

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**IMUNOEXPRESSÃO DAS CLAUDINAS-1,-2 E -7 EM CARCINOMAS
MAMÁRIOS FELINOS**

Ana Rute Ribeiro Teixeira Flores

Orientador(es)

Prof. Doutora Patrícia Carla Araújo de Faria Dias Pereira

Co-Orientador(es)

Prof. Doutor Augusto Manuel Rodrigues Faustino

Porto 2012

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**IMUNOEXPRESSÃO DAS CLAUDINAS-1,-2 E -7 EM CARCINOMAS
MAMÁRIOS FELINOS**

Ana Rute Ribeiro Teixeira Flores

Orientador(es)

Prof. Doutora Patrícia Carla Araújo de Faria Dias Pereira

Co-Orientador(es)

Prof. Doutor Augusto Manuel Rodrigues Faustino

Porto 2012

Agradecimentos

As minhas primeiras palavras vão para a minha mãe, que fez o favor a ela, a mim e todos que a amam de estar aqui hoje para me ver terminar esta etapa da minha vida. Mãe, obrigada por teres apoiado todas as minhas decisões, por teres acreditado no meu sonho, mesmo não se tendo concretizado. Obrigada por achares que eu sou a melhor filha do mundo, a melhor aluna do mundo, por seres a minha maior fã. É por ti, pelo exemplo de força que me deste que e em breve termino esta etapa.

O meu muito obrigado:

Ao meu pai, que mesmo longe me acompanhou nesta caminhada, comemorando as minhas conquistas e desvalorizando os meus fracassos.

Ao Sr. Padre Clemente, Diretor do Colégio e São Gonçalo em Amarante, a quem devo a minha formação enquanto pessoa e estudante. Obrigada por toda a ajuda que deu e continuar a dar a mim e aos meus pais.

À Prof. Doutora Patrícia Dias Pereira, orientadora deste trabalho, que mesmo longe esteve sempre disponível para responder a todas as minhas dúvidas. Agradeço a orientação paciente, a avaliação crítica dos resultados e todos os comentários pertinentes que apoiaram à concretização deste trabalho. Finalmente, não posso deixar de agradecer a forma atenciosa com que sempre tratou a minha vida familiar.

Ao Prof. Doutor Augusto Faustino, co-orientador deste projeto e o grande “responsável” pela escolha da área da Patológica Veterinária em detrimento de outras também aliciantes. Obrigada por me ter ensinado um bocadinho mais da disciplina tão vasta que é a Patologia Veterinária. É sempre um prazer aprender consigo!

À Prof Doutora Fátima Gärtner, Diretora do Departamento de Patologia e Imunologia Molecular, que autorizou a minha livre circulação pelo Laboratório de Patologia Veterinária permitindo-me assim acompanhar toda a rotina do diagnóstico histopatológico. Apesar de sempre muito ocupada, esteve sempre atenta, respondendo prontamente a todas as minhas dúvidas e necessidades dentro do laboratório. Muito obrigada professora por me ter dado a oportunidade de aprender consigo e com todos aqueles que consigo colaboram.

Á Dra. Irina Amorim, pela permanente disponibilidade para responder a todas as minhas questões, paciência, dedicação e amizade demonstradas mas sobretudo por ter acreditado em mim. Obrigada Irina, és um exemplo como pessoa e profissional!

Ás minhas amigas, Dra. Alexandra Rêma e Dra. Fátima Carvalho. Precisei de um tempinho para as conquistar e ganhar a sua confiança, mas hoje sei que poderei contar com elas. Agradeço a forma paciente e cuidada com me ensinaram e auxiliaram a técnica imunohistoquímica garantindo assim, a obtenção de bons resultados. Obrigada por ouvirem pacientemente os meus desabafos, pelos conselhos e pela amizade.

Á D. Luísa Mariano, que todos os dias pela manhã me brindava com um sorriso de bom dia.

A todas as estagiárias do laboratório, sempre prontas a atender a todos os meus pedidos.

A todos os professores, não só aqueles que me acompanharam durante estes seis anos, mas também aqueles me forneceram a base para poder chegar até aqui.

Um agradecimento especial ao professor Mário Coutinho, que acompanhou todo meu percurso escolar, acreditou no meu sonho e não desistiu de mim, mesmo quando tudo parecia correr mal.

Muito obrigada professor!

Ás minhas grandes amigas, Ana Sofia, Joana Guimarães e Ivone Silva que me deram a mão nos piores dias da minha tão curta vida e não me deixaram cair. É em muito graças a vocês que consegui terminar o 5º e poder estar, hoje, a escassos dias de terminar o curso, a escrever estas palavras. Muito obrigada!

Ao meu irmão, que sempre teve muito orgulho em mim e acha que sou a pessoa mais incrível do mundo.

Ao Diogo, que acompanhou o meu percurso, ouviu atentamente todos os meus desabafos, acalmou-me nos dias mais tensos e celebrou comigo as minhas pequenas vitórias. Obrigada por teres feito comigo este caminho!

Um agradecimento especial ao Mr. Alan Fanning e Mr. Atif Ahmed pelos artigos cedidos.

Lista de Abreviaturas

APES-3-aminopropyltriethoxysilane em acetona

CA- Carcinoma anaplásico

CAI- Complexo de adesão intercelular

CC- Carcinoma complexo

CCE- Carcinoma de células escamosas

CL- Carcinoma rico em lípidos

CLDN-Claudina

CPE- Enterotoxina *Clostridium perfringens*

CS- Carcinoma sólido

CTP- Carcinoma tubulopapilar

DAB-Chromogen- cromogéneo 3,3-diaminobenzidina

HE- Hematoxilina-eosina

ICBAS- Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

IHQ- estudo/análise imunohistoquímico/a

JA- Junções aderentes

JAM- Moléculas de adesão juncional

LPV- Laboratório de Patologia Veterinária

OCDN- Ocludina

OMS- Organização Mundial de Saúde

UIC- Uniões intercelulares

ZO- Zonula ocludens

Resumo

As Claudinas (CLDN), constituintes principais das uniões intercelulares (UICs), são responsáveis pela adesão, polaridade e permeabilidade celular (Jakab *et al* 2008a). Enquanto moléculas de adesão, uma alteração na sua expressão pode conduzir à perda de coesão celular, favorecendo a invasividade e metastização (Ouban & Ahmed 2010). A expressão alterada das CLDNs tem sido observada no cancro, apoiando a hipótese destas moléculas estarem associadas à progressão tumoral (Tokés *et al* 2005b).

O objetivo deste projeto consistiu na ampliação do conhecimento relativo à carcinogénese mamária das gatas, tendo sido investigada a expressão das CLDNs-1, -2 e -7 em carcinomas mamários felinos, de forma a esclarecer qual a importância destes isotipos no desenvolvimento e progressão dos tumores mamários das gatas. A expressão das CLDNs foi avaliada segundo a técnica de imunohistoquímica (IHQ) e os níveis de expressão relacionados com o tipo e grau histológico das lesões.

Observou-se imunoexpressão das CLDN-1, -2 e -7 no epitélio luminal da glândula mamária normal da gata. Nos carcinomas mamários felinos a expressão das CLDN-1, -2 e -7 foi reduzida e parece estar inversamente relacionada com o grau histológico. A localização da marcação das CLDN-1 e -7 foi membranas lateral e da CLDN-2 citoplasmática. As CLDN-1 e -2 registaram ainda marcação citoplasmática densa e/ou membranas difusa nas áreas com diferenciação escamosa, produção de mucina ou fenótipo anaplásico. Estes resultados sugerem que a perda de expressão das CLDN-1, -2 e -7 bem como, as anomalias no padrão de localização das CLDNs-1 e -2 poderão estar relacionadas com o desenvolvimento e progressão do cancro da mama nas gatas, desempenhando um importante no comportamento biológico das lesões.

Outro dos objetivos propostos para este período de estágio consistiu na aquisição de competências práticas na realização do diagnóstico histopatológico, mediante o acompanhamento da rotina do Laboratório de Patologia Veterinária do ICBAS.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Lista de Abreviaturas.....	v
Resumo.....	vi
Introdução/Revisão bibliográfica.....	1
Neoplasias mamárias das gatas.....	1
As Uniões intercelulares.....	2
Claudinas: Estrutura molecular, função e regulação.....	3
Claudinas e o cancro de mama.....	5
Material e métodos.....	7
Resultados.....	9
Classificação histopatológica.....	9
Grau histológico.....	10
Imunoexpressão das Claudinas nas amostras de tecido mamário felino.....	11
Imunoexpressão da CLDN-1.....	11
Imunoexpressão da CLDN-2.....	13
Imunoexpressão da CLDN-3.....	16
Discussão.....	17
Limitações do estudo imunohistoquímico/Perspectivas Futuras.....	23
Atividades desenvolvidas no Laboratório de Patologia Veterinária do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar.....	24
Bibliografia.....	27

Introdução/Revisão bibliográfica

Neoplasias mamárias nas gatas

Os tumores mamários assumem-se, nas gatas, como a terceira neoplasia mais frequente, depois dos tumores de pele e linfoma (Misdorp 2002, Munson & Moresco 2007, Lana *et al* 2007) e apresentam características histológicas e biopatológicas semelhantes ao cancro de mama na mulher, sendo frequentemente apontados como um modelo animal para o estudo do cancro de mama humano (Munson & Moresco 2007, Matos *et al* 2012). Cerca de 80-96% dos tumores mamários felinos apresentam comportamento biológico agressivo e destes o carcinoma é o tipo maligno mais comum (Lana *et al* 2007, Seixas *et al* 2011). Nos felídeos, os tumores ocorrem sobretudo em animais velhos (rondando os 10-12 anos de idade) e inteiros, são geralmente nodulares e firmes, afetando qualquer uma das glândulas mamárias ou eventualmente todas, sem predileção pelo lado esquerdo ou direito, cranial ou caudal (Lana *et al* 2007).

Os carcinomas mamários felinos estão associados a um comportamento altamente invasivo, com infiltração dos tecidos moles, ultrapassando o endotélio vascular e linfático e dando origem a metástases nos gânglios linfáticos regionais (Misdorp 2002), pulmão, pleura (Munson & Moresco 2007), fígado (Borrego *et al* 2009) e osso (Morris & Dobson 2001). A classificação morfológica atual das neoplasias mamárias malignas dos animais domésticos, proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS), divide os carcinomas mamários em três grupos: carcinomas *in situ* (não infiltrativos), carcinomas simples e carcinomas complexos (Misdorp *et al* 1999, Misdorp 2002). Nos carcinomas *in situ* as células neoplásicas não ultrapassam a membrana basal, os carcinomas simples são compostos por uma única população epitelial neoplásica que, de acordo com o padrão adotado pelas células podem ser classificados em tubulopapilares, sólidos, cribiformes e anaplásicos (Misdorp *et al* 1999, Misdorp 2002). Por fim, os carcinomas complexos são constituídos por uma componente epitelial luminal e mioepitelial neoplásicas.

Nos tipos especiais de carcinomas, as células neoplásicas adotam uma morfologia peculiar, como acontece no carcinoma de células fusiformes ou apresentam aspetos de diferenciação específica com produção abundante de material escamoso, mucinoso e rico em lípidos (Misdorp *et al* 1999, Misdorp 2002).

As Uniões Intercelulares

As Uniões intercelulares (UICs), junções aderentes (JA) e desmossomas formam o complexo de adesão intercelular (CAI) que permite a formação de arranjos celulares bem diferenciados (figura 1) (Morin 2005, Ichikawa-Tomikawa *et al* 2011), sendo responsáveis pela dos compartimentos biológicos, garantindo o estabelecimento e manutenção do equilíbrio interno dos organismos (Lal-Nag & Morin 2009).

