,50%) | 4 (57,14%) | |
| M | 30 | 18 (56,25%) | 5 (50,00%) | 5 (62,50%) | 2 (28,57%) | |
| Total | 57 | 32 (56,14%) | 10 (17,54%) | 8 (14,04%) | 7 (12,28%) | |

N.S. Não significativo.
C - citoplasmática; M - membranar.
**0** - <10%; **1** - 10-25%; **2** - 25-50%; **3** - >50%.

# DISCUSSÃO

Os tumores mamários são considerados a terceira neoplasia mais comum em gatas. Devido às semelhanças em termos de características histológicas e evolução clínica com os tumores mamários em mulheres, os carcinomas mamários felinos têm sido propostos como bons modelos de estudo destes tumores (Misdorp e Weijer, 1980).

A escolha dos felídeos como objecto do presente estudo, relacionou-se com o facto de ser considerado um modelo que apresenta diversos parâmetros histológicos e clínico-patológicos semelhantes ao verificado no cancro da mama da mulher, tornando-o um excelente modelo para o estudo da carcinogénese mamária humana, bem como com a escassez de informação sobre as neoplasias mamárias em gatas.

Com o presente trabalho pretendeu-se contribuir para o conhecimento da carcinogénese mamária em felídeos, mediante o estudo de uma série de tecidos mamários, que incluiu glândula mamária normal, hiperplasias e tumores mamários benignos e malignos.

A classificação histológica dos tumores mamários de felídeos neste estudo foi feita com base na classificação proposta pela OMS para tumores mamários de animais domésticos (Misdorp *et al*., 1999), que é, por norma, a classificação utilizada na literatura tanto para tumores mamários de felídeos (Dias Pereira *et al*., 2004; Dias Pereira e Gärtner, 2003; Preziosi *et al*., 2002; Sarli *et al*., 2003), como para tumores mamários de canídeos (Brunetti *et al*., 2005; Gama *et al*., 2004, 2008; Matos *et al*., 2004, 2007; Sarli *et al*., 2004). Assim, das 57 lesões mamárias em estudo, 12 foram classificadas como hiperplasias, 6 como tumores benignos e 39 como tumores malignos. Mais uma vez se verificou a elevada frequência de tumores mamários malignos (n=39; 86,67%) relativamente aos tumores benignos (n=6; 13,33%) na espécie felina, concordante com o descrito na literatura (Ginn *et al*., 2007; Jones *et al*., 1997; Lana *et al*., 2007; Rutteman e Kirpensteigh, 2003). Relativamente aos tumores malignos, foram todos classificados de carcinomas tubulopapilares ou carcinomas sólidos (à excepção de um carcinoma cribiforme), que correspondem aos tipos histológicos de tumores mamários mais comummente observados em felídeos (Weijer e Hart, 1983).

A determinação do grau histológico dos carcinomas em estudo foi realizada de acordo com a classificação modificada do sistema de *Bloom* e *Richardson* para as neoplasias mamárias humanas (Método de *Nottingham*) (Elston e Ellis, 1998), de forma semelhante à utilizada em alguns estudos de tumores mamários de canídeos (Gama *et al*., 2004, 2008; Matos *et al*., 2006) e de tumores mamários de felinos (Seixas et al., 2008a). Os graus histológicos 1 (43,59%) e 2 (43,59%) foram os prevalentes, com a maioria dos carcinomas tubulopapilares (77,78%) grau 1 e a maioria dos carcinomas sólidos (85%) graus 2 e 3.

Procedeu-se a uma avaliação clínico-patológica (raça, idade, estado reprodutivo, medicação anticoncepcional, localização, tamanho e ulceração cutânea) e histopatológica (infiltrado inflamatório, necrose e padrão de crescimento) para uma melhor caracterização dos casos em estudo.

A maioria dos animais estudados, cuja raça se conhecia, eram Europeus comuns (80,39%) sendo os restantes Siameses (19,61%), duas raças que estão descritas com maior taxa de incidência de tumores mamários (Amorim *et al*., 2006; Lana *et al*., 2007; Rutteman e Kirpensteign, 2003).

No que diz respeito à idade, a idade média dos animais com lesões mamárias foi de 8,8 anos, com uma média crescente de idades começando nas lesões hiperplásicas (5,22), para neoplásicas benignas (8,75) e para neoplásicas malignas (9,97). A idade média de ocorrência de neoplasias mamárias descrita na literatura é de 10 a 12 anos (Lana *et al*., 2007; Misdorp e Weijer, 1980; Rutteman e Kirpensteigh, 2003).

Exitem descrições divergentes relativamente às glândulas mamárias mais frequentemente afectadas por tumores em felídeos (Amorim *et al*., 2006; Moore e Ogilvie, 2001; Viste *et al*., 2002; Weijer *et al*., 1972). Os resultados aqui apresentados não revelaram diferenças relevantes quanto à localização dos tumores mamários malignos na cadeia mamária, no entanto, nas hiperplasias mamárias predominou a localização nas glândulas abdominais e nos tumores benignos a localização nas glândulas torácicas.

Quanto ao tamanho das lesões mamárias, a maioria dos tumores mamários benignos apresentou tamanho inferior a 2 cm, enquanto que a maioria dos tumores malignos tinham tamanho superior a 2 cm. O tamanho tumoral é considerado por alguns autores como o factor de prognóstico mais significativo (MacEwen *et al*., 1984; Weijer e Hart, 1983).

Relativamente à situação reprodutiva das gatas com lesões mamárias, a maioria não era castrada e estava sujeita a terapia anticoncepcional, dois factores que se sabe estarem associados a um maior risco de aparecimento de tumores mamários (Lana *et al*., 2007; Misdorp, 2002; Moore, 2006; Overley *et al*., 2005).

A presença de ulceração cutânea foi exclusiva de tumores mamários malignos e é considerada, por alguns autores, um factor de mau prognóstico (Amorim *et al*., 2006; Weijer e Hart, 1983).

No que diz respeito às variáveis histopatológicas, a presença de infiltrado inflamatório moderado a intenso ocorreu na maioria das lesões mamárias malignas, sendo que nas hiperplasias e nos tumores benignos este foi maioritariamente escasso ou ausente. Segundo Weijer e Hart 1983, a presença de elevado grau de infiltrado inflamatório crónico está associado a pior prognóstico e consideram haver uma relação positiva entre a presença de infiltrado inflamatório crónico e a presença de necrose. Na maioria dos tumores mamários malignos foi observada presença de necrose, que se sabe ser comum em carcinomas mamários de felinos (Weijer *et al*., 1972; Misdorp e Weijer, 1980 ) e estar relacionada com o prognóstico (Weijer e Hart, 1983). Relativamente ao padrão de crescimento, enquanto que as hiperplasias e os tumores benignos apresentaram um padrão expansivo, nos tumores mamários malignos a grande maioria apresentou um padrão infiltrativo, que parece ter relação com o prognóstico (Weijer e Hart, 1983). De facto, a literatura refere que a maioria dos carcinomas felinos tem um padrão de crescimento altamente infiltrativo (Misdorp e Weijer, 1980). Sarli *et al*., 2003 verificaram ainda associação entre o estadio histológico (grau histológico de invasão) e o prognóstico em carcinomas mamários felinos.

Foram encontradas correlações estatisticamente significativas entre o tipo de lesão mamária (hiperplasia, tumor benigno ou tumor maligno) e a idade (p=0,0007), o estado reprodutivo (p=0,0270), a

localização (p=0,0162), a presença de ulceração (p=0,0358), de infiltrado inflamatório (p<0,0001) e de necrose (p<0,0001), bem como com o padrão de crescimento (p<0,0001). Com esta associação pretendeu-se determinar as variáveis clínico-patológicas e histopatológicas relacionáveis com o comportamento biológico das lesões mamárias.

Em Medicina Veterinária tem-se assistido a um crescente esforço de associar aos factores clássicos de prognóstico, novos parâmetros de natureza molecular, que forneçam informação útil sobre a progressão das lesões malignas e que auxiliem a decisão clínica, à semelhança do verificado em Medicina Humana (Queiroga e Lopes, 2002). Um dos parâmetros moleculares que tem sido estudado são as moléculas de adesão celular, nomeadamente a caderina E (Brunetti *et al*., 2005, Dias Pereira e Gärtner, 2003, Gama *et al*., 2008, Pinho *et al*., 2007, Restucci *et al*., 1997, Sarli *et al*., 2004) e a caderina P (Gama *et al*., 2002, 2004, 2008).

As caderinas são moléculas de adesão celular importantes na morfogénese e na manutenção da arquitectura tecidular normal. O controlo da adesão e da motilidade celular é um dos mecanismos cruciais responsáveis pela iniciação e progressão tumoral (Pećina-Šlaus, 2003). A caderina P (Gamallo *et al*., 2001; Palacios *et al*., 1995; Paredes *et al*., 2002a, 2002b, 2002c, 2005) e a caderina E (Berx *et al*., 1995; Berx e van Roy, 2001) são caderinas clássicas que têm sido recentemente implicadas na carcinogénese mamária humana. Assim, e considerando os tumores mamários de felídeos como um possível modelo de estudo do cancro da mama humano, procedeu-se ao estudo da caderina P e da caderina E em lesões mamárias felinas.

Para o estudo da expressão da caderina P e da caderina E recorreu-se a técnicas de imunohistoquímica. A imunohistoquímica, também designada por histologia molecular, permite uma ligação entre a biologia molecular e as características histológicas e comportamentais dos tumores. Esta técnica permite obter informação sobre a localização de produtos génicos, dando a conhecer o nível de expressão génica nas células normais e nas células tumorais (Campbell e Pignatelli, 2002).

Todas as técnicas de imunohistoquímica foram realizadas num aparelho de processamento automatizado que, segundo Cassali *et al*., 2001, tem como grandes vantagens a qualidade melhorada, a reprodutibilidade, rapidez e a estandardização.

Tal como foi referido anteriormente, a imunohistoquímica em patologia veterinária tem algumas limitações devido à falta de anticorpos específicos para marcadores celulares em animais. A maioria dos anticorpos disponíveis no mercado são produzidos contra proteínas de origem humana, o que tem condicionado a sua utilização nas diversas espécies animais (Cassali *et al*., 2001; Pires *et al*., 2004), sendo que o mesmo se verificou com os anticorpos utilizados neste trabalho. Assim, foi necessário demonstrar a imunorreactividade cruzada para os anticorpos em questão, mediante o uso de tecidos humanos como controlos positivos. Para além disso, teve de se aferir a técnica de imunohistoquímica, nomeadamente o protocolo de recuperação antigénica para cada anticorpo, de modo a se conseguir a marcação adequada. Não se pode deixar de mencionar, no entanto, que com o primeiro anticorpo anti-caderina E utilizado, mesmo mediante alteração do protocolo de recuperação antigénica, não se obteve

qualquer marcação nos tecidos mamários felinos, tornando óbvia a limitação do uso de alguns anticorpos anti-proteínas humanas.