As UICs são as junções mais apicais onde as membranas plasmáticas de duas células epiteliais ou endoteliais contíguas estabelecem contactos entre si, formando arranjos celulares que separaram o meio intracelular do meio extracelular e garantem a difusão intramembranar de solutos, entre os domínios membranares apical e basolateral (Furuse *et al* 1999, Martin & Jiang 2009). As UICs formam ainda uma espécie de selo no espaço intercelular, garantindo a difusão paracelular de moléculas (Furuse *et al* 1999, Turksen & Troy 2011) (figura 1).

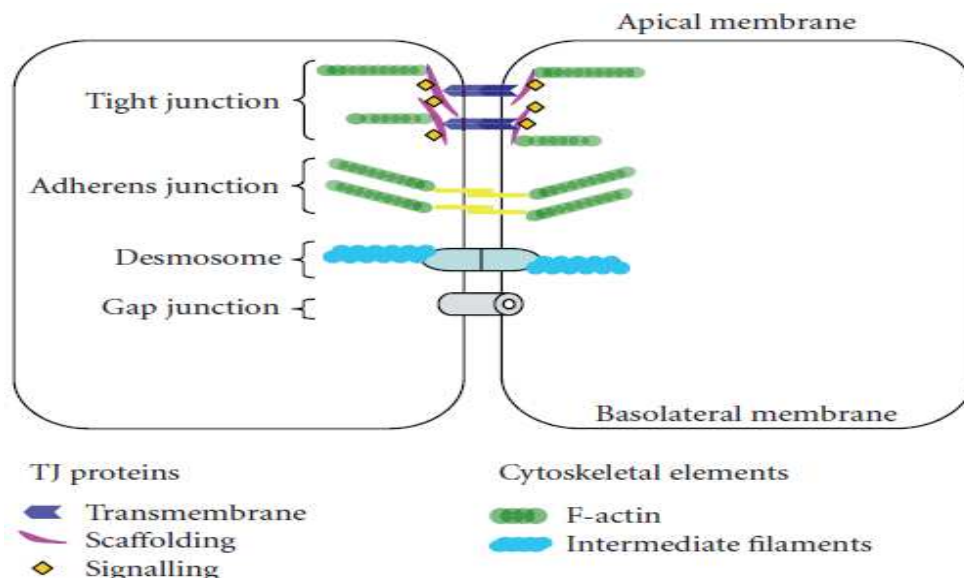


Figura 1: Uniões intercelulares: junções intercelulares mais apicais, nas células epiteliais. As UICs em conjunto com as moléculas de junção aderentes (caderinas e cateninas) e desmossomas foram o complexo de adesão intercelular. As Junções Gap estão localizadas basalmente às junções aderentes (Brennan *et al* 2009).

As UICs são constituídas por cerca de 40 proteínas diferentes (Van Itallie & Anderson 2006) agrupadas em três conjuntos de proteínas distintas: as proteínas transmembranares, que inclui ocludinas (OCDN), claudinas (CLDN) e as moléculas de adesão juncional (JAM); as proteínas periféricas, que abrange os membros da Zonula ocludens (ZOs) entre outros; e as proteínas reguladoras, associadas às UICs (Martin & Jiang 2009).

Enquanto barreira na difusão de partículas, as UICs limitam as trocas de nutrientes, regulam o transporte paracelular e ajudam a definir os domínios membranares apical e

basolateral das células epiteliais e endoteliais polarizadas (Martin & Jiang 2009); são essenciais na transdução de sinal (Heiskala *et al* 2001, Martin & Jiang 2009), desempenhando uma importância fundamental na polaridade, diferenciação, crescimento e proliferação celular (Martin & Jiang 2009); também atuam como uma barreira à migração celular ou seja, as UICs impedem a metastização celular pois para que as células neoplásicas consigam ultrapassar eficazmente a membrana basal e o endotélio vascular, a estrutura das UICs das células neoplásicas, do estroma e do endotélio vascular terão de sofrer modificações ou ser mesmo destruídas (Martin & Jiang 2009).

Claudinas: Estrutura molecular, função e regulação

As CLDNs foram descritas pela primeira vez em 1998 pelos investigadores japoneses Mikio Furuse e Shoichiro Tsukita, na universidade de Kyoto (Furuse *et al* 1998, Morohashi *et al* 2007, Jakab *et al* 2008a). O seu nome, claudina, tem origem no latim *claudere* (“para fechar”), sugerindo o papel de barreira destas proteínas (Jakab *et al* 2008a). As CLDNs pertencem à superfamília de proteínas de membrana integral (Lal-Nag & Morin 2009), que compreende 27 membros (Turksen & Troy 2011, Gerhard *et al* 2012), de dimensões que variam entre 17-27 kDa (Furuse *et al* 1998, Van Itallie & Anderson 2006, Jakab *et al* 2008b) e que na sua estrutura molecular contêm quatro hélices transmembranares, uma sequência NH₂-terminal citoplasmática, duas alças extracelulares e uma sequência COOH-terminal citoplasmática (figura 2) (Van Itallie & Anderson 2006, Oliveira & Morgado-Díaz 2007, Lal-Nag & Morin 2009).

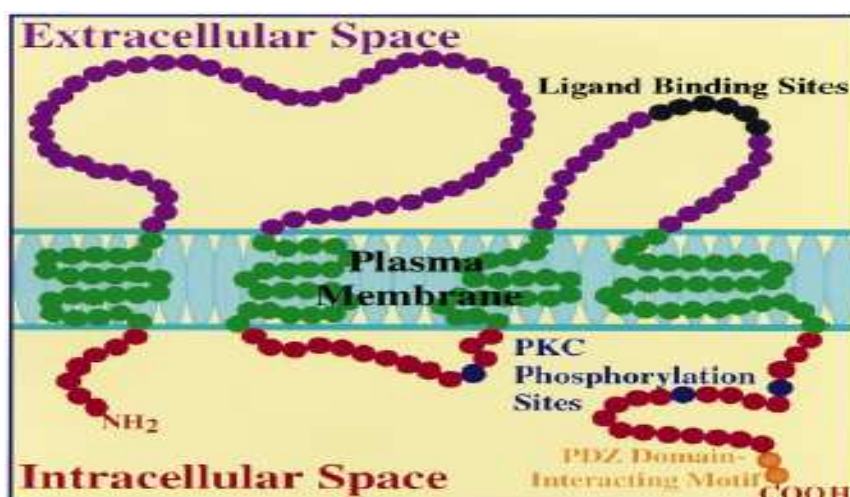


Figura 2: Representação esquemática da estrutura molecular de uma CLDN típica, que contém 4 hélices transmembranares (verde), uma sequência -NH₂ e -COOH terminal (vermelho) e duas alças extracelulares (roxo). Três locais de fosforilação (azul) e um ligando PDZ (laranja) no espaço intracelular e um recetor para a enterotoxina *Clostridium perfringens* (CPE) (preto) no espaço extracelular, caso se trate de CLDN-3 ou -4 (Lal-Nag & Morin 2009).

A principal propriedade das CLDNs nas UICs é a função de barreira semi-permeável ao transporte paracelular, sendo tecido, tamanho e carga seletiva (Krause *et al* 2008). A função de barreira varia entre os diversos tecidos, entre as proteínas CLDNs e parece ser dependente da expressão e polimerização destas nas UICs (Krause *et al* 2008). A maioria dos tecidos expressa múltiplas CLDNs que podem interagir com outras, na mesma célula ou em células adjacentes, de uma forma homotípica ou heterotípica, formando UICs bem desenvolvidas (Furuse *et al* 1999, Oliveira & Morgado-Díaz 2007, Gerhard *et al* 2012). Algumas CLDNs são importantes na criação e manutenção de uma barreira epidérmica (Oliveira & Morgado-Díaz 2007, Markov *et al* 2012); outras criam um selo na via paracelular impedindo a passagem de iões e macromoléculas (Markov *et al* 2012); podem desempenhar um papel direto, atuando como poros (Oliveira & Morgado-Díaz 2007) ou canais paracelulares (Markov *et al* 2012), ou um papel indireto (Markov *et al* 2012) no transporte de moléculas e iões; podem, possivelmente, funcionar como marcadores de diferenciação epitelial e como indicadores de prognóstico (Soini 2005).

Os mecanismos que regulam a forma como as CLDNs se organizam nas UICs e a sua função é um domínio complexo que ainda hoje continua a ser investigado. Estudos propõem que a organização e a função das CLDNs possa ser afetada:

(1) Antes da síntese destas proteínas, mediante mutações no mRNA (Oliveira & Morgado-Díaz 2007, Ichikawa-Tomikawa *et al* 2011);

(2) Durante ou após a transcrição proteica (Oliveira & Morgado-Díaz 2007, Findley & Koval 2009), através de repressores transicionais que diminuem a expressão da gene epitelial e, conseqüentemente a expressão e regulação das CLDNs (Oliveira & Morgado-Díaz 2007, Findley & Koval 2009, Martin & Jiang 2009);

(3) Por intermédio de modificações pós-tradução, como a fosforilação (Oliveira & Morgado-Díaz 2007, Lal-Nag & Morin 2009), palmitoilação (Van Itallie *et al* 2005), nitrosilação, glicosilação (Ichikawa-Tomikawa *et al* 2011) entre outras, que influenciam a atividade, localização, turnover e interação das CLDNs com outras proteínas (Oliveira & Morgado-Díaz 2007);

(4) Mediante mecanismos especiais de endocitose, que permitem a sua internalização numa mesma célula adjacente (Matsuda *et al* 2003, Oliveira & Morgado-Díaz 2007, Findley & Koval 2009);

(5) Possivelmente, por alterações na interação com as ZOs (Fanning *et al* 2012);

(6) Por intermédio de mensageiros clássicos (cálcio, calmodulina, cAMP, fosfolipase C, quinases, óxido nítrico e proteína-G) (Heiskala *et al* 2001);

(7) Mediante fatores de crescimento do hospedeiro (Findley & Koval 2009) e citoquinas inflamatórias (Oliveira & Morgado-Díaz 2007, Findley & Koval 2009);

(8) Por agentes patogénicos (Findley & Koval 2009).

Claudinas e o cancro de mama

Desde 1998, aquando a primeira caracterização das CLDNs que, dia após dia surgem novos dados relativos à sua importância no desenvolvimento e progressão do cancro. As CLDNs, sendo os constituintes fundamentais das UICs, são essenciais na sua estrutura e função (Lal-Nag & Morin 2009). A perda de integridade das UICs parece ser um pré-requisito para a desregulação da função de barreira das células neoplásicas (Turksen & Troy 2011) visto que, conduz à perda de polaridade celular levando influxo anormal de fatores de crescimento (Singh *et al* 2010) que originam uma estimulação autócrina, parácrina ou endócrina das células neoplásicas, resultando na estimulação contínua da divisão celular (Jakab *et al* 2008a).

A associação entre a desregulação da expressão das CLDNs e o desenvolvimento de neoplasia tem sido sugerido por estudos anteriores que mostram alterações no padrão de expressão das CLDNs no cancro de mama. A expressão da CLDN-1 tem-se mostrado francamente diminuída em neoplasias mamárias da mulher (Tokés *et al* 2005a, Morohashi *et al* 2007, Martin & Jiang 2009) e da cadela (Jakab *et al* 2008b), comparativamente à sua expressão no epitélio glandular mamário normal. Na mulher, assim como na cadela, a marcação foi do tipo membranar nas lesões neoplásicas (Tokés *et al* 2005a, Morohashi *et al* 2007), embora em alguns carcinomas ductais *in situ* da mulher esteja documentada uma localização citoplasmática (Tokés *et al* 2005a, Morohashi *et al* 2007). O cDNA desta molécula foi isolado a partir de células epiteliais mamárias humanas normais e expressou níveis elevados de CLDN-1, em contrapartida nos tumores de mama os níveis de expressão foram reduzidos ou mesmo indetectáveis. Esta evidência sugeriu um possível efeito supressor tumoral da CLDN-1 em neoplasias mamárias humanas (Martin & Jiang 2009).