No entanto, e de forma semelhante a Cassali *et al*., 2001, conseguiu-se demonstrar que é possível o uso de anticorpos anti-proteínas humanas em imunohistoquímica na patologia veterinária, nomeadamente o anticorpo anti-caderina E e o anticorpo anti-caderina P, através de um sistema de processamento automatizado.

Desconhece-se até à presente data qualquer estudo de imunoexpressão da caderina P em tecidos mamários felinos. Assim, e por não se ter encontrado qualquer referência à avaliação imunohistoquímica desta molécula em felídeos, os resultados obtidos são discutidos em função dos resultados descritos na literatura em humanos e em canídeos. Relativamente à expressão da caderina E em tecidos mamários de felídeos, existe um estudo realizado até à data por Dias Pereira e Gärtner, 2003.

No presente estudo, a imunoexpressão da caderina P na glândula mamária normal, hiperplásica e em tumores benignos de felídeos, apresentou um padrão de distribuição semelhante ao descrito na mulher (Gamallo *et al*., 2001; Kovács e Walter, 2003; Palacios *et al*., 1995). Os tecidos mamários felinos normais revelaram imunorreactividade cruzada para a caderina P humana, com marcação ao nível das células da camada basal dos ductos e dos alvéolos, que corresponde estruturalmente ao mioepitélio. Comparativamente ao padrão descrito por outros autores (Gama *et al*., 2002, 2004) na glândula mamária normal e hiperplásica de canídeos, o padrão de distribuição da caderina P observado em felídeos foi semelhante, no entanto, foram encontradas diferenças relativamente aos tumores mamários benignos (Gama *et al*., 2004). Enquanto que os tumores mamários benignos dos felídeos estudados foram negativos para a expressão aberrante da caderina P (com menos de 10% de células imunorreactivas), nos tumores benignos caninos num estudo da literatura (Gama *et al*., 2004) foi verificada marcação aberrante em 43% dos tumores (com marcação em 10 a 25% das células).

No que diz respeito à imunomarcação da caderina E na glândula mamária normal, hiperplásica e nos tumores benignos dos felídeos em estudo, esta foi verificada em células epiteliais de forma semelhante à descrita nos tecidos mamários da mulher (Berx e van Roy, 2001; Cowin *et al*., 2005; Daniel *et al*., 1995; Gamallo *et al*., 1993; Palacios *et al*., 1995; Parker *et al*., 2001; Wheelock *et al*., 2001), de canídeos (Restucci *et al*., 1997; Sarli *et al*., 2004) e de felídeos (Dias Pereira e Gärtner, 2003).

No tecido mamário lactante ou pseudo-lactante, observou-se imunomarcação da caderina P no epitélio luminal e na secreção luminal, para além da sua localização ao nível do mioepitélio, tal como descrito para tecidos mamários humanos (Peralta Soler *et al*., 2002) e canídeos (Gama *et al*., 2002) em lactação. As células epiteliais secretoras apresentaram expressão essencialmente citoplasmática apical, ou seja, com um padrão de expressão semelhante ao de células apócrinas epiteliais. Segundo Gama *et al*., 2002, em tecidos mamários caninos este padrão de expressão, semelhante ao descrito para proteínas secretadas, sugere que esta caderina pode não estar a funcionar como uma molécula de

adesão, mas sim envolvida em fenómenos de remodelação do tecido mamário canino, já que apenas surge nas células epiteliais luminais normais durante o período de lactação. O facto de no leite materno humano existirem fragmentos solúveis da caderina P, levou a supor que podem eventualmente resultar da proteólise do domínio extracelular desta caderina (Peralta Soler *et al*., 2002). Nestes tecidos, a expressão da caderina E não se encontrava alterada, de forma semelhante ao verificado por Peralta Soler *et al*., 2002 em tecido mamário lactante da mulher.

A caderina P não é expressa pelas células epiteliais da glândula mamária normal. No entanto, ao avaliar-se a imunoexpressão da caderina P em tumores mamários malignos da espécie felina, detectou-se esta molécula a nível das células epiteliais. Assim, 25 tumores mamários malignos (64,1%) evidenciaram uma expressão aberrante da caderina P em células epiteliais luminais. A marcação epitelial aberrante desta caderina no grupo de tumores malignos está de acordo com resultados de estudos prévios em humanos (Gamallo *et al*., 2001; Kovács *et al*., 2003; Palacios *et al*., 1995; Paredes *et al*., 2002a, 2002c, 2005; Peralta Soler *et al*., 1999) e em canídeos (Gama *et al*., 2004). De facto, no estudo realizado por Gama *et al*., 2004 em canídeos foi encontrada expressão aberrante epitelial em 16 (64%) dos tumores mamários malignos estudados, uma percentagem semelhante à observada no presente estudo.

A expressão aberrante da caderina P nas células neoplásicas dos tumores felinos estudados tinha localização membranar, frequentemente associada com expressão citoplasmática, de forma semelhante ao descrito em humanos (Paredes *et al*., 2002a, 2005). Peralta Soler *et al*., 1999 descreveram uma maior expressão da caderina P nas células periféricas de ninhos invasivos de carcinomas ductais, resultados que corroboram o presente estudo, onde também foi observada maior marcação nas células das áreas periféricas dos tumores.

Várias teorias têm sido propostas para explicar a expressão aberrante da caderina P (Gamallo *et al*., 2001; Peralta Soler *et al*., 1999; Shimoyama e Hirohashi, 1991), no entanto, o significado biológico desta expressão na carcinogénese mamária é ainda pouco compreendido. Apesar disso, a caderina P tem sido considerada um marcador de progressão do cancro da mama (Gamallo *et al*., 2001).

Relativamente à imunoexpressão da caderina E nos tumores malignos em estudo, e contrariamente ao observado em canídeos (Gama *et al., 2008*; Matos *et al*., 2006, 2007; Restucci *et al*., 1997; Sarli *et al*., 2007), em felídeos (Dias Pereira e Gärtner, 2003) e em humanos (Berx *et al*., 1995; Berx e van Roy, 2001; Gamallo *et al*., 1993; Parker *et al*., 2001), não foi observada diminuição ou perda de expressão com o método semi-quantitativo utilizado para classificar a imunoexpressão (0 - <25%; 1 - 26-50%; 2 - 50-75%; 3 - >75% de células imunorreactivas à caderina E). No presente estudo, todos os tumores malignos foram classificados no grupo 3, ou seja, com mais de 75% das células tumorais imunorreactivas à caderina E. Dias Pereira e Gärtner, 2003 utilizaram um método de quantificação diferente (0 - <10%: 1 - 10-90%; 2 - >90% de células imunorreactivas à caderina E) e verificaram uma diminuição da marcação da caderina E em alguns tumores malignos. O diferente método semi-quantitativo de classificação da imunoexpressão pode justificar a diferença de resultados obtidos. De

facto, em certas regiões de alguns tumores malignos do presente estudo, verificou-se uma diminuição da imunomarcação, principalmente nas áreas mais sólidas quando comparadas com as tubulopapilares, mas nunca foi inferior a 75% das células tumorais. De forma semelhante, foram descritas diferenças de imunoexpressão da caderina E entre carcinomas sólidos e tubulares/tubulopapilares, em estudos de neoplasias mamárias malignas de felídeos (Dias Pereira e Gärtner, 2003) e de canídeos (Matos *et al*., 2006; Sarli *et al*., 2004).

Na glândula mamária normal, a caderina P é expressa apenas pelas células mioepiteliais, sugerindo a hipótese de a presença desta molécula em tumores mamários de felídeos indicar uma diferenciação mioepitelial destes tecidos. Para investigar esta hipótese, recorreu-se ao uso de marcadores imunohistoquímicos clássicos, no sentido de melhor caracterizar as células imunorreactivas à caderina P. Têm surgido marcadores moleculares, como a calponina e a p63, que demonstram sensibilidade para as células mioepiteliais dos tecidos mamários humanos (Deugnier *et al*., 2002, Foschini e Eusebi, 1998) e caninos (Espinosa de los Monteros *et al*., 2002; Gama *et al*., 2003). Como marcador de células mioepiteliais, recorreu-se à p63 que está descrita como um marcador mioepitelial sensível e de elevada especificidade em tumores mamários de canídeos (Gama *et al*., 2003) e de humanos (Deugnier *et al*., 2002; Moinfar, 2007). Utilizou-se a pan-citoqueratina AE1/AE3 como marcador de células epiteliais, à semelhança do utilizado em outros estudos em lesões mamárias de canídeos (Gama *et al*., 2003, 2004; Ramalho *et al*., 2006).

Quando se compararam os padrões de expressão do marcador mioepitelial p63 e da caderina P na glândula mamária normal, hiperplásica e nos tumores benignos, verificou-se que exibiram padrões de expressão semelhantes, demonstrando desta forma que o anticorpo anti-caderina P pode identificar células mioepiteliais nestes tecidos de felídeos. Resultados diferentes foram encontrados relativamente aos tumores mamários malignos, em que as células tumorais imunorreactivas para a caderina P observadas nos diferentes tumores não apresentaram positividade à p63. Assim, de forma semelhante ao verificado em canídeos (Gama *et al*., 2004) e em humanos (Gamallo *et al*., 2001; Palacios *et al*., 1995), também em tumores mamários felinos, a expressão da caderina P não pode ser considerada por si só um marcador de células mioepiteliais.

O estudo da imunoexpressão da caderina P nas lesões mamárias de felinos teve também como objectivo determinar a sua importância como marcador de agressividade biológica. Desde o início havia a noção das limitações deste estudo relativamente à determinação da caderina P como factor de prognóstico, devido ao reduzido número de casos e à inexistência de estudos de acompanhamento clínico.

Procedeu-se ao estudo da expressão da caderina P em função de variáveis clínico-patológicas e histopatológicas referidas anteriormente, algumas das quais com significado prognóstico conhecido, nomeadamente a idade (Misdorp *et al*., 1999; Weijer e Hart, 1983), o tamanho (MacEwen *et al*., 1984; Weijer e Hart, 1983), a presença de ulceração (Amorim *et al*., 2006; Weijer e Hart, 1983) e de necrose (Weijer e Hart, 1983).

Verificou-se correlação entre a expressão da caderina P e o uso de anticoncepcionais (p=0,0020), a presença de infiltrado inflamatório (p=0,0226) e de necrose (p<0,0001), bem como com o padrão de crescimento (p<0,0001). Em tumores mamários malignos de canídeos (Gama *et al*., 2008) foi descrita correlação entre a expressão de caderina P e o padrão de crescimento tumoral (infiltrativo) (p=0,04), não tendo no entanto sido encontrada correlação com a ulceração, nem com a necrose. No que diz respeito à associação entre a presença de infiltrado inflamatório e a expressão da caderina P, não foi possível encontrar estudos na literatura que correlacionem estes dois parâmetros.

Um achado intrigante foi a existência de correlação entre o uso de anticoncepcionais e a expressão da caderina P, em que os tumores com maior expressão de caderina P pertenciam a gatas não sujeitas a terapia anticoncepcional. Não se conseguiu uma justificação coerente para este resultado, na medida em que o uso de anticoncepcionais parece estar associado a uma aumento do risco de tumores mamários malignos em felídeos (Lana *et al*., 2007; Misdorp, 2002; Rutteman e Kirpensteigh, 2003). Estes resultados podem dever-se à pequena casuística do estudo.

No presente estudo, foi ainda determinada uma associação entre a expressão aberrante de caderina P e a malignidade histológica (p=0,0001), que corrobora o estudo de Gama *et al*., 2004 em canídeos. Em felídeos, a imunoexpressão da caderina P em células epiteliais tumorais foi exclusivamente observada em tumores mamários malignos.

Relativamente à associação entre o tipo histológico das lesões malignas e a expressão da caderina P, não foi encontrada nenhuma correlação estatisticamente significativa, à semelhança dos resultados descritos por Gama *et al*., 2008 em tumores mamários de canídeos. Contrariamente, em estudos anteriores realizados em canídeos (Gama *et al*., 2004) e em humanos (Palacios *et al*., 1995; Paredes *et al*., 2007a) verificaram associação entre o tipo histológico e a expressão aberrante de caderina P. Os resultados diferentes podem dever-se não só à casuística limitada do presente estudo, como também à existência de apenas três tipos histológicos, sendo que num deles só existia um caso.

À semelhança do observado em canídeos (Gama *et al*., 2004, 2008), no grupo de neoplasias malignas foi observada uma associação entre a expressão aberrante da caderina P e o grau histológico. Todos os carcinomas classificados histologicamente grau 3 tinham imunoexpressão da caderina P em mais de 25% das células tumorais. Estudos em cancro da mama humano demonstraram uma associação significativa entre a expressão da caderina P e grau histológico elevado (Gamallo *et al*., 2001; Kovács *et al*., 2003; Palacios *et al*., 1995; Paredes *et al*., 2002a, 2002b, 2002c, 2005; Peralta Soler, 1999), sendo que num estudo a maioria dos carcinomas com expressão de caderina P eram predominantemente grau 3 (Kovács *et al*., 2003).

Em tumores da mama da mulher, a expressão aberrante da caderina P tem sido associada a um comportamento tumoral agressivo (Paredes *et al*., 2002a, 2002b) e a um pior prognóstico (Han, 2004; Han *et al*., 1999; Knudsen e Wheelock, 2005; Paredes *et al*., 2002a, 2002b, 2005, 2007a; Peralta Soler *et al*., 1999; Wheelock *et al*., 2001). A expressão desta caderina foi sugerida como um melhor indicador

de prognóstico em tumores mamários, relativamente a alterações de outras caderinas ou cateninas, incluindo a diminuição da expressão da caderina E (Peralta Soler *et al*., 1999). No entanto, em canídeos (Gama *et al*., 2008) são sugeridos estudos adicionais e mais alargados para se poder confirmar esta molécula como indicadora de prognóstico independente, de forma semelhante ao proposto por Gamallo *et al*., 2001 em humanos.

No presente estudo a avaliação da expressão da caderina E nos tumores mamários felinos, foi realizada de forma semelhante à da caderina P.

A determinação da imunoexpressão da caderina E pelo método semiquantitativo utilizado (0 - <25%; 1 - 25-50%; 2 - 50-75%; 3 - >75% das células imunorreactivas à caderina E) não revelou diferenças na expressão entre os tecidos mamários estudados. Assim, as glândulas mamárias normais, hiperplásicas e com tumores benignos e malignos foram todas classificadas no grupo 3, ou seja, com mais de 75% das células imunorreactivas à caderina E. Desta forma, optou-se por fazer a sua caracterização em termos de padrão de imunomarcação membranar e/ou citoplasmático da caderina E. Segundo Sarli *et al*., 2004, na caderina E esta classificação poderá ser de maior valor que o seu grau de expressão, quando se comparam tumores benignos e malignos ou tipos histológicos. Tal como verificado por Sarli *et al*., 2004, na glândula mamária normal e em tumores mamários benignos predominou o padrão membranar, enquanto que o padrão citoplasmático e o citoplasmático/membranar foram mais frequentes em tumores malignos, embora no presente estudo não se tenha encontrado uma associação estatisticamente significativa. Quando se observou marcação citoplasmática, esta era do tipo granular, tal como descrito por Harigopal *et al*., 2005. A localização citoplasmática da caderina E pode resultar de um defeito do mecanismo de transporte da proteína para a membrana ou de falha de ancoramento da proteína à membrana (Parker *et al*., 2001).

De forma semelhante ao estudo da expressão da caderina P, procedeu-se à associação estatística com as variáveis clínico-patológicas e histopatológicas, não se tendo encontrado nenhuma associação com o padrão de expressão de caderina E. Também não se verificou associação do padrão de expressão desta molécula com o tipo e grau histológicos.

Para Gamallo *et al*., 1993, a caderina E, em carcinomas da mama da mulher, está predominantemente relacionada com o tipo histológico e com o grau de diferenciação, mais do que com a invasão e potencial metastático. Em vários estudos de canídeos e de humanos foi encontrada uma associação entre a diminuição da expressão da caderina E e o tipo histológico (Gama *et al*., 2008; Gamallo *et al*., 1993; Matos *et al*., 2006; Parker *et al*., 2001; Sarli *et al*., 2004) e o grau histológico (Berx e van Roy, 2001; Gama *et al*., 2008; Madhavan *et al*., 2001; Parker *et al*., 2001). De facto, em carcinomas mamários humanos, a expressão da caderina E tem sido proposta como útil para distinguir lesões tubulares de lesões ductais (Gamallo *et al*., 1993; Goldstein *et al*., 2001; Han, 2004; Harigopal *et al*., 2005; Parker *et al*., 2001). Assim, a expressão da caderina E em carcinomas parece ter valor prognóstico mínimo, mas tem um papel marcador de fenótipo (Parker *et al*., 2001).

Segundo Paredes *et al*., 2008 o grupo de carcinomas mamários humanos com expressão concomitante de caderina E e expressão aberrante de caderina P são os de pior prognóstico. Colocaram a hipótese de que provavelmente a caderina E seria importante para manter a agregação entre as células do cancro durante a invasão e o processo metastático, e que a caderina P seria a força condutora para tornar as células invasivas. Assim, e devido aos achados encontrados no presente estudo, em que os tumores mamários felinos tinham preservação da expressão da caderina E e expressão aberrante de caderina P, colocou-se a hipótese de esta situação poder de alguma forma justificar o mau comportamento biológico dos tumores mamários dos felinos.

Os resultados aqui apresentados parecem relacionar a expressão epitelial aberrante da caderina P, em tumores com preservação da expressão da caderina E, com um fenótipo de carácter maligno e com alguns factores de prognóstico, tal como o grau histológico. No entanto, para a determinação da expressão aberrante da caderina P como um marcador de agressividade biológica e de prognóstico, será necessário uma investigação com maior número de casos e com estudos de acompanhamento clínico.

Da série de tumores que faziam parte do presente trabalho, apenas três revelaram a presença de metástases ganglionares na altura do diagnóstico. Desta forma, não foi possível tirar conclusões quanto ao comportamento das caderina E e P no processo de metastização. Pôde, no entanto, observar-se diferenças no padrão e grau de expressão destas moléculas de adesão celular entre as células do tumor primário e as células metastáticas, sendo que a expressão de ambas as caderinas estavam presentes tanto no tumor primário como nas metástases ganglionares. Assim, para se poder entender o comportamento destas duas moléculas no processo de metastização dos carcinomas mamários felinos, será necessário realizar estudos com um maior número de amostras.

O estudo das moléculas de adesão intercelulares, tais como a caderina P e E, é um tema muito vasto e complexo. Desta forma, estudos futuros nesta área em lesões mamárias felinas deverão incluir um maior número de amostras, com controlo das condições de fixação e processamento do material, bem como, serem complementados com estudos de acompanhamento clínico, de forma a determinar o valor prognóstico da expressão aberrante da caderina P e à obtenção de respostas às questões que ficaram em aberto. Além disso, estudos futuros deverão ser alargados às restantes moléculas envolvidas no complexo caderina-catenina, bem como a estudos de biologia/genética molecular no que respeita aos diferentes mecanismos reguladores da sua expressão no fenótipo maligno.

# CONCLUSÕES

Com o presente trabalho pretendeu-se contribuir para o conhecimento do complexo processo de carcinogénese mamária em felídeos. Com base nos resultados obtidos, foi possível tirar as seguintes conclusões:

- A técnica de imunohistoquímica de processamento automatizado permitiu a utilização de anticorpos anti-caderina P e anti-caderina E humanas, na análise da expressão da caderina E e da caderina P na glândula mamária felina normal, hiperplásica e neoplásica, revelando-se um excelente método na investigação oncológica mamária felina. No entanto, de futuro, dever-se-á tentar padronizar as condições de fixação e processamento do material, na tentativa de minimizar as diferenças de intensidade de marcação;
- O padrão de distribuição de imunorreactividade para a caderina P em tecidos mamários felinos revelou-se semelhante ao descrito em tecidos mamários humanos. Relativamente ao padrão de distribuição da caderina E não foi possível tirar as mesmas conclusões, uma vez que se observaram várias diferenças, quer em termos de percentagem de células marcadas, quer em padrão de imunoexpressão membranar *vs* citoplasmática;
- Na série de lesões mamárias felinas incluídas neste estudo, foi demonstrada a expressão aberrante da caderina P em células de fenótipo epitelial luminal de tumores mamários malignos, podendo dizer-se, desta forma, que esta molécula não constituiu um marcador exclusivo de células mioepiteliais;
- A expressão aberrante da caderina P em células neoplásicas epiteliais luminais encontrou-se significativamente associada à malignidade tumoral, sugerindo esta molécula como um possível marcador de agressividade tumoral;
- Não se encontrou correlação entre a expressão da caderina E e o tipo de lesão mamária, nem com qualquer das variáveis em estudo, provavelmente devido à baixa casuística do presente trabalho;
- Foi ainda colocada a hipótese de a preservação da expressão da caderina E juntamente com a expressão aberrante da caderina P em tumores mamários felinos, constituir um indicador de agressividade biológica;
- Estudos futuros da carcinogénese mamária felina deverão incluir um maior número de casos, de forma a verificar se as observações e associações encontradas neste trabalho se mantêm, bem como serem complementados com estudos de acompanhamento clínico, de modo a confirmar a caderina P como um marcador de agressividade biológica nos tumores da glândula mamária felina.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adriance MC, Inman JL, Petersen OW, Bissel MJ (2005) Myoepithelial cells: good fences make good neighbors. *Breast Cancer Research* 7: 190-197.