A CLDN-2 evidenciou expressão fraca a ausente nos tumores mamários da mulher (Kim *et al* 2008) e da cadela (Jakab *et al* 2008b). Porém, outros estudos em neoplasias mamárias humanas apontam para uma expressão da CLDN-2 semelhante à observada no epitélio luminal normal (Tokés *et al* 2005a).

A expressão da CLDN-4 mostrou-se diminuída a ausente na maioria dos carcinomas ductais de grau I, nos tipos especiais de carcinoma e em áreas de metaplasia apócrina da mulher, sugerindo um papel particular desta proteína na diferenciação glandular mamária e na carcinogénese (Martin & Jiang 2009).

A expressão das CLDNs-1, -3 e -4 foi diferente consoante o estado de desenvolvimento da glândula mamária (lactação, gravidez ou involução), apontando diferentes funções para cada uma das CLDNs nas diferentes fases do desenvolvimento da glândula mamária (Martin & Jiang 2009). Os contactos célula a célula, dos quais fazem parte as CLDNs estão longe de serem estruturas estáticas, que mantêm a barreira epitelial simplesmente por manterem as células unidas. Assim, estes contactos devem ser remodelados conforme a fase de desenvolvimento em que se encontra a glândula mamária (Brennan *et al* 2009). Além disso, as CLDNs-1 e -3 foram detetadas em tumores mamários humanos, que exibiram uma marcação difusa de CLDN-3, sugerindo uma possível intervenção desta proteína na tumorigénese (Martin & Jiang 2009).

A CLDN-7 registou uma expressão diminuída na maioria dos carcinomas mamários na mulher (Kominsky *et al* 2003, Sauer *et al* 2005, Tokés *et al* 2005a) e da cadela (Jakab *et al* 2008b). A perda de expressão de CLDN-7 no cancro de mama da mulher parece estar relacionada com o grau histológico, (Kominsky *et al* 2003, Sauer *et al* 2005, Tokés *et al* 2005a, Bernardi *et al* 2012), ocorrendo mais frequentemente nos de maior grau, e com presença de metastização ganglionar (Kominsky *et al* 2003, Sauer *et al* 2005). Estes achados sugerem que CLDN-7 poderia auxiliar na disseminação de células neoplásicas e aumentar o seu potencial metastático (Martin & Jiang 2009).

A CLDN-16 foi detetada com níveis significativamente mais baixos nos pacientes com cancro de mama que manifestavam pior prognóstico (recorrência, metástases). Nos tecidos normais a marcação estava confinada às UICs, nos tecidos tumorais a marcação foi difusa e citoplasmática (Martin & Jiang 2009). A conclusão destes achados foi que os baixos níveis de CLDN-16 nas neoplasias mamárias estavam associados a um mau prognóstico, ressaltando a ideia de que a regulação das UICs poderia ser fundamental no controlo da metastização do cancro de mama (Martin & Jiang 2009).

A expressão de diversos tipos de CLDNs em neoplasias mamárias já foi, portanto, investigada em estudos precedentes para a espécie humana (Kominsky *et al* 2003, Sauer *et al* 2005, Tokés *et al* 2005a, Tokés *et al* 2005b, Morohashi *et al* 2007, Kim *et al* 2008, Bernardi *et al* 2012, Gerhard *et al* 2012, Ouban *et al* 2012), canina (Jakab *et al* 2008b) e em ratinhos

(Blackman *et al* 2005), porém está por estabelecer qual a expressão das CLDNs nos tumores mamários da gata e qual o seu papel na gênese e progressão do cancro de mama nesta espécie.

O objetivo do presente estudo consistiu na ampliação do conhecimento existente relativamente à carcinogénese mamária felina, pelo que foi investigada a expressão das CLDNs-1, -2 e -7 em carcinomas mamários da gata, de forma a esclarecer qual a importância destas moléculas no desenvolvimento e progressão do cancro da mama das gatas. A expressão das CLDNs foi avaliada segundo a técnica de imunohistoquímica (IHQ) e os níveis de expressão relacionados com o tipo e grau histológico das lesões observadas.

Material e métodos

Para a realização deste estudo foram selecionadas 42 amostras de tecido mamário de gata, recolhidas no período compreendido entre Janeiro de 2008 e Dezembro de 2011, no âmbito dos serviços de histopatologia prestados, pelo Laboratório de Patologia Veterinária do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (LPV-ICBAS).

O material incluía 5 amostras de tecido mamário normal e 37 amostras de neoplasias malignas da glândula mamária, provenientes de excisões cirúrgicas (n=34) ou de necrópsias (n=3) realizadas nas aulas práticas de Anatomia Patológica I e II, do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária do ICBAS.

Os tecidos foram fixados em formol tamponado a 10% e incluídos em parafina. Foram efetuados cortes histológicos seriados, com uma espessura de 2µm destinados a coloração de Hematoxilina-eosina (HE) e ao estudo imunohistoquímico. O diagnóstico histopatológico foi realizado por dois patologistas, baseados na mais recente classificação, proposta pela OMS, dos tumores mamários de canídeos e felídeos (Misdorp *et al* 1999). Quando na mesma lesão se observou mais do que um padrão histológico, a classificação foi feita com base no arranjo arquitetural predominante. Os carcinomas foram ainda avaliados quanto ao grau histológico segundo o método de Nottingham, proposto por Elston & Ellis (1996) que se baseia na avaliação de 3 características morfológicas: (1) formação de túbulos; (2) pleomorfismo nuclear; e (3) atividade mitótica, avaliada em 10 campos de grande ampliação. A cada parâmetro foi atribuída uma pontuação de 1 a 3: (1) formação de túbulos (1= em mais de 75% da área do tumor; 2= em 10-75% da área do tumor; 3= em menos de 10% da área do tumor); (2) pleomorfismo nuclear (1= núcleos pequenos, regulares e uniformes; 2= núcleos aumentados de tamanho, com variação na forma; 3= grande variabilidade na dimensão e forma dos núcleos); (3) atividade mitótica (1=

0-8 mitoses; 2= 9-17 mitoses; 3= mais de 18 mitoses). O somatório das pontuações dos 3 parâmetros permitiu estimar o grau de malignidade do tumor:

3-5 pontos → Grau I (tumor bem diferenciado)

6-7 pontos → Grau II (tumor moderadamente diferenciado)

8-9 pontos → Grau III (tumor pouco diferenciado)

No estudo imunohistoquímico foi utilizado como método de detecção o NovoLink Polymer Detection System (Newcastle, UK). As secções destinadas ao IHQ foram montadas em lâminas revestidas com APES, desparafinadas em xilol, rehidratadas numa série de álcoois em concentrações decrescentes, lavadas em água corrente e sujeitas a recuperação enzimática através da imersão em tampão citrato 10mM a pH 6.0, em panela de pressão, durante 3 minutos (Carson 1990). Para parar a reação a panela foi mergulhada em água corrente. Depois de arrefecidas, retiraram-se as lâminas para uma solução tampão (TBS).

O material foi sujeito ao bloqueio da peroxidase endógena mediante a incubação em peróxido de hidrogénio a 30 %, diluído na proporção 1:10 em metanol, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Seguiu-se uma dupla lavagem em TBS, com duração de 5 minutos cada. Depois de preparada uma câmara húmida, procedeu-se à incubação do Protein block, durante 5 minutos. No final deste tempo, o excesso de Protein block foi removido, sendo incubados os diferentes anticorpos (diluídos em BSA a 5%), *overnight* à temperatura de 4°C, num período máximo de 16 horas. Os anticorpos aplicados neste trabalho, bem como a sua especificidade e diluições utilizadas encontram-se sumariados na Tabela 1.

Anticorpo	Clone	Tipo	Especificidade	Diluição	Origem
Anti-CLDN-1	12H12	Policlonal	CLDN-1	1:75	Invitrogen
Anti-CLDN-2	-	Monoclonal	CLDN-2	1:60	Invitrogen
Anti-CLDN-7	-	Monoclonal	CLDN-7	1:60	Invitrogen

Tabela 1- Anticorpos utilizados na avaliação de proteínas das uniões intercelulares, nas neoplasias mamárias felinas.

Decorrido o tempo de incubação, os cortes foram sujeitos novamente à dupla lavagem em TBS, sendo depois incubados com a solução de Post primary block, durante 30 minutos, à

temperatura ambiente. Após novas lavagens com TBS, as preparações foram incubadas com Polymer, durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

Seguiram-se novas lavagens com TBS, revelando-se a reação com o cromogéneo- 3,3-diaminobenzidina (DAB Chromogen), tendo-se utilizado 50µl de DAB Chromogen por cada mililitro de Substrate buffer. A reação do substrato com a peroxidase produz um precipitado castanho no local de ligação do anticorpo primário ao antigénio. O tempo de revelação foi de aproximadamente 5 segundos, sendo os cortes submetidos, posteriormente, a lavagem em água corrente durante 5 a 10 minutos e contrastados com hematoxilina. Para finalizar, as amostras foram desidratadas em álcool, diafinizadas em xilol e montadas com Entellan.

O controlo negativo consistiu na utilização de uma amostra de tecido glandular mamário felino com lesão neoplásica mas o anticorpo foi substituído por uma solução tampão (TBS). Como controlo positivo foram utilizadas secções histológicas do mesmo tecido usado como controlo negativo.

A imunoreatividade foi avaliada segundo um critério semi-quantitativo, tendo por base a extensão, intensidade e localização da marcação. A Extensão foi classificada como: 0, se 0-5% de células marcadas; 1, se 6-20% de células marcadas; 2, se 21-40% das células marcadas; 3, se 41-60% de células marcadas; 4, se 61-80% de células marcadas e 5, se 81-100% das células marcadas. A intensidade de marcação foi pontuada com fraca (se mais de 70% do tumor demonstrava esta intensidade), moderada e forte (se mais de 70% do tumor exibia intensidade forte). Por fim, a localização foi classificada como membranar (se marcação da membrana lateral ou em toda a extensão da membrana) e citoplasmática.

Resultados

Classificação histopatológica

As amostras recolhidas para este trabalho incluíam 5 amostras de glândula mamária felina normal e 37 neoplasias malignas mamárias das quais, 23 apresentam metástases ganglionares (tabela 2).

Diagnóstico histopatológico	Nº de casos
Glândula mamária normal	5
Carcinoma tubulopapilar	16
Carcinoma sólido	12
Carcinoma de células escamosas	5
Carcinoma anaplásico	2
Carcinoma complexo	1
Carcinoma rico em lípidos	1
Metástases ganglionares	23

Tabela 2- Diagnóstico histológico das amostras de tecido mamário felino, segundo os critérios propostos pela OMS (1999).

Dos 16 Carcinomas tubulopapilares (CTP), 4 apresentavam áreas focais com produção de mucina e em 3 casos focos de diferenciação escamosa. De entre os Carcinomas sólidos (CS), 3 exibiam áreas focais com produção de mucina e em 3 casos imagens de diferenciação escamosa.

Grau Histológico

Dos 37 carcinomas mamários felinos incluídos neste estudo apenas 1 (2,7%) foi classificado como de grau I, 17 (45,95%) como de grau II e 19 (51,35%) como de grau III (tabela 2).

Tipo Histológico	Nº de casos	Grau Histológico		
		I	II	III
Carcinoma tubulopapilar	16	1	10	5
Carcinoma sólido	12	0	2	10
Carcinoma de células escamosas	5	0	2	3
Carcinoma anaplásico	2	0	1	1
Carcinoma complexo	1	0	1	0
Carcinoma rico em lípidos	1	0	1	0
Total	37	1	17	19

Tabela 3- Grau histológico consoante o tipo histológico, dos carcinomas utilizados neste estudo.

Imunoexpressão das Claudinas nas amostras de tecido mamário felino

Imunoexpressão da CLDN-1

No tecido glandular mamário felino normal, a CLDN-1 foi sistematicamente expressa apenas nas células epiteliais luminais dos ductos e pequenos ácinos em 81-100% das células. A intensidade de marcação foi forte e concentrou-se, maioritariamente, na membrana-lateral (Figura 3).