Amorim FV (2007) Hiperplasia mamária felina. *Acta Scientiae Veterinariae* 35: 279-280.

Amorim FV, Souza HJM, Ferreira AMR, Fonseca ABM (2006) Clinical, cytological and histopathological evaluation of mammary masses in cats from Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 8: 379-388.

Anderson E (2002) Progesterone receptors – animal models and cell signaling in breast cancer: The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Research* 4: 197-201.

Angst BD, Marcozzi C, Magee AI (2001a) The cadherin superfamily. *Journal of Cell Science* 114: 625-626.

Angst BD, Marcozzi C, Magee AI (2001b) The cadherin superfamily: diversity in form and function. *Journal of Cell Science* 114: 629-641.

Arnes JB, Brunet JS, Stefansson I, Bégin LR, Wong N, Chappuis PO, Akslen LA, Foulkes WD (2005) Placental cadherin and the basal epithelial phenotype of BRCA1-related breast cancer. *Clinical Cancer Research* 11: 4003-4011.

Banks WJ (1993) *Applied Veterinary Histology*, 3rd edition, Mosby-Year Book, St. Louis.

Barone R (2001) *Anatomie Comparée des Mammifères Domestiques,* Tome 4, Troisiéme edition, Editions Vigot, Paris.

Bauer R, Bosserhoff AK (2006) Functional implication of truncated P-cadherin expression in malignant melanoma. *Experimental and Molecular Pathology* 81: 224-230.

Benjamin SA, Lee AC, Saunders WJ (1999) Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in Beagles. *Veterinary Pathology* 36: 423-436.

Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJF, van de Vijver MJ, Cornelisse C, van Roy F (1995) E-cadherin is a tumour/invasion supressor gene mutated in human lobular breast cancers. *The European Molecular Biology Organization Journal* 14: 6107-6115.

Berx G, van Roy F (2001) The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Research* 3: 289-293.

Bevier DE (1993) "Integumentary System", in LC Hudson, WP Hamilton (eds.), *Atlas of Feline Anatomy for Veterinarians*, W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Birchmeier W (2005) Cell adhesion and signal transduction in cancer. *European Molecular Biology Organization reports* 6: 413-417.

Bostock DE (1975) The prognosis following the surgical excision of canine mammary neoplasms. *European Journal of Cancer* 11: 389-396.

Braga VMM (1999) Small GTPases and regulation of cadherin dependent cell-cell adhesion. *Journal of Clinical Pathology incorporating Molecular Pathology* 52: 197-202.

Britt K, Ashworth A, Smalley M (2007) Pregnancy and the risk of breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 14: 907-933.

Brooks-Wilson AR, Kaurah P, Suriano G, Leach S, Senz J, Grehan N, Butterfield YSN, Jeyes J, Schinas J, Bacani J, Kelsey M, Pereira P, MacGilivray B, MacLeod P, Micek M, Ford J, Foulkes W, Australie K, Greenberg C, LaPointe M, Gilpin C, Nikkel S, Gilchrist D, Hughes R, Jackson CE, Monaghan KG, Oliveira MJ, Seruca R, Gallinger S, Caldas C, Huntsman D (2004) Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria. *Journal of Medical Genetics* 41: 508-517.

Brunetti B, Sarli G, Preziosi R, Monari I, Benazzi C (2005) E-cadherin and β-catenin reduction influence invasion but not proliferation and survival in canine malignant mammary tumors. *Veterinary Pathology* 42: 781-787.

Byers SW, Sommers CL, Hoxter B, Mercurio AM, Tozeren A (1995) Role of E-cadherin in the response of tumor cell agregates to lymphatic, venous and arterial flow: measurement of cell-cell adhesion strength. *Journal of Cell Science* 108: 2053-2064.

Cailliez F, Lavery R (2005) Cadherin mechanics and complexation: the importance of calcium binding. *Biophysical Journal* 89: 3895-3903.

Campbell RJ, Pignatelli M (2002) Molecular histology in the study of solid tumours. *Journal of Clinical Pathology incorporating Molecular Pathology* 55: 80-82.

Cardazzo B, Zappulli V, Frassineti F, Patarnello T, Castagnaro M, Bargelloni L (2005) Full-length sequence and expression analysis of estrogen receptor α mRNA in feline mammary tumors. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 96: 109-118.

Cassali GD, Gobbi H, Gärtner F, Schmitt FC (1999) Secretory carcinoma of the canine mammary gland. *Veterinary Pathology* 36: 601-603.

Cassali GD, Silva P, Rêma A, Gärtner F, Gobbi H, Tafuri WL, Schmitt FC (2001) A new methodology for the improvement of diagnostic immnunohistochemistry in canine veterinary pathology: automated system using human monoclonal and polyclonal antibodies. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 53: 326-331.

Castagnaro M, Casalone C, Bozzetta E, De Maria R, Biolatti B, Caramelli M (1998a) Tumour grading and the one-year post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Journal of Comparative Pathology* 119: 263-275.

Castagnaro M, Casalone C, Ru G, Nervi GC, Bozzetta E, Caramelli M (1998b) Argyrophilic nucleolar organiser regions (AgNORs) count as indicator of post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Research in Veterinary Science* 64: 97-100.

Castagnaro M, De Maria R, Bozzetta E, Ru G, Casalone C, Biolatti B, Caramelli M (1998c) Ki-67 index as indicator of the post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Research in Veterinary Science* 65: 223-226.

Christofori, G (2003) Changing neighbours, changing behaviours: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression. *The European Molecular Biology Organization Journal* 22: 2318-2323.

Cianfrocca M, Goldstein LJ (2004) Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *The Oncologist* 9: 606-616.

Cleton-Jansen AM (2002) E-cadherin and loss of heterozygosity at chromosome 16 in breast carcinogenesis: different genetic pathways in ductal and lobular breast cancer?. *Breast Cancer Research* 4: 5-8.

Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A (2002) The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *The Journal of Clinical Investigation* 109: 987-991.

Cotchin E (1975) Spontaneous tumours in young animals. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 68: 653-655.

Cowin P, Rowlands TM, Hatsell SJ (2005) Cadherins and catenins in breast cancer. *Current Opinion in Cell Biology* 17: 499-508.

Daniel CW, Strickland P, Friedmann Y (1995) Expression and functional role of E- and P-cadherins in mouse mammary ductal morphogenesis and growth. *Developmental Biology* 169: 511-519.

De Maria R, Olivero M, Iussich S, Nakaichi M, Murata T, Biolatti B, Di Renzo MF (2005) Spontaneous feline mammary carcinoma is a model of HER2 overexpressing poor prognosis human breast cancer. *Cancer Research* 65: 907-912.

Destexhe E, Lespagnard L, Degeyter M, Heymann R, Coignoul F (1993) Immunohistochemical identification of myoepithelial, epithelial and connective tissue cells in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology* 30: 146-154.

Deugnier MA, Teulière J, Faraldo MM, Thiery JP, Glukhova MA (2002) The importance of being a myoepitelial cell. *Breast Cancer Research* 4: 224-230.

Dias Pereira P, Carvalheira J, Gärtner F (2004) Cell proliferation in feline normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissue – an immunohistochemical study. *The Veterinary Journal* 168: 180-185.

Dias Pereira P, Gärtner F (2003) Expression of E-cadherin in normal, hyperplastic and neoplastic feline mammary tissue. *The Veterinary Record* 153: 297-302.

Dillon DA, D'Aquila T, Reynolds AB, Fearon ER, Rimm DL (1998) The expression of p120ctn protein in breast cancer is independent of α- and β-catenin and E-cadherin. *American Journal of Pathology* 152: 75-82.

Donnay I, Devleeschouwer N, Wouters-Ballman P, Leclercq G, Verstegen J (1996) Relationship between receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary tissues. *Research in Veterinary Science* 60: 251-254.

Donnay I, Rauïs J, Wouters-Ballman P, Devleeschouwer N, Leclercq G, Verstegen JP (1993) Receptors for oestrogen, progesterone and epidermal growth factor in normal and tumorous canine mammary tissues. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement.* 47: 501-512.

Doré M, Lanthier I, Sirois J (2003) Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology* 40: 207-212.

D´souza B, Taylor-Papadimitriou J (1994) Overexpression of ERBB2 in human mammary epithelial cells signals inhibition of transcription of the E-cadherin gene. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 91: 7202-7206.

Dutra AP, Granja NVM, Schmitt FC, Cassali GD (2004) C-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37: 1673-1681.

Elangbam CS, Qualls CW Jr, Dahlgren RR (1997) Cell Adhesion Molecules – Update. *Veterinary Pathology* 34: 61-73.

Elston CW, Ellis IO (1998) "Assessment of histological grade", in CW Elston, IO Ellis (eds.), *Systemic Pathology: The Breast*, Volume 13, 3rd edition, Churchill Livingstone, Edinburgh.

Espinosa de los Monteros A, Millán MY, Ordás J, Carrasco L, Reymundo C, Martín de las Mulas J (2002) Immunolocalization of the smooth muscle-specific protein calponin in complex and mixed tumors of the mammary gland of the dog: assessment of the morphogenetic role of the myoepithelium. *Veterinary Pathology* 39: 247-256.

Espinosa de los Monteros Y Zayas A, Fernández Rodríguez A. Herráez Thomas P, Guisado Rodríguez F (2004) "Piel y anejos cutáneos", in AG Ortiz, AB Rodriguez (eds.), *Tratado de Histologia Veterinária*, Masson, Barcelona.

Faraldo MM, Teulière J, Deugnier MA, Birchmeier W, Huelsken J, Thiery JP, Cano A, Glukhova MA (2007) β-catenin regulates P-cadherin expression in mammary basal epithelial cells. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 581: 831-836.

Fonseca CS, Daleck CR (2000) Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovariohisterectomia como terapia adjuvante. *Ciência Rural* 30: 731-735.

Foschini MP, Eusebi V (1998) Carcinomas of the breast showing myoepithelial cell differentiation. *Virchows Archiv* 432: 303-310.

Foty RA, Steinberg MS (1997) Measurement of tumor cell cohesion and suppression of invasion by E- or P-cadherin. *Cancer Research* 57: 5033-5036.

Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Löchner D, Birchmeier W (1991) E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *The Journal of Cell Biology* 113: 173-185.

Funakoshi Y, Nakayama H, Uetsuka K, Nishimura R, Sasaki N, Doi K (2000) Cellular proliferative and telomerase activity in canine mammary gland tumors. *Veterinary Pathology* 37: 177-183.

Gama A, Alves A, Gärtner F, Schmitt F (2003) p63: a novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues. *Veterinary Pathology* 40: 412-420.

Gama A, Paredes J, Albergaria A, Gärtner F, Schmitt F (2004) P-cadherin expression in canine mammary tissues. *Journal of Comparative Pathology* 130: 13-20.

Gama A, Paredes J, Gärtner F, Alves A, Schmitt F (2008) Expression of E-cadherin, P-cadherin and β-catenin in canine malignant mammary tumours in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. *The Veterinary Journal* 177: 45-53.

Gama A, Paredes J, Milanezi MF, Reis-Filho JS, Gärtner F, Schmitt FC (2002) P-cadherin expression in canine lactating mammary gland. *Journal of Cellular Biochemistry* 86: 420-421.

Gamallo C, Moreno-Bueno G, Sarrió D, Calero F, Hardisson D, Palacios J (2001) The prognostic significance of P-cadherin in infiltrating ductal breast carcinoma. *Modern Pathology* 14: 650-654.

Gamallo C, Palacios J, Suarez A, Pizarro A, Navarro P, Quintanilla M, Cano A (1993) Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological type in breast carcinoma. *American Journal of Pathology* 142: 987-993.

Gayther SA, Gorringe KL, Ramus SJ, Huntsman D, Roviello F, Grehan N, Machado JC, Pinto E, Seruca R, Halling K, MacLeod P, Powell SM, Jackson CE, Ponder BAJ, Caldas C (1998) Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of european origin. *Cancer Research* 58: 4086-4089.

Ginn PE., Mansell JEKL, Rakich PM (2007) "Skin and appendages", in MG Maxie (ed.), *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals,* Volume 1, 5th edition, Saunders Elsevier, Philadelphia.

Glukhova M, Koteliansky V, Sastre X, Thiery JP (1995) Adhesion systems in normal breast and in invasive breast carcinoma. *American Journal of Pathology* 146: 706-716.

Goldstein NS, Bassi D, Watts JC, Layfield LJ, Yaziji H, Gown AM (2001) E-cadherin reactivity of 95 noninvasive ductal and lobular lesions of the breast. *American Journal of Clinical Pathology* 115: 534-542.

Graham JC, Myers RK (1999) The prognostic significance of angiogenesis in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 13: 416-418.

Gumbiner BM (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84: 345-357.

Gumbiner BM (2000) Regulation of cadherin adhesive activity. *The Journal of Cell Biology* 148: 399-403.

Han AC (2004) "Role of Cadherins in Breast Cancer", in MA Hayat (ed.), *Handbook of Immunohistochemistry and in situ Hybridization of Human Carcinomas,* Volume 1, Elsevier Academic Press, Burlington.

Han AC, Peralta Soler AP, Knudsen KA, Salazar H (1999) Distinct cadherin profiles in special variant carcinomas and other tumors of the breast. *Human Pathology* 30: 1035-1039.

Handschuh G, Candidus S, Luber B, Reich U, Schott C, Oswald S, Becke H, Hutzler P, Birchmeier W, Höfler H, Becker KF (1999) Tumor-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. *Oncogene* 18: 4301-4312.

Handschuh G, Luber B, Hutzler P, Höfler H, Becker KF (2001) Single amino acid substitutions in conserved extracellular domains of E-cadherin differ in their functional consequences. *Journal of Molecular Biology* 314: 445-454.

Harigopal M, Shin SJ, Murray MP, Tickoo SK, Brogi E, Rosen PP (2005) Aberrant E-cadherin staining patterns in invasive mammary carcinoma. *World Journal of Surgical Oncology* 3: 73.

Harvey HJ, Gilbertson SR (1977) Canine mammary gland tumors. *Veterinary Clinics of North America* 7: 213-219.

Hatta M, Miyatani S, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Takeichi M (1991) Genomic organization and chromosomal mapping of the mouse P-cadherin gene. *Nuclei Acids Research* 19: 4437-4441.

Heller DA, Clifford CA, Goldschmidt MH, Holt DE, Shofer FS, Smith A, Sorenmo KU (2005) Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. *Veterinary Pathology* 42: 776-780.

Hellmén E, Bergström R, Holmberg L, Spångberg I-B, Hansson K, Lindgren A (1993) Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Veterinary Pathology* 30: 20-27.

Hiraguri S, Godfrey T, Nakamura H, Graff J, Collins C, Shayesteh L, Dogget N, Johnsons K, Wheelock M, Herman J, Baylin S, Pinkel D, Gray J (1998) Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast cancer cell lines. *Cancer Research* 58: 1972-1977.

Hirohashi S (1998) Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *American Journal of Pathology* 153: 333-339.

Huber O, Kemler R, Langosch D (1999) Mutations affecting transmembrane segment interactions impair adhesiveness of E-cadherin. *Journal of Cell Science* 112: 4415-4423.

Huiping C, Kristjansdottir S, Jonasson JG, Magnusson J, Egilsson V, Ingvarsson S (2001) Alterations of E-cadherin and β-catenin in gastric cancer. *BioMed Central Cancer* 1: 16.

Jarrard D, Paul R, van Bokhoven A, Nguyen SH, Bova GS, Wheelock MJ, Johnson KR, Schalken J, Bussemakers M, Isaacs WB (1997) P-cadherin is a basal cell-specific epithelial marker that is not expressed in prostate cancer. *Clinical Cancer Research* 3: 2121-2128.

Jeffrey SS, Pollack JR (2003) The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: Promise of new technologies in understanding pre-invasive breast lesions. *Breast Cancer Research* 5: 320-328.

Jones TC, Hunt RD, King NW (1997) *Veterinary Pathology*, 6th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.

Kamstock DA, Fredrickson R, Ehrhart EJ (2005) Lipid-rich carcinoma of the mammary gland in a cat. *Veterinary Pathology* 42: 360-362.

Kawanishi J, Kato J, Sasaki K, Fujii S, Watanabe N, Niitsu Y (1995) Loss of E-cadherin-dependent cell-cell adhesion due to mutation of the β-catenin gene in human cancer cell line, HSC-39. *Molecular and Cellular Biology* 15: 1175-1181.

Keller G, Vogelsang H, Becker I, Hutter J, Ott K, Candidus S, Grundei T, Becker KF, Mueller J, Siewert JR, Höfler H (1999) Diffuse type gastric and lobular breast carcinoma in a familial gastric cancer patient with an E-cadherin germline mutation. *American Journal of Pathology* 155: 337-342.

Kelsey JL, Moore AS, Glickman LT (1998) Epidemiologic studies of risk factors for cancer in pet dogs. *Epidemiologic Reviews* 20: 204-217.

Knudsen KA, Weelock MJ (2005) Cadherins and the mammary gland. *Journal of Cellular Biochemistry* 95: 488-496.

Kovács A, Dhillon J, Walker RA (2003) Expression of P-cadherin, but not E-cadherin or N-cadherin, relates to pathological and functional differentiation of breast carcinomas. *Journal of Clinical Pathology incorporating Molecular Pathology* 56: 318-322.

Kovács A, Walker RA (2003) P-cadherin as a marker in the differential diagnosis of breast lesions. *Journal of Clinical Pathology* 56: 139-141.

Kowalski PJ, Rubin MA, Kleer CG (2003) E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Research* 5: 217-222.

Kurzman ID, Gilbertson SR (1986) Prognostic factors in canine mammary tumors. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)* 1: 25-32.

Lana SE, Rutteman GR, Withrow SJ (2007) "Tumors of the Mammary Gland", in SJ Withrow, DM Vail (eds.), *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 4th edition, Saunders Elsevier, St. Louis.

Lester SC, Cotran RS (1999) "The Breast", in RS Cotran, V Kumar, T Collins (eds.), *Robbins Pathologic Basis of Disease,* 6th edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Loretti AP, Ilha MRS, Ordás J, Martín de las Mulas J (2005) Clinical, pathological and immunohistochemical study of feline mammary fibroepithelial hyperplasia following a single injection of depot medroxyprogesterone acetate. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 7: 43-52.

MacDougall LD (2003) Mammary fibroadenomatous hyperplasia in a young cat attributed to treatment with megestrol acetate. *The Canadian Veterinary Journal* 44: 227-229.

MacEwen EG, Hayes AA, Harvey HJ, Patnaik AK, Mooney S, Passe S (1984) Prognostic factors for feline mammary tumors. *Journal of American Veterinary Medical Association* 185: 201-204.

Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, Soares P, Berx G, Caldas C, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simões M (2001) E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. *Oncogene* 20: 1525-1528.

Madhavan M, Srinivas P, Abraham E, Ahmed I, Mathew A, Vijayalekshmi NR, Balaram P (2001) Cadherins as predictive markers of nodal metastasis in breast cancer. *Modern Pathology* 14: 423-427.

Mandeville JA, Neto BS, Vanni AJ, Smith GL, Rieger-Christ KM, Zeheb R, Loda M, Libertino JA, Summerhayes IC (2008) P-cadherin as a prognostic indicator and a modulator of migratory behaviour in bladder carcinoma cells. *British Journal of Urology International* 102: 1707-1714.

Martín de las Mulas J, Millán Y, Bautista MJ, Pérez J, Carrasco L (2000b) Oestrogen and progesterone receptors in feline fibroadenomatous change: an immunohistochemical study. *Research in Veterinary Science* 68: 15-21.

Martín de las Mulas J, Millán Y, Dios R (2005) A prospective analysis of immnunohistochemically determined estrogen receptor $\alpha$ and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Veterinary Pathology* 42: 200-212.

Martín de las Mulas J, Ordás J, Millán Y, Fernández-Soria V, Ramón y Cajal S (2003) Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas. *Breast Cancer Research and Treatment* 80: 363-367.