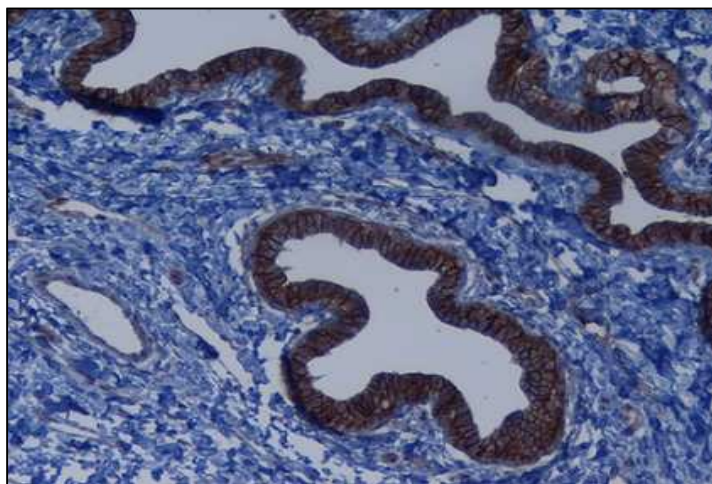
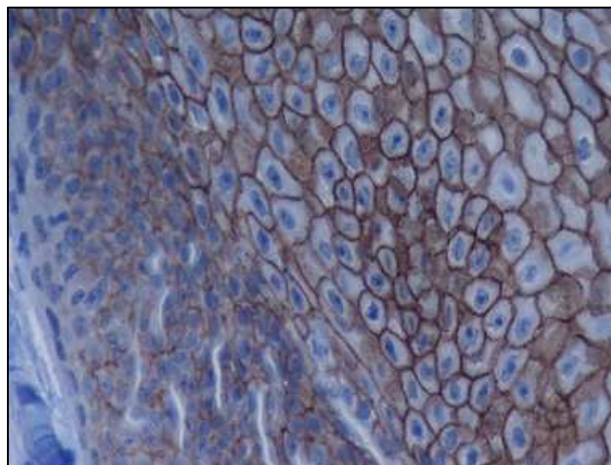


Figura 3: Glândula mamária normal (200x). Marcação membranar-lateral forte em 81-100% do eptélio luminal

Em todas as lesões neoplásicas estudadas a CLDN-1 foi expressa apenas nas células epiteliais luminais, embora a percentagem de células marcadas e a intensidade de marcação tenha sido variável entre os diferentes tumores. Treze neoplasias apresentaram entre 81-100% de células marcadas (figura 4), dos quais 1 era de grau I, 6 eram de grau II e 6 de grau III.



Das 24 lesões neoplásicas restantes, 16 exibiram 61-80% de células marcadas (6CTP, 7CS, 1CCE, 1CA e 1CC), 3 apresentaram 41-60% (2CTP e 1CS) de células marcadas, apenas uma (CTP) evidenciou 21-40% de células marcadas, 3 demonstraram 6-20% (1CS, 1CA e 1CL) de células marcadas e registou-se ainda, um caso demarcando menos de 5% das células neoplásicas (CTP) (figura 5). Do grupo das 24 lesões 11 eram de grau II e 13 de grau III.

Figura 4: Carcinoma de células escamosas (400x). Marcação membranar forte e citoplasmática moderada na quase totalidade do epitélio luminal.

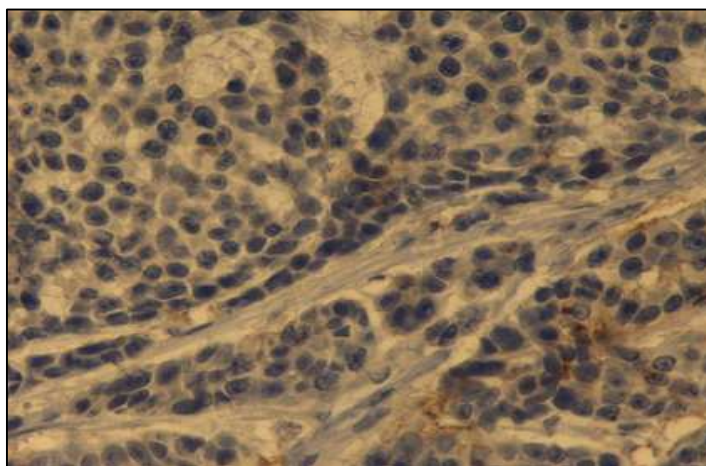


Figura 5: Carcinoma sólido (400x). Nas áreas sólidas das neoplasias observou-se uma diminuição no número de células marcadas e na intensidade de marcação.

A intensidade de marcação da componente epitelial luminal das amostras do estudo foi forte em 16 casos (7CTP, 3CS, 5CCE e 1CA), moderada também em 16 (7CTP, 8CS, 1CC) e fraca em 5 (2CTP, 1CS, 1CL e 1CA) casos. Dos carcinomas que evidenciaram intensidade de marcação inferior ao tecido mamário felino normal 9 eram de grau II e 11 de grau III. Tanto a intensidade da reação imunohistoquímica, como o número de células marcadas variou em função do arranjo arquitetural adotado pelas células, observando-se uma redução destes dois parâmetros nas áreas sólidas dos tumores.

Todas as neoplasias que contemplaram este estudo revelaram localização membranar lateral, porém alguns casos evidenciaram imunolocalização em toda a extensão da membrana (5CCE, 5CTP, 3CS e 1CA) e/ou citoplasmática (5CCE, 3CTP, 2CS, 1CA e 1CL) concomitantes, pontualmente (figura 6). Nos tumores que manifestaram localização citoplasmática, as células neoplásicas exibiram focos de diferenciação escamosa, mucinosa, lipídica ou fenótipo anaplásico.

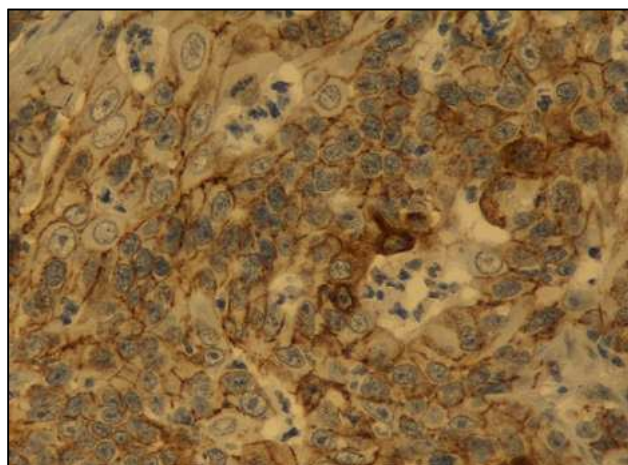


Figura 6: Carcinoma tubulopapilar (400x). Marcação membranar e citoplasmática nas células que exibia diferenciação escamosa.

Catorze lesões metastáticas evidenciaram uma percentagem de células marcadas igual à lesão primária (6CTP, 4CS, 2CCE, 1CA e 1CL), em 6 a proporção de células marcadas foi superior (5CTP e 1CS) e em 3 foi inferior ao registado na lesão primária correspondente. A intensidade de marcação foi igual à lesão primária em 14 metástases (7 CTP, 4CS e 2CCE), superior em 5 metástases (5CTP) e inferior em 4 (1CTP, 2CS e 1CA). A localização da marcação foi idêntica à lesão primária, ou seja, membranas laterais em todas com marcação em toda a extensão da membrana simultaneamente em 7 (5CTP, 1CS e 1CCE) (Figura 7).

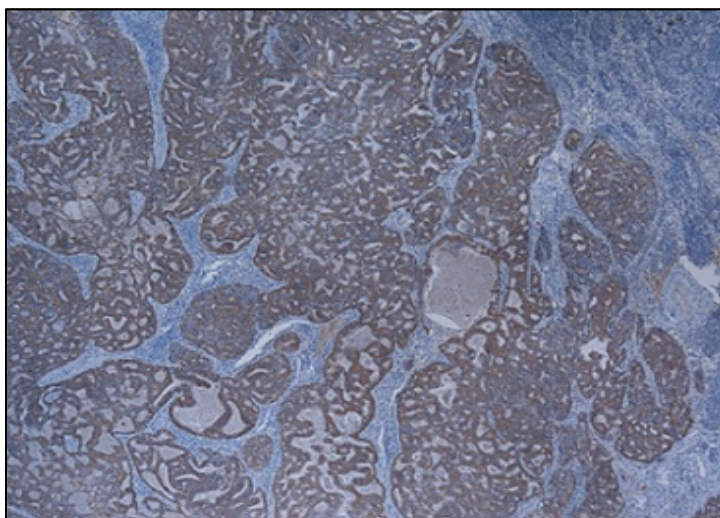


Figura 7: Metástase ganglionar de carcinoma tubulopapilar (40x). Observou-se marcação membranar forte na quase totalidade das células neoplásicas.

Imunoexpressão da CLDN-2

Na glândula mamária normal, a CLDN-2 foi expressa apenas nas células epiteliais luminais numa proporção de 61-40% em 3 casos e 41-20% em 2 amostras. A intensidade da reação imunohistoquímica variou de moderada (4 casos) a forte (1 caso) concentrando-se no citoplasma apical sob a forma de grânulos castanhos (Figura 8).

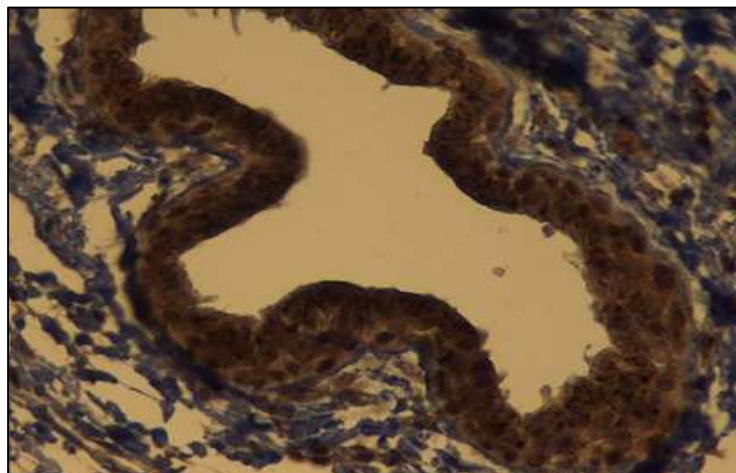


Figura 8: Glândula mamária normal (400x). Marcação citoplasmática granular apical do epitélio luminal.

Vinte e nove neoplasias evidenciaram imunomarcção positiva para o anticorpo CLDN-2 na componente epitelial luminal. Nas restantes 8 (4CTP e 4CS) a marcação foi negativa, das quais 4 eram de grau II e 4 de grau III. Dos 29 tumores positivos para CLDN-2, apenas um (CCE) evidenciou 61-80% de células marcadas, 2 (1CTP e 1CCE) exibiram 41-60% de células marcadas, em 3 (1CTP, 1CS e 1CA) a percentagem de células marcadas variou entre 21-40%, 7 (3CTP, 2CS, 1CCE e 1CC) demonstraram entre 6-20% de células marcadas e 16 (7CTP, 5CS, 2CCE, 1CA e 1CL) registaram menos de 5 % de células marcadas (Figura 9).