Martín de las Mulas J, van Niel M, Millán Y, Blankenstein MA, van Mil F, Misdorp W (2000a) Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in feline mammary gland benign and malignant lesions: comparision with biochemical assay. *Domestic Animal Endocrinology* 18: 111-125.

Martín de las Mulas J, van Niel M, Millán Y, Ordás J, Blankenstein MA, van Mil F, Misdorp W (2002) Progesterone receptors in normal, dysplastic and tumourous feline mammary glands. Comparison with oestrogen receptors status. *Research in Veterinary Science* 72: 153-161.

Mastracci TL, Tjan S, Bane AL, O'Malley FP, Andrulis IL (2005) E-cadherin alterations in atypical lobular hyperplasia and lobular carcinoma in situ of the breast. *Modern Pathology* 18: 741-751.

Matos AJF, Lopes C, Carvalheira J, Santos M, Rutteman GR, Gärtner F (2006) E-cadherin expression in canine malignant mammary tumors: relationship to other clinico-pathological variables. *Journal of Comparative Pathology* 134: 182-189.

Matos AJF, Lopes C, Faustino AMR, Carvalheira J, Rutteman GR, Gärtner F (2007) E-cadherin, β-catenin, invasion and lymph node metastases in canine malignant mammary tumours. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 115: 327-334.

Matsuyoshi N, Hamaguchi M, Taniguchi S, Nagafuchi A, Tsukita S, Takeichi M (1992) Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts. *The Journal of Cell Biology* 118: 703-714.

McGeady TA, Quinn PJ, FitzPatrick ES, Ryan MT (2006) *Veterinary Embryology*, Blackwell Publishing, Oxford.

Millanta F, Calandrella M, Bari G, Niccolini M, Vannozzi I, Poli A (2005b) Comparision of steroid receptor expression in normal, dysplastic and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Research in Veterinary Science* 79: 225-232.

Millanta F, Calandrella M, Citi S, Della Santa D, Poli A (2005a) Overexpression of HER-2 in feline invasive mammary carcinomas: an immunohistochemical survey and evaluation of its prognostic potential. *Veterinary Pathology* 42: 30-34.

Millanta F, Citi S, Della Santa D, Porciani M, Poli A (2006) COX-2 expression in canine and feline mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Research and Treatment* 98: 115-120.

Millanta F, Lazzeri G, Mazzei M, Vannozzi I, Poli A (2002b) MIB-1 labeling index in feline dysplastic and neoplastic mammary lesions and its relationship with postsurgical prognosis. *Veterinary Pathology* 39: 120-126.

Millanta F, Lazzeri G, Vannozzi I, Viacava P, Poli A (2002a) Correlation of vascular endothelial growth factor expression to overall survival in feline invasive mammary carcinomas. *Veterinary Pathology* 39: 690-696.

Misdorp W (2002) "Tumors of the Mammary Gland", in DJ Meuton (ed.), *Tumors in Domestic Animals*, 4th edition, Blackwell Publishing Company, Iowa.

Misdorp W, Else RW, Hellmén E, Lipscomb TP (1999) *Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat*, Volume VII, 2nd edition, Armed Forces Institute of Pathology in cooperation with the American Registry of Pathology and The World Health Organization Colaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology, Washington.

Misdorp W, Hart AAM (1976) Prognostic factors in canine mammary cancer. *Journal of The National Cancer Institute* 56: 779-786.

Misdorp W, Weijer K (1980) Animal Model of Human Disease. Breast Cancer. *American Journal of Pathology* 98: 573-576.

Mitchell L, de la Iglesia FA, Wenkoff MS, van Dreumel AA, Lumb G (1974) Mammary tumors in dogs: survey of clinical and pathological characteristics. *The Canadian Veterinary Journal* 15: 131-138.

Moinfar F (2007) *Essentials of Diagnostic Breast Pathology. A Pratical Approach*, Springer, Berlin.

Mol JA, van Garderen E, Rutteman GR, Rijnberk A (1996) New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary gland of dogs, cats and humans. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 57: 67-71.

Monteiro-Riviere NA (2006) "Integument", in JA Eurell, BL Frappier (eds.), *Dellmann´s Textbook of Veterinary Histology*, 6th edition, Blackwell Publishing, Ames.

Moore A (2006) Advances in the treatment of mammary neoplasia. *Proceedings of the 31st Annual Congress of the World Small Animal Veterinary Association*, World Small Animal Veterinary Association, Prague, Czech Republic: 562-565.

Moore AS, Ogilvie GK (2001) "Mammary Tumors", in G Ogilvie, A Moore (eds.), *Feline Oncology: a comprehensive guide to compassionate care*, Veterinary Learning Systems, New Jersey.

Morin PJ (1999) β-catenin signaling and cancer. *BioEssays* 21: 1021-1030.

Muleya JS, Nakaichi M, Sugahara J, Taura Y, Murata T, Nakama S (1998) Establishment and caracterization of a new cell line derived from feline mammary tumor. *The Journal of Veterinary Medical Science* 60: 931-935.

Nagafuchi A, Takeichi M (1988) Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *The European Molecular Biology Organization Journal* 7: 3679-3684.

Nelson WJ, Shore EM, Wang AZ, Hammerton RW (1990) Identification of a membrane-cytoskeletal complex containing the cell adhesion molecule uvomorulin (E-cadherin), ankyrin, and fodrin in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *The Journal of Cell Biology* 110: 349-357.

Nieto A, Peña L, Pérez-Alenza MD, Sánchez MA, Flores JM, Castaño M (2000) Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Veterinary Pathology* 37: 239-247.

Nieto A, Pérez-Alenza MD, Del Castillo N, Tabanera E, Castaño M, Peña L (2003) BRCA1 expression in canine mammary dysplasias and tumours: relationship with prognostic variables. *Journal of Comparative Pathology* 128: 260-268.

Nollet F, Berx G, van Roy F (1999) The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. *Molecular Cell Biology Research Comunications* 2: 77-85.

Nollet F, Kools P, van Roy F (2000) Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *Journal of Molecular Biology* 299: 551-572.

Nose A, Nagafuchi A, Takeichi M (1987) Isolation of placental cadherin cDNA: identification of a novel gene family of cell-cell adhesion molecules. *The European Molecular Biology Organization Journal* 6: 3655-3661.

Nose A, Takeichi M (1986) A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. *The Journal of Cell Biology* 103: 2649-2658.

Novosad CA (2003) Principles of treatment for mammary gland tumors. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 18: 107-109.

Oda T, Kanai Y, Oyama T, Yoshiura K, Shimoyama Y, Birchmeier W, Sugimura T, Hirohashi S (1994) E-cadherin gene mutations in human gastric carcinoma cell lines. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 91: 1858-1862.

Ohene-Abuakwa Y, Pignatelli M (2000) Adhesion molecules as diagnostic tools in tumor pathology. *International Journal of Surgical Pathology* 8:191-200.

Oliveira C, Bordin MC, Grehan N, Huntsman D, Suriano G, Machado JC, Kiviluoto T, Aaltonen L, Jackson CE, Seruca R, Caldas C (2002) Screening E-cadherin in gastric cancer families reveals germline mutations only in hereditary difuse gastric cancer kindred. *Human Mutation* 19: 510-517.

Oonuma T, Morimatsu M, Ochiai K, Syuto B (2003) Properties of the tumor supressor gene *Brca2* in the cat. *The Journal of Veterinary Medical Science* 65: 1123-1126.

Ordás J, Millán Y, Dios R, Reymundo C, Martín de las Mulas J (2007) Proto-oncogene HER-2 in normal, dysplastic and tumorous feline mammary glands: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *BioMed Central Cancer* 7: 179.

Ordás J, Millán Y, Espinosa de los Monteros A, Reymundo C, Martín de las Mulas J (2004) Immunohistochemical expression of progesterone receptors, growth hormone and insulin growth factor-I in feline fibroadenomatous change. *Research in Veterinary Science* 76: 227-233.

Overley B, Shofer FS, Goldschmidt MH, Sherer D, Sorenmo KU (2005) Association between ovariohysterectomy and feline mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19: 560-563.

Owen LN (1979) A comparative study of canine and human breast cancer. *Investigative & Cell Pathology* 2: 257-275.

Ozawa M, Baribault H, Kemler R (1989) The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *The European Molecular Biology Organization Journal* 8: 1711-1717.

Ozawa M, Kemler R (1992) Molecular organization of the uvomorulin-catenin complex. *The Journal of Cell Biology* 116: 989-996.

Ozawa M, Kemler R (1998) The membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain prevents dimerization and negatively regulates adhesion activity. *The Journal of Cell Biology* 142: 1605-1613.

Ozawa M, Ringwald M, Kemler R (1990) Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 87: 4246-4250.

Palacios J, Benito N, Pizarro A, Suárez A, Espada J, Cano A, Gamallo C (1995) Anomalous expression of P-cadherin in breast carcinoma: Correlation with E-cadherin expression and pathological features. *American Journal of Pathology* 146: 605-612.

Paredes J, Albergaria A, Oliveira JT, Jerónimo C, Milanezi F, Schmitt FC (2005) P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation. *Clinical Cancer Research* 11: 5869-5877.

Paredes J, Correia AL, Ribeiro AS, Albergaria A, Milanezi F, Schmitt FC (2007a) P-cadherin expression in breast cancer: a review. *Breast Cancer Research* 9: 214.

Paredes J, Correia AL, Ribeiro AS, Milanezi F, Cameselle-Teijeiro J, Schmitt FC (2008) Breast carcinomas that co-express E- and P-cadherin are associated with p120-catenin cytoplasmic localization and poor patient survival. *Journal of Clinical Pathology* 61: 856-862.

Paredes J, Lopes N, Milanezi F, Schmitt FC (2007b) P-cadherin and cytokeratin 5: useful adjunct markers to distiguish basal-like ductal carcinomas in situ. *Virchows Archiv* 450: 73-80.

Paredes J, Milanezi M, Reis-Filho JS, Leitão D, Athanazio D, Schmitt F (2002a) Aberrant P-cadherin expression: is it associated with estrogen-independent growth in breast cancer?. *Pathology Research and Practice* 198: 795-801.

Paredes JCAF, Milanezi MFG, Reis-Filho JS, Leitão DRA, Athanazio DA, Schmitt FCL (2002b) Correlação entre as expressões de P-caderina e de receptores de estrógeno no câncer da mama. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 38: 307-313.

Paredes J, Milanezi F, Viegas L, Amendoeira I, Schmitt F (2002c) P-cadherin expression is associated with high-grade ductal in situ of the breast. *Virchows Archiv* 440: 16-21.

Paredes J, Stove C, Stove V, Milanezi F, van Marck V, Derycke L, Mareel M, Bracke M, Schmitt F (2004) P-cadherin is up-regulated by the antiestrogen ICI 182,780 and promotes invasion of human breast cancer cells. *Cancer Research* 64: 8309-8317.

Parker C, Rampaul RS, Pinder SE, Bell JA, Wencyk, Blamey RW, Nicholson RI, Robertson JFR, Ellis IO (2001) E-cadherin as a prognostic indicator in primary breast cancer. *British Journal of Cancer* 85: 1958-1963.

Pasquali L, Bedeir A, Ringquist S, Styche A, Bhargava R, Trucco G (2007) Quantification of CpG island methylation in progressive breast lesions from normal to invasive carcinoma. *Cancer Letters* 257: 136-144.

Patel SD, Chen PC, Bahna F, Honig B, Shapiro L (2003) Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family. *Current Opinion in Structural Biology* 13: 690-698.

Pećina-Šlaus N (2003) Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell International* 3: 17.

Peña LL, Nieto AI, Pérez-Alenza D, Cuesta P, Castaño M (1998) Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 10: 237-246.

Peralta Soler A, Knudsen KA, Salazar H, Han AC, Keshgegian AA (1999) P-cadherin expression in breast carcinoma indicates poor survival. *Cancer* 86: 1263-1272.

Peralta Soler A, Russo J, Russo IH, Knudsen KA (2002) Soluble fragment of P-cadherin adhesion protein found in human milk. *Journal of Cellular Biochemistry* 85: 180-184.

Pérez-Alenza MD, Jiménez Á, Nieto AI, Peña L (2004) First description of feline inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical characteristics of three cases. *Breast Cancer Research* 6: 300-307.

Pérez-Alenza MD, Peña L, del Castillo N, Nieto AI (2000) Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *Journal of Small Animal Practice* 41: 287-291.

Pérez-Alenza MD, Peña L, Nieto AI, Castaño M (1997) Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumors. *Annali dell' Istituto Superiore di Sanitá* 33: 581-585.

Petterino C, Ratto A, Podestà G, Drigo M, Pellegrino C (2007) Immunohistochemical evaluation of STAT3-p-tyr705 expression in feline mammary gland tumours and correlation with histologic grade. *Research in Veterinary Science* 82: 218-224.

Pinder SE, Ellis IO, Elston CW (1995) Prognostic factors in primary breast carcinoma. *Journal of Clinical Pathology* 48: 981-983.

Pinho SS, Matos AJF, Lopes C, Marcos NT, Carvalheira J, Reis CA, Gärtner F (2007) Sialyl Lewis x expression in canine malignant mammary tumours: correlation with clinicopathological features and E-cadherin expression. *BioMed Central Cancer* 7: 124.

Pires MA, Travassos FS, Gärtner F (2004) *Atlas de Patologia Veterinária. Biopatologia*, Lidel, Lisboa.

Preziosi R, Sarli G, Benazzi C, Mandrioli L, Marcato PS (2002) Multiparametric survival analysis of histological stage and proliferative activity in feline mammary carcinomas. *Research in Veterinary Science* 73: 53-60.

Pyo SW, Hashimoto M, Kim YS, Kim CH, Lee SH, Johnson KR, Wheelock MJ, Park JU (2007) Expression of E-cadherin, P-cadherin and N-cadherin in oral squamous cell carcinoma: Correlation with the clinicopathologic features and patient outcome. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 35: 1-9.

Queiroga F, Lopes C (2002) Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 97: 119-127.

Queiroga FL, Pérez-Alenza MD, Silvan G, Peña L, Lopes C, Illera JC (2005) Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 94: 181-187.

Radice GL, Ferreira-Cornwell MC, Robinson SD, Rayburn H, Chodosh LA, Takeichi M, Hynes RO (1997) Precocious mammary gland development in P-cadherin-deficient mice. *The Journal of Cell Biology* 139: 1025-1032.

Ramalho LNZ, Ribeiro-Silva A, Cassali GD, Zucoloto S (2006) The expression of p63 and cytokeratin 5 in mixed tumors of the canine mammary gland provides new insights into the histogenesis of these neoplasms. *Veterinary Pathology* 43: 424-429.

Reis-Filho JS, Lakhani SR (2003) The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: Genetic alteration in pre-invasive lesions. *Breast Cancer Research* 5: 313-319.

Restucci B, Borzacchiello G, Maiolino P, Martano M, Paciello O, Papparella S (2004) Expression of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1 in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology* 130: 99-104.

Restucci B, De Vico G, Maiolino P (2000) Evaluation of angiogenesis in canine mammary tumors by quantitative platelet endothelial cell adhesion molecule imunohistochemistry. *Veterinary Pathology* 37: 297-301.

Restucci B, Papparella S, De Vico G, Maiolino P (1997) E cadherin expression in normal and neoplastic canine mammary gland. *Journal of Comparative Pathology* 116: 191-202.

Restucci B, Papparella S, Maiolino P, De Vico G (2002) Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology* 39: 488-493.

Reynolds AB, Daniel J, McCrea PD, Wheelock MJ, Wu J, Zhang Z (1994) Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate $p120^{cas}$ associates with E-cadherin complexes. *Molecular and Cellular Biology* 14: 8333-8342.

Rieger-Christ KM, Pezza JA, Dugan JM, Braasch JW, Hughes KS, Summerhayes IC (2001) Disparate E-cadherin mutations in LCIS and associated invasive breast carcinomas. *Journal of Clinical Pathology incorporating Molecular Pathology* 54: 91-97.

Rutteman GR, Kirpensteigh J (2003) "Tumors of the mammary glands", in JM Dobson, BDX Lascelles (eds.), *British Small Animal Veterinary Association Manual of Canine and Feline Oncology,* 2nd edition, British Small Animal Veterinary Association, Gloucester.

Rutteman GR, Misdorp W. (1993) Hormonal background of canine and feline mammary tumours. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* 47: 483-487.

Salahshor S, Haixin L, Huo H, Kristensen VN, Loman N, Sjöberg-Margolin S, Borg Å, Børresen-Dale AL, Vorechovsky I, Lindblom A (2001) Low frequency of E-cadherin alterations in familial breast cancer. *Breast Cancer Research* 3: 199-207.

Sarli G, Preziosi R, Benazzi C, Bazzo R, Mandrioli L, Marcato PS (2003) Rate of apoptosis in feline mammary tumors is not predictive of postsurgical survival. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 15: 115-122.

Sarli G, Preziosi R, Benazzi C, Castellani G, Marcato PS (2002) Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14: 25-34.

Sarli G, Preziosi R, De Tolla L, Brunetti B, Benazzi C (2004) E-cadherin immunoreactivity in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 16: 542-547.

Sarli G, Sassi F, Brunetti B, Rizzo A, Diracca L, Benazzi C (2007) Lymphatic vessels assessment in feline mammary tumours. *BioMed Central Cancer* 7: 7.

Schafer KA, Kelly G, Schrader R, Griffith WC, Muggenburg BA, Tierney LA, Lechner JF, Janovitz EB, Hahn FF (1998) A canine model of familial mammary gland neoplasia. *Veterinary Pathology* 35: 168-177.

Schairer C (2002) Progesterone receptors – animal models and cell signalling in breast cancer: Implications for breast cancer of inclusion of progestins in hormone replacement therapies. *Breast Cancer Research* 4: 244-248.

Schlafer DH, Miller RB (2007) "Female genital system", in MG Maxie (ed.), *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals,* Volume 3, 5th edition, Saunders Elsevier, Philadelphia.

Seixas F, Palmeira C, Pires MA, Lopes C (2008a) Are complex carcinoma of the feline mammary gland and other invasive mammary carcinoma identical tumours? Comparison of clinicopathologic features, DNA ploidy and follow up. *Research in Veterinary Science* 84: 428-433.

Seixas F, Pires MA, Lopes CA (2008b) Complex carcinomas of the mammary gland in cats: Pathological and immunohistochemical features. *The Veterinary Journal* 176: 210-215.

Semb H, Christofori G (1998) The tumor-supressor function of E-cadherin. *American Journal of Human Genetics* 63: 1588-1593.

Shibata T, Kokubu A, Sekine S, Kanai Y, Hirohashi S (2004) Cytoplasmic p120ctn regulates the invasive phenotypes of E-cadherin-deficient breast cancer. *American Journal of Pathology* 164: 2269-2278.

Shimoyama Y, Hirohashi S (1991) Expression of E- and P-cadherin in gastric carcinomas. *Cancer Research* 51: 2185-2192.

Shimoyama Y, Hirohashi S, Hirano S, Noguchi M, Shimosato Y, Takeichi M, Abe O (1989) Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Research* 49: 2128-2133.

Shimoyama Y, Nagafuchi A, Fujita S, Gotoh M, Takeichi M, Tsukita S, Hirohashi S (1992) Cadherin dysfunction in a human cancer cell line: possible involvement of loss of $\alpha$-catenin expression in reduced cell-cell adhesiveness. *Cancer Research* 52: 5770-5774.

Shiozaki H, Tahara H, Oka H, Miyata M, Kobayashi K, Tamura S, Iihara K, Doki Y, Hirano S, Takeichi M, Mori T (1991) Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. *American Journal of Pathology* 139: 17-23.

Shirayoshi Y, Hatta K, Hosoda M, Tsunasawa S, Sakiyama F, Takeichi M (1986) Cadherin cell adhesion molecules with distinct binding specificities share a commom structure. *The European Molecular Biology Organization Journal* 5: 2485-2488.

Silva AE, Serakides R, Cassali GD (2004) Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. *Ciência Rural* 34: 625-633.

Skorupski KA, Overley B, Shofer FS, Goldschmidt MH, Miller CA, Sorenmo KU (2005) Clinical characteristics of mammary carcinoma in male cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19: 52-55.

Sommers CL, Heckford SE, Skerker JM, Worland P, Torri JA, Thompson EW, Byers SW, Gelmann EP (1992) Loss of epithelial markers and acquisition of vimentin expression in adriamycin and vinblastine-resistant human breast cancer cell lines. *Cancer Research* 52: 5190-5197.

Sommers CL, Thompson EW, Torri JA, Kemler R, Gelmann EP, Byers SW (1991) Cell adhesion molecule uvomorulin expression in human breast cancer cell lines: relationship to morphology and invasive capacities. *Cell Growth & Differentiation* 2: 365-372.

Stefansson IM, Salvesen HB, Akslen LA (2004) Prognostic impact of alteratiosn in P-cadherin expression and related cell adhesion markers in endometrial cancer. *Journal of Clinical Oncology* 22: 1242-1252.