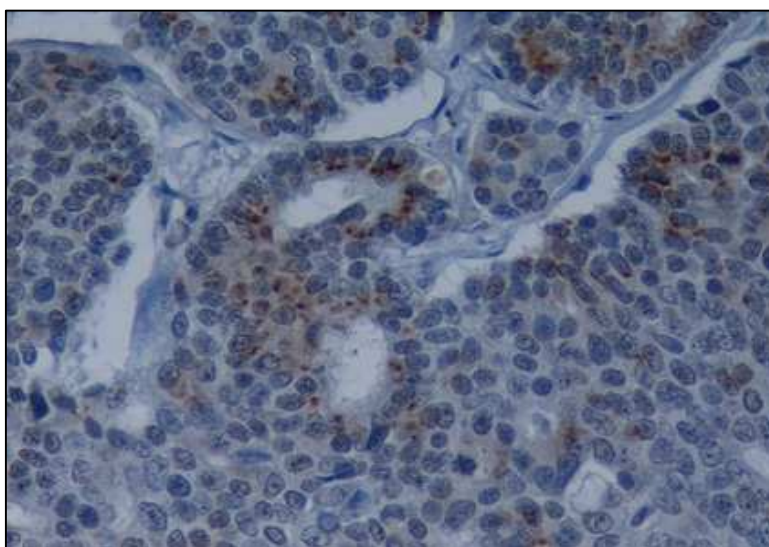


Figura 9: Carcinoma tubulopapilar (400x). Observou-se diminuição no número de células marcadas.

Dos que evidenciaram menos de 20% de células marcadas 11 eram de grau II e 11 de grau III. Relativamente à intensidade de marcação, as células epiteliais luminiais revelaram imunoreatividade forte em 4 casos (3CS e 1CCE), moderada em 16 (6CTP, 5CS, 3CCE, 1CA e 1CL) e fraca em 10 (6CTP, 2CS, 1CCE e 1CA) tumores. Das amostras que exibiram intensidade de marcação inferior à do tecido glandular mamário felino normal 1 era de grau I, 5 eram de grau II e 4 de grau III. Em todos os carcinomas imunopositivos para CLDN-2 observou-se, nas áreas em que as células neoplásicas evidenciavam perda da polaridade, assumindo um arranjo mais sólido, uma redução quer do número de células marcadas quer da intensidade da reação imunohistoquímica.

Os 29 tumores revelaram marcação do tipo citoplasmático, sob a forma de grânulos castanhos maioritariamente no citoplasma apical, dos quais 8 casos demonstraram ainda localização membranar e/ou citoplasmática densa (4CS, 2CA e 2CCE) concomitante, pontualmente (Figura 10).

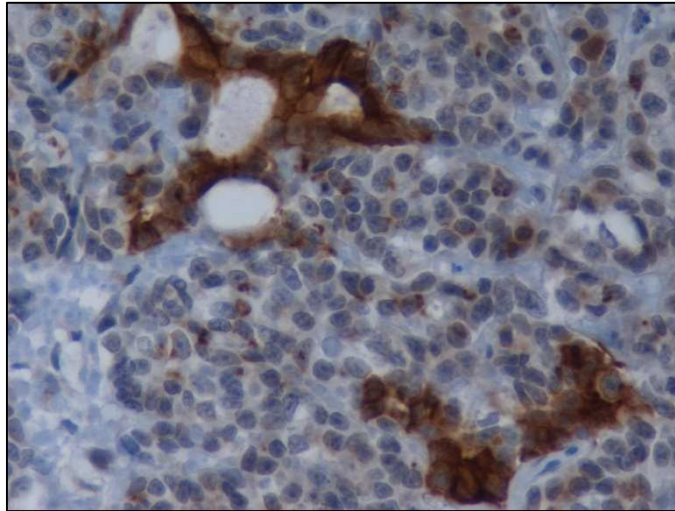


Figura 10: Carcinoma sólido com áreas de produção de mucina (400x). Marcação membranar e citoplasmática densa, forte nas células epiteliais luminiais.

A marcação membranar e/ou citoplasmática densa observou-se particularmente nos carcinomas com focos de diferenciação escamosa, produção de mucina ou cujas células exibiam fenótipo anaplásico.

Nove (3CTP, 3CS, 2CCE e 1CL) lesões metastáticas apresentaram uma percentagem de células marcadas igual à lesão primária, em 6 (CTP) foi superior e em 3 (1CTP, 1CS e 1CA) inferior à lesão original. A intensidade de marcação nas metástases, comparativamente ao tumor primário, foi igual em 11 neoplasias (4CTP, 4CS, 1CCE, 1CL e 1CA), superior em 4 (CTP) e inferior em 3 (2CTP e 1CCE). O padrão de localização foi semelhante à lesão inicial, ou seja, citoplasmática granular apical (Figura 11).

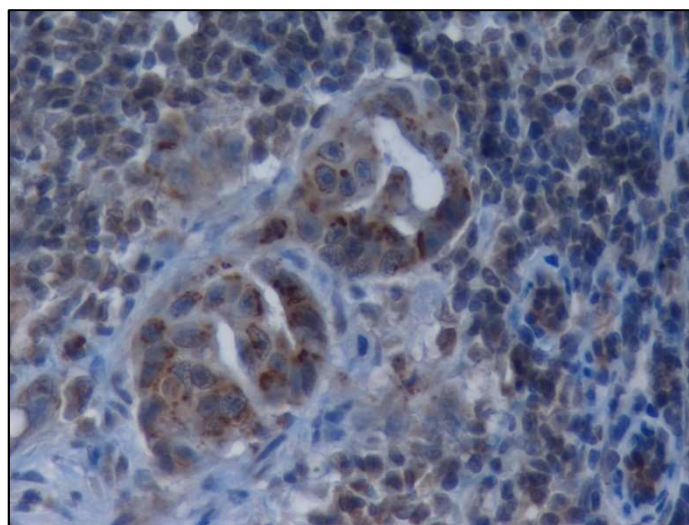


Figura 11: Metástase ganglionar de carcinoma tubulopapilar (400x). Observou-se número de células marcadas e intensidade de marcação igual à lesão primária

Imunoexpressão da CLDN-7

Nas amostras de tecido mamário felino normal, observou-se marcação apenas nas células epiteliais luminais, sendo que o número de células marcadas variou em 81-100%. A intensidade de marcação foi forte e do tipo membranar lateral (Figura 12).

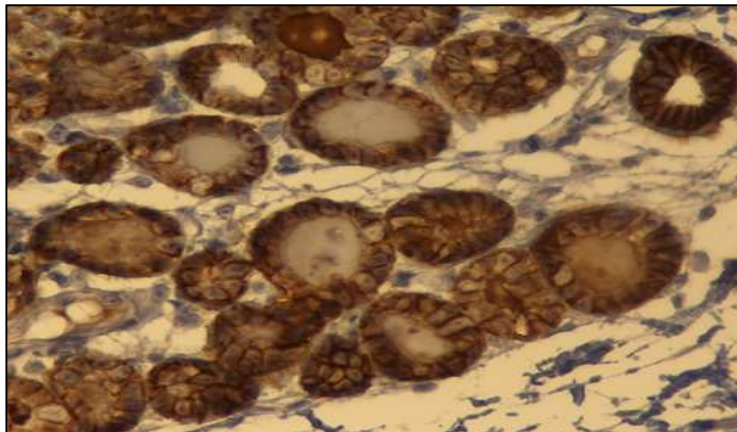


Figura 12: Glândula mamária normal (400x). Marcação membranar lateral em 81-100% das células epiteliais luminais.

Os carcinomas contemplados neste estudo revelaram imunoreatividade da CLDN-7 apenas na componente epitelial luminal. A percentagem de células marcadas e a intensidade de marcação variou entre os diferentes tumores. Vinte e oito neoplasias exibiram entre 81-100% de células marcadas (figura 13), das quais 13 eram de grau II e 14 de grau III. Das 9 lesões neoplásicas restantes, 6 exibiram 61-80% de células marcadas (2CTP, 3CS e 1CCE), 1 caso apresentou 41-60% (CTP) de células marcadas e 2 amostras registraram 6-20% (1CA, 1CL) de células marcadas. (Figura 14). Deste último grupo de lesões 4 eram de grau II e 5 de grau III.

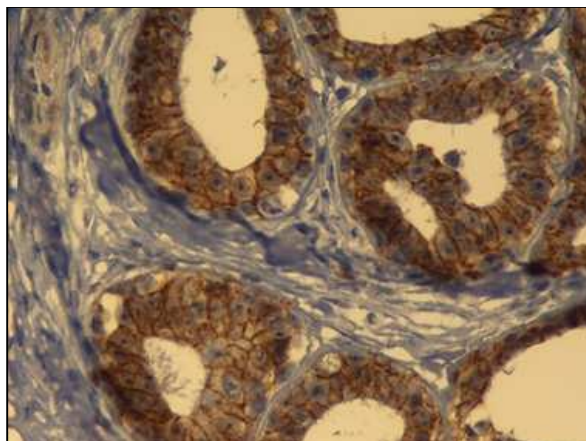


Figura 13: Carcinoma tubulopapilar (400x). Marcação membranar lateral forte na quase totalidade do epitélio luminal.

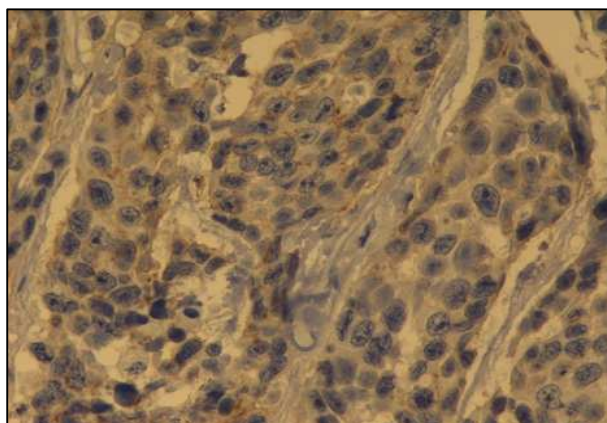


Figura 14: Carcinoma sólido (400x). Diminuição do número de células marcadas e da intensidade de marcação do epitélio luminal.

A intensidade de marcação nas amostras do estudo foi forte em 16 casos (5CTP, 5CS, 5CCE e 1CC), moderada em 17 (10CTP, 6CS e 1CA) e fraca em 4 (1CTP, 1CS, 1CL e 1CA) casos. Das neoplasias malignas que evidenciaram intensidade de marcação inferior à do tecido mamário felino normal, 11 eram de grau II e 9 de grau III. A intensidade de marcação e o número de células marcadas variou em função dos arranjos morfológicos adotados pelas células, observando-se uma redução destes dois parâmetros nas áreas sólidas dos tumores.

Todas as neoplasias incluídas neste estudo revelaram imunoreatividade localizada na membrana lateral.

Quinze metástases ganglionares demonstraram percentagem de células marcadas igual à lesão primária (8CTP, 3CS, 2CCE, 1CC e 1CL), em 2 a proporção de células marcadas foi superior e em 6 (3CTP, 2CS e 1CA) inferior ao registado na lesão primária correspondente. A intensidade de marcação foi igual à lesão primária em 16 metástases (9CTP, 4CS, 1CCE, 1CC e 1CL), superior em 3 (2CTP e 1CS) e inferior em 4 (2CTP, 1CCE e 1CA) metástases. A localização da marcação foi idêntica à lesão primária, ou seja, membranar lateral em todas as metástases (Figura 15).

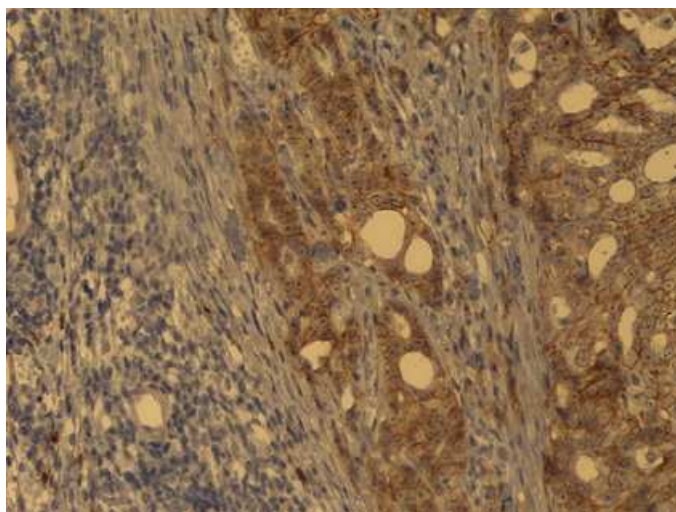


Figura 15: Metástase ganglionar de carcinoma de células escamosas (200x). Observou-se número de células marcadas e intensidade de marcação igual à lesão original.