Steinberg MS, Takeichi M (1994) Experimental specification of cell sorting, tissue spreading, and specific spatial patterning by quantitative differences in cadherin expression. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 91: 206-209.

Sugiura T, Matsuyama S, Akiyosi H, Takenaka S, Yamate J, Kuwamura M, Aoki M, Shimada T, Ohashi F, Kubo K (2007) Expression patterns of the BRCA1 splicing variants in canine normal tissues and mammary gland tumors. *The Journal of Veterinary Medical Science* 69: 587-592.

Suzuki ST (1996) Protocadherins and diversity of the cadherin superfamily. *Journal of Cell Science* 109: 2609-2611.

Suzuki S, Sano K, Tanihara H (1991) Diversity of the cadherin family: evidence for eight new cadherins in nervous tissue. *Cell Regulation* 2: 261-270.

Takauji S, Watanabe M, Uyama R, Nakagawa T, Miyajima N, Mochizuki M, Nishimura R, Sugano S, Sasaki N (2007) Expression and subcellular localization of E-cadherin, α-catenin, and β-catenin in 8 feline mammary tumor cell lines. *The Journal of Veterinary Medical Science* 69: 831-834.

Takeichi M (1977) Functinal correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *The Journal of Cell Biology* 75: 464-474.

Takeichi M (1990) Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annual Review of Biochemistry* 59: 237-252.

Takeichi M (1991) Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251: 1451-1455.

Takeichi M (1995) Morphogenetic roles of classic cadherins. *Current Opinion in Cell Biology* 7: 619-627.

Takeichi M, Nakagawa S, Aono S, Usui T, Uemura T (2000) Patterning of cell assemblies regulated by adhesion receptors of the cadherin superfamily. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 355: 885-890.

Tamada H, Kawate N, Inaba T, Sawada T (2003) Long-term prevention of estrus in the bitch and queen using chlomadinone acetate. *The Canadian Veterinary Journal* 44: 416-417.

Taniuchi K, Nakagawa H, Hosokawa M, Nakamura T, Eguchi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Katagiri T, Nakamura Y (2005) Overexpression P-cadherin/CDH3 promotes motility of pancreatic cancer cells by interacting with p120ctn and activating Rho-family GTPases. *Cancer Research* 65: 3092-3099.

Todorova I (2006) Prevalence and etiology of the most common malignant tumours in dogs and cats. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 9: 85-98.

Tomlinson MJ, Barteaux L, Ferns LE, Angelopoulos E (1984) Feline mammary carcinoma: a retrospective evaluation of 17 cases. *The Canadian Veterinary Journal* 25: 435-439.

Uyama R, Hong SH, Nakagawa T, Yazawa M, Kadosawa T, Mochizuki M, Tsujimoto H, Nishimura R, Sasaki N (2005) Establishment and caracterization of eight feline mammary adenocarcinoma cell lines. *The Journal of Veterinary Medical Science* 67: 1273-1276.

van Garderen E, de Wit M, Voorhout WF, Rutteman GR, Mol JA, Nederbragt H, Misdorp W (1997) Expression of growth hormone in canine mammary tissue and mammary tumors: Evidence for a potencial autocrine/paracrine stimulatory loop. *American Journal of Pathology* 150: 1037-1047.

Viste JR, Myers SL, Singh B, Simko E (2002) Feline mammary adenocarcinoma: tumor size as a prognostic indicator. *The Canadian Veterinary Journal* 43: 33-37.

Weijer K, Hart AAM (1983) Prognostic factors in feline mammary carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 70: 709-716.

Weijer K, Head KW, Misdorp W, Hampe JF (1972) Feline malignant mammary tumors. I. Morphology and biology: some comparisons with human and canine mammary carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute* 49: 1697-1704.

Welch DR, Steeg PS, Rinker-Schaeffer CW (2000) Molecular biology of breast cancer metastasis: Genetic regulation of human breast carcinoma metastasis. *Breast Cancer Research* 2: 408-416.

Wheelock MJ, Peralta Soler A, Knudsen KA (2001) Cadherin junctions in mammary tumors. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 6: 275-285.

Yagi T, Takeichi M (2000) Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes & Development* 14: 1169-1180.

Yamagami T, Kobayashi T, Takahashi K, Sugiyama M (1996) Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. *The Journal of Veterinary Medical Science* 58: 1079-1083.

Zappulli V, De Zan G, Cardazzo B, Bargelloni L, Castagnaro M (2005) Feline mammary tumours in comparative oncology. *Journal of Dairy Research* 72: 98-106.

Zatloukal J, Lorenzová J, Tichý F, Nečas A, Kecová H, Kohout P (2005) Breed and age as risk factors for canine mammary tumours. *Acta Veterinaria Brunensis* 74: 103-109.

# ANEXOS

# ANEXO I

**Protocolo utilizado na técnica de coloração de PAS**

- Desparafinação e hidratação dos cortes histológicos;
- 5 minutos em ácido periódico a 5%;
- Lavagem em água destilada;
- 15 minutos em reagente de *Schiff;*
- Lavagem em água corrente;
- 3 minutos em hematoxilina;
- Lavagem em água corrente;
- Desidratação, diafanização e montagem com DPX.

**Protocolo utilizado na técnica de coloração de PAS após diastase**

- Desparafinação e hidratação dos cortes histológicos;
- 15 minutos em diastase;
- Lavagem em água corrente;
- 5 minutos em ácido periódico a 5%;
- Lavagem em água destilada;
- 15 minutos em reagente de *Schiff;*
- Lavagem em água corrente;
- 3 minutos em hematoxilina;
- Lavagem em água corrente;
- Desidratação, diafanização e montagem com DPX.

## ANEXO II

### Protocolo utilizado na técnica de imunohistoquímica em aparelho de processamento automatizado

1. *Desparafinação e hidratação dos cortes histológicos.*

2. *Recuperação antigénica.*

Os antigénios foram expostos por aquecimento das lâminas, já com o corte histológico colado, numa solução de tampão de citrato ou ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), em microondas. O protocolo de recuperação antigénica foi aferido para cada anticorpo.

a) pré-aquecimento de 3 minutos no microondas a 900 W;
b) 2 ciclos de 10 minutos no microondas a 900 W:
    i. caderina P: EDTA diluição 10:200 (Zymed Ref. No 00-5500, EDTA solution pH 8, 20x concentrate);
    ii. caderina E: Tris/EDTA diluição 20:200 (Dako Target Retrieval Solution, pH 9, 10x, Ref. S2367);
    iii. citoqueratinas AE1/AE3: citrato diluição 20:200 (Dako Target Retrieval Solution, pH 6, 10x, Ref. S2031);
    iv. p63: citrato diluição 20:200 (Dako Target Retrieval Solution, pH 6, 10x, Ref. S2031).

No caso do anticorpo AE1/AE3, após a recuperação antigénica utilizou-se a digestão enzimática (seguindo o protocolo técnico do respectivo anticorpo).

3. *Arrefecimento à temperatura ambiente durante 20 minutos, mantendo as lâminas submersas no tampão correspondente.*

4. *Aparelho de processamento automatizado DAKO TechMate $^{TM}$ 500 Plus Biotek Solutions.*

a) Lavagem com solução tampão 1 (Dako REAL™ Wash Buffer 1 - BUF1 do Dako REAL™ Buffer Kit Code K5006) durante 40 segundos;
b) Citoqueratina AE1/AE3: proteinase K (1 gota de Dako REAL™ Proteinase K (40x) Code S2019 diluída em 2ml de Dako REAL™ Proteinase K Diluent Ref. S2032);
c) Incubação no anticorpo primário:
    i. caderina P: clone 56, BD Transduction Laboratories, 1 hora, diluição de 1:50 (Zymed Ref. No 00-3218, Antibody Diluent);

ii. caderina E: clone 4A2C7 Zymed Laboratories, 1 hora, diluição 1:100 (Zymed Ref. No 00-3218, Antibody Diluent);
iii. citoqueratinas AE1/AE3: clone AE1/AE3 (6,7), Chemicon International, 1 hora, diluição 1:1500 (Zymed Ref. No 00-3218, Antibody Diluent);
iv. p63: clone 4A4, Lab Vision Corporation-NeoMarkers, 1 hora, diluição 1:150 (Zymed Ref. No 00-3218, Antibody Diluent).

d) Lavagem com solução tampão 1 (Dako REAL™ Wash Buffer 1 - BUF1 do Dako REAL™ Buffer Kit Code K5006) durante 50 segundos;
e) Incubação no anticorpo secundário (Dako REAL™ Detection System Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2) do Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, Code K5001);
f) Lavagem com solução tampão 1 (Dako REAL™ Wash Buffer 1 - BUF1 do Dako REAL™ Buffer Kit Code K5006) durante 10 segundos;
g) Lavagem com solução tampão 2 (Dako REAL™ Wash Buffer 2 - BUF2 do Dako REAL™ Buffer Kit Code K5006) durante 10 segundos;
h) Bloqueio das peroxidases endógenas (Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution, Code S2023, durante 8 minutos);
i) Lavagem com solução tampão 2 (Dako REAL™ Wash Buffer 2 - BUF2 do Dako REAL™ Buffer Kit Code K5006) durante 30 segundos;
j) Incubação no complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (Dako REAL™ Detection System Streptavidin Peroxidase (HRP) Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, Code K5001 durante 25 minutos);
k) Lavagem com solução tampão 2 (Dako REAL™ Wash Buffer 2 - BUF2 do Dako REAL™ Buffer Kit Code K5006) durante 20 segundos;
l) Lavagem com solução tampão 3 (Dako REAL™ Wash Buffer 3 - BUF3 do Dako REAL™ Buffer Kit Code K5006) durante 20 segundos;
m) Incubação no cromogénio - tetrahidrocloreto de 3,3' diaminobenzidina - (Dako REAL™ DAB + Chromogen + Dako REAL™ HRP Substrate Buffer - Dako REAL™ Detection System (DAB+) do Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, Code. K5001) durante 15 minutos, para visualização de reacção de peroxidase;
n) Lavagem com solução tampão 3 (Dako REAL™ Wash Buffer 3 - BUF3 do Dako REAL™ Buffer Kit Code K5006) durante 30 segundos;
o) Contraste nuclear por coloração com hematoxilina de Mayer diluída a 25% (Merck™ Ref. 1.09249.2500) durante 1 a 2 minutos;
p) Lavagem com solução tampão 2 durante 40 segundos;
q) Lavagem em água Dako REAL™ Water Wash - $H_2O_2$ do Dako REAL™ Buffer Kit Code K5006.

5. *Desidratação, diafanização e montagem com DPX*.