Discussão

As CLDNs são proteínas transmembranares integrais, essenciais na estrutura e função das UICs, que desempenham um papel chave na manutenção da adesão e polaridade celular (Tokés *et al* 2005b) e controlam o transporte paracelular de macromoléculas, células imunes e agentes patogénicos entre células adjacentes (Heiskala *et al* 2001).

O elevado grau de organização celular, tipicamente observado nos tecidos diferenciados é frequentemente perdido durante o processo de transformação neoplásica (Ouban & Ahmed 2010). A perda de integridade da barreira epitelial, com alteração dos níveis de CLDNs, permite a difusão de nutrientes e outros fatores necessários à sobrevivência e crescimento das células neoplásicas (Morin 2005).

A alteração da expressão das CLDNs tem sido observada em diferentes carcinomas como reflexo da dissociação celular e parece estar relacionada com a progressão tumoral (Tokés *et al* 2005b). A diminuição da expressão das CLDNs no cancro é consistente com a ideia geralmente aceite de que, a génese tumoral envolve alterações das UICs, um processo que pode conduzir à perda de coesão celular, invasividade e falta de diferenciação observada nas células neoplásicas (Ouban & Ahmed 2010). Paradoxalmente, alguns estudos indicam que certas CLDNs estão sobre-expressas no cancro (Ouban & Ahmed 2010, Turksen & Troy 2011). A sobre-expressão das CLDNs nas neoplasias que geralmente perdem as suas UICs é inesperada, estando provavelmente relacionada com outro papel das CLDNs não associado à sua importância na formação das UICs (Ouban & Ahmed 2010).

Neste sentido, investigou-se a imunoexpressão das CLDNs-1, -2 e -7 em carcinomas mamários felinos e um possível envolvimento dessas moléculas no desenvolvimento e progressão dos tumores de mama da gata.

Neste trabalho as CLDNs- 1 e -7 evidenciaram localização membranar lateral forte, nas células epiteliais luminais normais da gata. A CLDN-2 localizou-se no citoplasma apical, formando grânulos castanhos de intensidade moderada. A localização imunohistoquímica das CLDNs-1 e -7 indica que estas proteínas são expressas ao longo de todo o comprimento na membrana lateral, entre células epiteliais contíguas, incluindo as áreas apicais contendo as UICs. Estes resultados são semelhantes aos descritos para a glândula mamária normal da mulher (Kominsky *et al* 2003, Tokés *et al* 2005a, Tokés *et al* 2005b) e da cadela (Jakab *et al* 2008a). Tal como já havia sido descrito para a glândula mamária normal humana (Tokés *et al* 2005a) e canina (Jakab *et al* 2008a), também na gata se observou expressão da CLDN-2 no citoplasma das células epiteliais. Esta localização, fora das UICs, nas células epiteliais normais sugere que esta molécula desempenha as suas funções, a partir do citoplasma. Nesse sentido impõe-se a questão: qual o mecanismo mediante o qual a CLDN-2 desempenha as suas funções a partir do citoplasma? Uma hipótese possível seria via transdução de sinal. Nas células mioepiteliais não se observou imunomarcção, o que corrobora com os resultados de estudos anteriores relativos à glândula mamária da mulher (Tokés *et al* 2005a, Kim *et al* 2008), da cadela (Jakab *et al* 2008a) e

do ratinho (Blackman *et al* 2005). Estes resultados indicam que o padrão de expressão das CLDNs-1, -2 e -7, na glândula mamária normal dos felinos é semelhante ao que se observa na mama normal da mulher e da cadela.

A CLDN-1 foi expressa em todas as lesões neoplásicas do estudo com uma proporção de células marcadas e intensidade de marcação variável entre os diferentes casos. A maioria dos tumores (24/37) evidenciou número de células marcadas e intensidade de marcação inferiores ao observado na mama normal da gata. Estes resultados indicam que na maioria dos casos estudados o número de células epiteliais neoplásicas positivas para CLDN-1 foi mais baixo comparativamente ao epitélio luminal normal, concordando com aqueles obtidos em tumores mamários da mulher (Tokés *et al* 2005a, Morohashi *et al* 2007). Além disso, tal como descrito noutros trabalhos (Tokés *et al* 2005b) parece haver uma relação inversa entre a diminuição da expressão da CLDN-1 e o grau de diferenciação da neoplasia, pelo que neoplasias pouco diferenciadas (grau III) apresentaram menor expressão da CLDN-1. Todos os carcinomas exibiram marcação do tipo membranar no epitélio luminal glandular. Estes números estão de acordo com aqueles apresentados por outros autores para a espécie humana (Tokés *et al* 2005a, Tokés *et al* 2005b, Morohashi *et al* 2007) e canina (Jakab *et al* 2008b). Doze neoplasias malignas (12/37) manifestaram imunolocalização citoplasmática concomitante, nas células neoplásicas que exibiam focos de diferenciação escamosa, mucinosa, lipídica ou fenótipo anaplásico. Este padrão de localização da CLDN-1 já foi detetado noutros trabalhos (Tokés *et al* 2005b, Morohashi *et al* 2007). As CLDNs podem ter mecanismos especiais de endocitose, ou seja, as UICs de membranas plasmáticas opostas encurtam o espaço intercelular e as CLDNs são endocitadas em conjunto numa mesma célula adjacente, gerando vesículas endocíticas (Matsuda *et al* 2003, Oliveira & Morgado-Díaz 2007, Findley & Koval 2009), o que explica a internalização citoplasmática observada. Estudos anteriores, nomeadamente em cancro do ovário, mostraram também que a fosforilação da CLDN-3 resulta numa marcação difusa desta proteína sugerindo uma redistribuição da mesma, das UICs para outras áreas da membrana ou para o citoplasma (Gerhard *et al* 2012). Outros ainda observaram uma redistribuição das CLDNs-1 e -4 das UICs para o citoplasma de células epiteliais da bexiga, no homem. No caso específico da CLDN-4, o mecanismo responsável pela regulação da expressão desta proteína e portanto, subjacente à deslocação da mesma para fora da membrana é a hipermetilação do gene que codifica para CLDN-4 (Gerhard *et al* 2012). Qualquer um destes mecanismos pode estar na origem da internalização citoplasmática de CLDN-1. Não se sabe qual o papel das CLDNs no citoplasma das células neoplásicas, contudo neste trabalho a localização citoplasmática da

CLDN-1 estava associada a células com fenótipo anaplásico, atípicas ou com pior comportamento biológico. A internalização citoplasmática das CLDNs nas células neoplásicas pode constituir um mecanismo adaptativo que lhes confere a capacidade de se separarem umas das outras, aumentando o seu potencial infiltrativo. É lógico pensar que, as CLDNs uma vez redistribuídas da membrana para o citoplasma pode induzir uma modificação na estrutura e/ou função das UICs, as quais podem deixar de desempenhar funções fundamentais como a manutenção da polaridade celular e o controlo do transporte paracelular. Desta forma, o influxo anormal de nutrientes e outros agentes patogénicos para o interior da célula pode induzir a perda de coesão celular, aumentar a proliferação celular e o potencial infiltrativo das células neoplásicas podendo levar à metastização.

Os CCE e alguns dos tumores com áreas focais de diferenciação escamosa evidenciaram marcação em toda a extensão da membrana plasmática, nas células escamosas. Um estudo recente, encabeçado por Gerhard *et al* (2012), cujo objetivo era avaliar a imunoposição das CLDNs (-1, -4 e -7) numa série de carcinomas de mama metaplásicos da mulher verificaram que, as células escamosas que constituíam estes tumores evidenciavam marcação membranar difusa para CLDN-1. À semelhança do que foi observado nesta investigação está a de Ouban e seus colaboradores (2012) que observaram expressão membranar difusa da CLDN-1 na maioria dos CCE da glândula mamária da mulher. Estes dados levam-nos a pensar na CLDN-1 como um possível marcador de diferenciação escamosa em carcinomas de mama da gata.

A CLDN-2 não registou marcação de nenhuma célula epitelial luminal ou mioepitelial em 8 carcinomas mamários, porém a epiderme e os anexos cutâneos (controlo positivo interno) estavam marcados, certificando a correta avaliação da IHQ. Portanto, a imunomarcação de CLDN-2 foi positiva na maioria das lesões deste trabalho; dessas 79,3% exibiram marcação inferior à do epitélio glandular mamário normal. A intensidade de marcação comparativamente à mama normal foi fraca numa pequena percentagem dos casos (10/29). Estes números são consistentes com aqueles de Kim *et al* (2008) e Jakab *et al* (2008b) para o cancro de mama da mulher e da cadela, respetivamente. A expressão da CLDN-2 foi inferior em igual número de neoplasias de grau II e III (11/23) o que aponta para uma relação entre diminuição das expressão da CLDN-2 e a perda de diferenciação celular. Em todas as lesões neoplásicas observou-se marcação do tipo citoplasmático nas células epiteliais luminiais neoplásicas. Tanto o epitélio normal como o neoplásico apresentaram localização citoplasmática afastando a hipótese de ter ocorrido internalização citoplasmática aquando a transformação neoplásica. Porém, 8 amostras (27,59%) evidenciaram imunolocalização membranar e citoplasmática densa, nas áreas com

diferenciação escamosa, mucinosa ou fenótipo anaplásico. Nas células com fenótipo aberrante, atípicas ou associadas a um pior comportamento biológico a redistribuição da CLDN-2, densamente no citoplasma ou para a membrana pode representar um mecanismo adaptativo que confere menor coesividade, destacamento e capacidade infiltrativa.

A CLDN-7, tal como a CLDN-1 foi expressa em todos os tumores do estudo. Apesar de apenas 24,32% das neoplasias terem apresentado uma proporção de células marcadas inferior à mama normal, mais de metade (56,76%) das neoplasias evidenciou menor intensidade de marcação relativamente ao epitélio glandular mamário normal, tal como já havia sido descrito por outros autores na espécie humana (Kominsky *et al* 2003, Tokés *et al* 2005a, Sauer *et al* 2005) e nos canídeos (Jakab *et al* 2008b).

Das neoplasias que evidenciaram menor proporção de células marcadas a maioria era de grau III. Estes resultados sugerem uma correlação inversa entre a expressão de CLDN-7 e o grau histológico, já que, neoplasias com menor expressão de CLDN-7 tinham maior grau. Consistentes com estes dados estão aqueles obtidos em investigações anteriores envolvendo neoplasias mamárias da mulher (Kominsky *et al* 2003, Sauer *et al* 2005, Tokés *et al* 2005a, Bernardi *et al* 2012). Todas as neoplasias do estudo manifestaram localização membranar da componente epitelial luminal neoplásica.

Nas áreas sólidas dos carcinomas a marcação foi menos intensa, abrangendo um menor número de células epiteliais. Este padrão foi comum a todos os anticorpos testados. As CLDNs, enquanto moléculas de adesão, são importante na organização das células em arranjos tubulares bem diferenciados logo, uma diminuição da sua expressão levaria à desorganização tecidual. Além disso a proporção de túbulos formados é dos parâmetros para a avaliação do grau histológico, ou seja, quanto menor a percentagem de túbulos formados (arranjos sólidos) maior o grau histológico. Assim, a um grau histológico elevado (grau III) associa-se uma maior desorganização tecidual e portanto, um pior prognóstico.

Na única amostra contendo mioepitélio neoplásico, cujo reconhecimento foi facilitado mediante a realização de um exame imunohistoquímico com o anticorpo anti-vimentina, não foi observada imunoreactividade nas células mioepiteliais.

Todas as CLDNs deste estudo evidenciaram diminuição do número de células marcadas e da intensidade de marcação nas neoplasias mamárias, numa percentagem variável, comparativamente ao epitélio glandular mamário normal da gata. Não era objetivo primário deste trabalho a investigação dos mecanismos subjacentes à diminuição de expressão destes isotipos porém, estudos precedentes apontam alguns processos que poderão estar associados à

desregulação da expressão das CLDNs no cancro. Um estudo, em neoplasias mamárias humanas demonstrou que a expressão do mRNA da CLDN-1 estava diminuída ou mesmo ausente, na maioria dos carcinomas mamários sugerindo que, o mecanismo aliado à desregulação da CLDN-1 ocorre antes da síntese proteica (Tokés *et al* 2005b). Relativamente à CLDN-2 investigações anteriores descrevem uma diminuição da regulação do mRNA desta molécula, possivelmente devido ao silenciamento genético que ocorre durante a carcinogénese. A fosforilação da CLDN-2 parece regular negativamente a expressão desta molécula nas células epiteliais renais de mamíferos (Kim *et al* 2008). Além disso, a hipermetilação da região promotora das CLDNs tem sido sugerida como um mecanismo para a perda de expressão destas proteínas nos tumores de mama (Kominsky *et al* 2003, Kim *et al* 2008).

A ausência ou diminuição no número de células epiteliais luminais marcadas, a diminuição da intensidade de marcação e as alterações no padrão de localização destas CLDNs nas neoplasias mamárias malignas da gata suportam a premissa de que as alterações na expressão das CLDNs estão relacionadas com a carcinogénese. A preservação da expressão da CLDN-1, -2 e -7 em algumas amostras neoplásicas sugere que estas moléculas podem estar presentes mas não funcionais. Além disso, sendo a adesão intercelular um fenómeno complexo, que envolve interações entre diversos agentes, não podemos ignorar a possibilidade de existirem outros marcadores, como as E-caderinas e/ou cateninas, que poderão estar na origem da perda de coesão celular (Sauer *et al* 2005). Assim, seria interessante testar nestes tumores a expressão de outras moléculas envolvidas no processo de adesão intercelular.

A percentagem de células marcadas e a intensidade de marcação das CLDNs-1, -2 e -7, na maioria das metástases ganglionares do estudo, foi igual ou superior à lesão primária. Estes resultados sugerem que, num ambiente estranho as células neoplásicas tendem a agrupar-se e a formar novas uniões intercelulares. A formação destas uniões pode constituir um mecanismo adaptativo que lhes permitam sobreviver num meio desconhecido e potencialmente hostil. Este achado contraria estudos anteriores que apontam para uma diminuição da expressão das CLDNs-1, -2 e -7 nas metástases ganglionares (Sauer *et al* 2005, Morohashi *et al* 2007, Szasz *et al* 2011).

A perda da morfologia dos tecidos normais é uma das primeiras alterações detetadas aquando o desenvolvimento de neoplasia. As moléculas de adesão celular, incluindo UICs, JA e desmossomas, desempenham um papel crucial na manutenção da arquitetura normal dos tecidos assim, alterações na sua expressão e/ou função têm sido implicadas na iniciação e progressão tumoral (Alford & Taylor-Papadimitriou 1996). Nas células neoplásicas as interações célula-célula são significativamente mais fracas, o que lhes permite destacarem-se umas das outras,

ultrapassar a membrana basal, aderir ao endotélio vascular e metastizar para locais distantes (Martin & Jiang 2009). Além disso, a inibição das interações célula-célula associa-se à perda de polaridade celular resultando em anomalias no processo de diferenciação tecidual. Posto isto, modificações na expressão e/ou função das moléculas de adesão resulta em perda de coesão celular, invasividade, metastização e perda de diferenciação. Neste estudo a expressão das CLDNs-1, -2 e -7 nos carcinomas mamários das gatas estava diminuída, parecendo estar associada com o grau histológico e com a metastização ganglionar sugerindo portanto, o envolvimento destas moléculas de adesão no desenvolvimento e progressão do cancro da mama da gata.

Limitações do estudo imunohistoquímico/Perspetivas futuras

O número de casos incluídos neste estudo foi muito reduzido pelo que, seria interessante aumentar o número de amostras, associado ao acompanhamento clínico periódico dos animais, por um período de tempo mais alargado, no sentido de obter informações seguras relativamente ao valor de prognóstico das CLDNs em carcinomas mamários felinos;

A adesão intercelular, da qual fazem parte as CLDN, constitui um fenómeno complexo que envolve a interação entre diferentes agentes. Assim, fazia sentido o alargamento da investigação a outros marcadores como as E-caderinas e/ou cateninas que poderão estar na origem da perda de coesão celular nos tumores mamários das gatas;

Investigação dos mecanismos subjacentes à perda de expressão das CLDN-1, -2 e -7 nos carcinomas mamários das gatas;

A avaliação das imagens de diferenciação escamosa foi realizada mediante a observação, na coloração HE, de células com citoplasma eosinófilo grande, de limites bem definidos e núcleo grande central, fazendo lembrar um “ovo estrelado”, contudo não podemos ignorar a possibilidade de outros tumores apresentarem focos de diferenciação escamosa impercetíveis na coloração HE. Assim, a aplicação de um marcador imunohistoquímico que expressa-se epitélio escamoso (como a p63-expressa pelo epitélio escamoso, carcinomas de células escamosas e células mioepiteliais mamárias humanas ou a CK 14- expressa nas células epiteliais estratificadas e queratinócitos) em todos carcinomas mamários felinos, poderia ajudar a comprovar que a marcação citoplasmática de CLDN-1 e citoplasmática densa/membranar de CLDN -2 ocorre nas células com diferenciação escamosa.

O reconhecimento da componente mioepitelial neoplásica foi feito mediante o exame imunohistoquímico com o anticorpo anti-vimentina. A Vimentina é um anticorpo específico para

células mesenquimatosas. O marcador imunohistoquímico que tem sido expresso no mioepitélio mamário humano é o anticorpo anti-p63. Assim, para garantir uma maior segurança nos resultados obtidos seria apropriado testar a única amostra que se admitiu conter mioepitélio neoplásico com o anticorpo anti-p63. Visto que, um resultado negativo para p63 levar-nos-ia a suspeitar não de mioepitélio neoplásico mas de células epiteliais na transição epitelial-mesenquimatoso.

Atividades desenvolvidas no Laboratório de Patologia Veterinária do ICBAS

A presente descrição refere-se às atividades desenvolvidas no Laboratório de Patologia Veterinária do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (LPV-ICBAS), no âmbito do estágio final do Mestrado integrado em Medicina Veterinária, que se baseou na receção e registo das amostras recebidas pelo LPV-ICBAS, na descrição das características macroscópicas do material recebido, na avaliação microscópica das amostras e na redação do relatório histopatológico e emissão do diagnóstico.

Durante o estágio tive a oportunidade de efetuar o exame macroscópico das amostras recebidas para análise no LPV-ICBAS, selecionar as porções a ser submetidas ao processamento, para posterior exame histopatológico, participar ativamente na realização do exame histológico das amostras, bem como na elaboração dos respetivos relatórios. Cada caso foi seguidamente alvo de confirmação por um dos patologistas veterinários (Prof. Doutora Fátima Gärtner, Prof. Doutor Augusto Faustino, Prof. Doutora Patrícia Dias Pereira e Dra. Irina Amorim), num esquema de rotação semanal. Todos os relatórios foram enviados por *email* (em formato digitalizado e protegido), sendo ainda assinados manualmente e posteriormente enviados pelo correio.

No período de duração do estágio foram processadas cerca de 843 amostras para exame histopatológico, procedentes da Cedivet, Clínicas/hospitais veterinários privados, Clínica veterinária do ICBAS, alunos do mestrado integrado em Medicina veterinária e de alunos de Doutoramento do ICBAS. A maioria dessas amostras era proveniente de animais de companhia, ou seja, 649 ou 76,99% de canídeos e 162 ou 19,22% de felídeos (Gráfico 1).

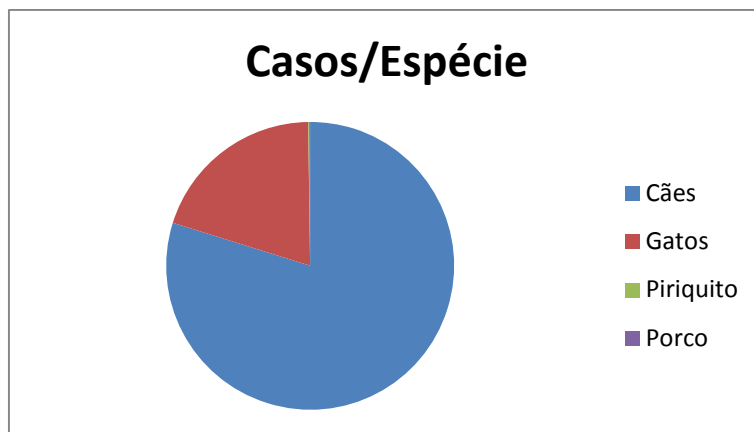


Gráfico 1: Proporção de casos por espécie processados no LPV-ICBAS no período de estágio.

Na grande maioria das vezes, cada caso continha mais do que uma amostra, do mesmo tecido ou de tecidos diferentes. O gráfico 2 pretende ilustrar os vários tipos de tecidos submetidos ao LPV-ICBAS, no período de vigência do estágio. O grupo “Pele” inclui todos os tecidos cutâneos, de superfície epidérmica livre, independentemente da localização. O grupo “Glândula mamária” inclui a cadeia mamária na sua totalidade ou apenas um fragmento. O útero e os ovários foram incluídos no mesmo grupo porque na grande maioria das vezes foram enviados juntos. O grupo “Outros” inclui todos aqueles tecidos que não correspondem a nenhum dos grupos ilustrados, nomeadamente olho, massas nasais, ouvido, mucosa oral, palato, lábio, glândula salivar, pulmão, massa abdominal, pâncreas, bexiga, vulva, pênis, próstata, músculo, gânglios, entre outros. Assim, a maioria dos tecidos enviados para o processamento histológico eram fragmentos cutâneos (445 de um total de 941 ou 47%), seguem-se as amostras de glândula mamária (212 de um total de 941 ou 23%), as de testículo (46 de um total de 941 ou 5%), baço e gengiva (26 e 24 respetivamente, de um total de 941 ou 3%), as de útero/ovários, fígado e intestino (23, 21 e 16 respetivamente, de um total de 941 ou 2%), as de estômago e osso (13 e 10 respetivamente, de um total de 941 ou 1%) e, por último todas as amostras incluídas no grupo “outros” (105 de um total de 941 ou 11%).

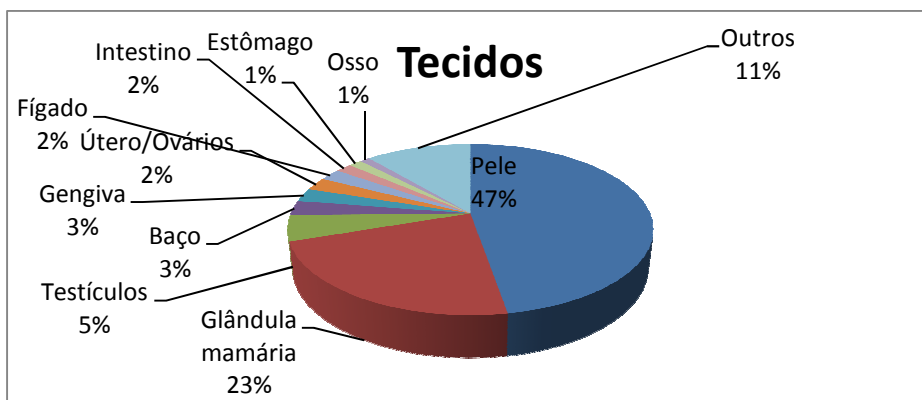


Gráfico 2: Tipo de tecidos submetidos ao LPV-ICBAS

O diagnóstico final de cada caso incluía muitas vezes a descrição de mais do que uma lesão, visto que uma única amostra pode conter mais do que uma lesão ou cada caso compreender mais do que uma amostra de tecidos. As lesões encontradas nestes 843 casos foram distribuídas em 3 categorias, a das lesões “inflamatórias”, a das lesões “neoplásicas” e a categoria “outras”. Na categoria “inflamatórias” foram incluídos todos os processos inflamatórios que afetam os diferentes sistemas biológicos; a categoria “neoplásicas” abarca todo o tipo de neoplasias (epiteliais, mesenquimatosas, de células redondas, endoteliais, bainhas nervosas, etc), benignas e malignas; por fim, a categoria “outras” abrange todas as lesões que não correspondem a nenhuma das categorias descritas anteriormente entre elas, quistos, pólipos, displasias, hiperplasias, hipoplasias, etc. O gráfico 3 demonstra a proporção de lesões inflamatórias, neoplásicas e outras, para cães e gatos.

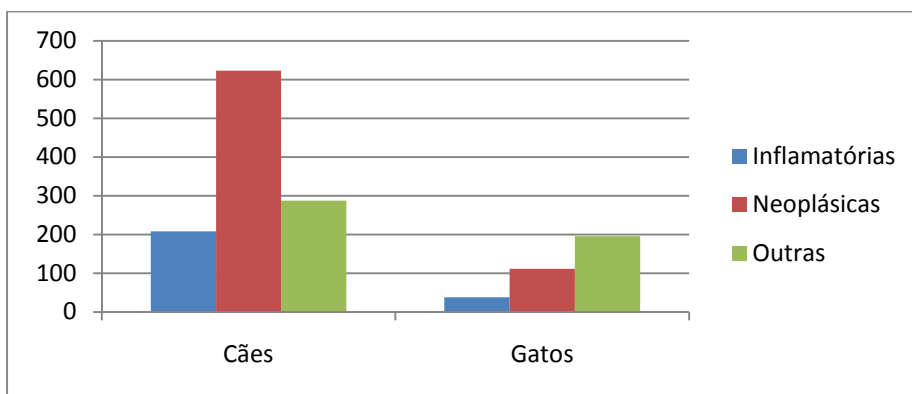


Gráfico 3: Tipo de lesões observadas nas amostras submetidas ao LPV-ICBAS

Nos cães, a maioria das lesões observadas ao exame microscópico eram neoplasias (623 de um total de 1118 ou 55,72%), seguindo-se as “outras” (287 de um total de 1118 ou 25,40%) e por último as lesões inflamatórias (208 de um total de 1118 ou 18,60%). Em contrapartida nos gatos a maioria das lesões foram as da categoria “outras” (196 de um total de 345 ou 56,81%), posteriormente as neoplasias foram o tipo lesional mais frequente (111 de um total de 345 ou 32,17%) e por fim as lesões inflamatórias (38 de um total de 345 ou 11,01%).

Estes números indicam que a maioria das amostras submetidas ao LPV-ICBAS, no período de duração do estágio, foram de animais de companhia, particularmente cães; os tecidos mais enviados foram a pele e glândula mamária, estes valores estão provavelmente associados ao fato de serem tecidos visíveis despertando mais facilmente a atenção do proprietário; no geral as lesões neoplásicas foram o tipo lesional mais frequente entre as amostras enviadas.

Bibliografia

Alford A and Taylor-Papadimitriou J (1996) “Cell adhesion molecules in the normal and cancerous mammary gland” **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia** 1, 207-218

Blackman B, Russell T, Nordeen SK, Medina D, Neville MC (2005) “Claudin expression and localization in the normal murine mammary gland and murine mammary tumors” **Breast Cancer Res** 7, 248-255

Bernardi MA, Logullo AF, Pasini FS, Nonogaki S, Blumke C, Soares FA, Brentani MM (2012) “Prognostic significance of CD24 and claudin-7 immunoexpression in ductal invasive breast cancer” **Oncology Reports** 27, 28-38

Borrego JF, Cartagena JC, Engel J (2009) “Treatment of felinemammary tumours using chemotherapy, surgery and a COX-2 inhibitor drug (meloxicam): a retrospective study of 23 cases (2002–2007)” **Veterinary and comparative oncology** 7, 4, 213-221

Brennan K, Offiah G, McSherry EA, M. Hopkins AM (2009) “Tight Junctions: A Barrier to the Initiation and Progression of Breast Cancer?” **Journal of Biomedicine and Biotechnology** 2010, 1-16

Carson FL (1990) “Histotechnology a self-introduction text”, **ASCP Press** 12, 231-249

Elston CW and Ellis IO (1996) “Assessment of histological grade” in Rosen PP, ed **Rosen’s Breast Pathology**, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 365-382

Fanning AS, Van Itallie CM, Anderson JM (2012) “Zonula occludens-1 and -2 regulate apical cell structure and the zonula adherens cytoskeleton in polarized epithelia” **Molecular Biology of Cell** 23, 577-590

Findley MK and Koval M (2009) “Regulation and roles for claudin-family tight junction protein” **IUBMB Life** 61(4), 431-437

Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S (1998) “Claudin-1 and -2: Novel Integral Membrane Proteins Localizing at Tight Junctions with No Sequence Similarity to Occludin” **The Journal of Cell Biology** 141, 1539-1550

Furuse M, Sasaki H, Tsukita S (1999) “Manner of Interaction of Heterogeneous Claudin Species Within and Between Tight Junction Strands” **The Journal of Cell Biology** 147, 891-903

Gerhard R, Ricardo S, Albergaria A, Gomes M, Silva AR, Logullo AF, Cameselle-Teijeiro JF, Paredes J, Schmitt F (2012) “Immunohistochemical features of claudin-low intrinsic subtype in metaplastic breast carcinomas” **The breast**, 1-7

Heiskala M, Peterson PA, Yang Y (2001) “The Roles of Claudin Superfamily Proteins in Paracellular Transport” **Traffic** 2, 92-98

Ichikawa-Tomikawa N, Sugimoto K, Satohisa S, Nishiura K, Chiba H (2011) “Possible Involvement of Tight Junctions, Extracellular Matrix and Nuclear Receptors in Epithelial Differentiation” **Journal of Biomedicine and Biotechnology** 2010, 1-10

Jakab C, Halász J, Szász AM, Batmunkh E, Kiss A, Schaff Z, Rusvai M, Gálfi P, Kulka J (2008a) “Expression and localization of claudin-1,-2,-3,-4,-5,-7 and -10 proteins in the normal canine mammary gland” **Acta veterinaria Hungarica** 56(3), 341-352

Jakab C, Halász J, Szász AM, Kiss A, Schaff Z, Rusvai M, Gálfi P, Kulka J (2008b) “Expression of claudin-1,-2,-3,-4,-5 and -7 proteins in benign and malignant canine mammary gland epithelial tumours” **J Comp pathol** 139, 238-245

Kim TH, Huh JH, Lee S, Kang H, Kim GI, An HJ (2008) “Down-regulation of claudin-2 in breast carcinomas is associated with advanced disease” **Histopathology** 53, 48–55

Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, Rein A, Sauter G, Kallioniemi O, Sukumar S (2003) “Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast” **Oncogene** 22, 2021–2033

Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE (2008) “Structure and function of claudins” **Biochimica et Biophysica Acta** 1778, 631-645

Lal-Nag M and Morin PJ (2009) “The Claudins” **Genome Biology** 10(8), 235.1-235.7

Lana SE, Rutteman GR, Withrow SJ (2007) “Tumors of mammary gland” *in* Withrow & Macewen’s **Small animal clinical oncology**, 4^o Ed, Saunders, 619-636

Markov AG, Kruglova NM, Fomina YA, Fromm M, Amasheh S (2012) “Altered expression of tight junction proteins in mammary epithelium after discontinued suckling in mice” **Transport Physiology** 463, 391–398

Martin TA and Jiang WG (2009) “Loss of tight junction barrier and its role in cancer metastasis” **Biochimica et Biophysica Acta** 1778, 872-891

Matos AJF, Baptista CS, Gärtner MF, Rutteman GR (2012) “Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: The need for standardized procedures” **The Veterinary Journal** xxx, xxx–xxx

Matsuda M, Kubo A, Furuse M, Tsukita S (2003) “A peculiar internalization of claudins, tight junction specific adhesion molecules, during the intercellular movement of epithelial cells” **Journal of Cell Science** 117, 1247-1257

- Misdorp W (2002) "Tumors of the Mammary Gland" *in* Meuten DJ **Tumors in Domestic Animals**, 4^o Ed, Iowa State Press, 575-606
- Misdorp W, Else RW, Hellmén E, Lipscomb TP (1999) "Histological classification of mammary tumours of the dog and cat", 2^o Ed, **Armed Forces Institute of Pathology**, Washington, DC, 11-56
- Morin PJ (2005) "Claudin Proteins in Human Cancer: Promising New Targets for Diagnosis and Therapy" **Cancer Res** 65, 9603-9606
- Morohashi S, Kusumi T, Sato F, Odagiri H, Chiba H, Yoshihara S, Hakamada K, Sasaki M, Kijima H (2007) "Decreased expression of claudin-1 correlates with recurrence status in breast cancer" **International Journal of molecular medicine** 20, 139-143
- Morris J & Dobson J (2001) "Mammary gland" **Small animal oncology**, Blackwell Science, 184-191
- Munson L and Moresco A (2007) "Comparative Pathology of Mammary Gland Cancers in Domestic and Wild Animals" **Breast Disease** 28, 7-21
- Oliveira SS and Morgado-Díaz JA (2007) "Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer" **Cellular and Molecular Life Sciences** 64, 17-28
- Ouban A and Ahmed AA (2010) "Claudins in human cancer: A review" **Histology and Histopathology** 25, 83-90
- Ouban A, Hamdan H, Hakam A, Ahmed AA (2012) "Claudin-1 expression in squamous cell carcinomas of different organs: comparative study of cancerous tissues and normal controls" **International Journal of Surgical Pathology** XX(X), 1-7
- Sauer T, Pedersen MK, Ebeltoft K, Næss O (2005) "Reduced expression of Claudin-7 in fine needle aspirates from breast carcinomas correlate with grading and metastatic disease" **Cytopathology** 16, 193-198
- Seixas F, Palmeira C, Pires MA, Bento MJ, Lopes C (2011) "Grade is an independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: A clinicopathological and survival analysis" **The Veterinary Journal** 187, 65-71
- Singh BA, Sharma A, Dhawan P (2010) "Claudin Family of Proteins and Cancer: An Overview" **Journal of Oncology** 2010, 1-11
- Soini Y (2005) "Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours" **Histopathology** 46, 551-560

Szasz AM, Tokés AM, Micsinai M, Krenacs T, Jakab C, Lukacs L, Nemeth Z, Baranyai Z, Dede K, Madaras L, Kulka L (2011) “Prognostic significance of claudin expression changes in breast cancer with regional lymph node metastasis” **Clin Exp Metastasis** 28, 55–63

Tokés AM, Kulka J, Paku S, Máthé M, Páska C, Lódi C, Kiss A, Schaff Z (2005a) “The expression of five different claudins in invasive breast carcinomas of pT1pN1 and pT1pN0 tumors” **Pathol Res Pract** 201, 531-544

Tokés AM, Kulka J, Paku S, Szik A, Páska C, Novák PK, Szilák L, Kiss A, Bögi K, Schaff Z (2005b) “Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study” **Breast Cancer Research** 7, 296-305

Turksen K and Troy TC (2011) “Junctions gone bad: Claudins and loss of the barrier in cancer” **Biochimica et Biophysica Acta** 1816, 73–79

Van Itallie CM and Anderson JM (2006) “Claudins and epithelial paracellular transport” **Annu Rev Physiol** 68, 403-429

Van Itallie CM, Gambling TM, Carson JL, Anderson JM (2005) “Palmitoylation of claudins is required for efficient tight-junction localization” **Journal of Cell Science** 118, 1427-1436