

KARINE ARAÚJO DAMASCENO

**CARCINOMAS EM TUMORES MISTOS MAMÁRIOS CANINOS:
EXPRESSÃO DE VERSICAN E SUA RELAÇÃO COM INVASÃO DO
ESTROMA E COM GRAU DE DIFERENCIAÇÃO MIOEPITELIAL**

Belo Horizonte

2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG
FACULDADE DE MEDICINA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARCINOMAS EM TUMORES MISTOS MAMÁRIOS CANINOS:
EXPRESSÃO DE VERSICAN E SUA RELAÇÃO COM INVASÃO DO
ESTROMA E COM GRAU DE DIFERENCIAÇÃO MIOEPITELIAL**

Belo Horizonte

2012

KARINE ARAÚJO DAMASCENO

**CARCINOMAS EM TUMORES MISTOS MAMÁRIOS CANINOS:
EXPRESSÃO DE VERSICAN E SUA RELAÇÃO COM INVASÃO DO
ESTROMA E COM GRAU DE DIFERENCIAÇÃO MIOEPITELIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Área de Concentração: Patologia Geral

Orientador: Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali

Co-Orientadora: Dra. Angélica Bertagnolli

Belo Horizonte

2012

D155c Damasceno, Karine Araújo.
Carcinomas em tumores mistos mamários caninos [manuscrito]:
expressão de versican e sua relação com invasão do estroma e com grau de
diferenciação mioepitelial. / Karine Araújo Damasceno. - - Belo
Horizonte: 2012.
113f.: il.
Orientador: Geovanni Dantas Cassali.
Co-orientadora: Angélica Cavalheiro Bertagnolli.
Área de concentração : Patologia Geral.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Medicina
1. 1. Carcinoma. 2. Neoplasias Mamárias Animais. 3. Tumor Misto.
4. Glândulas Mamárias Animais. 5. Versican. 6. Dissertações
Acadêmicas. I. Cassali, Geovanni Dantas. II. Bertagnolli, Angélica
Cavalheiro. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de
Medicina. IV. Título.

NLM: QZ 200



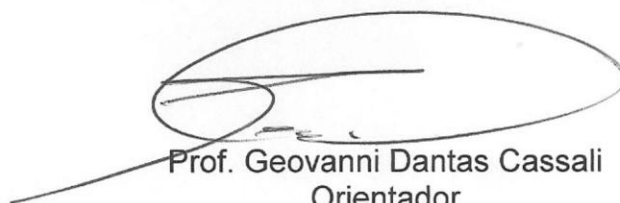
**FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br

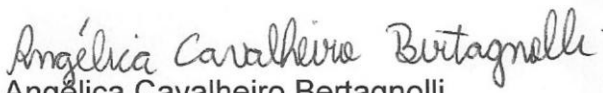


DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, composta pelos professores doutores: Geovanni Dantas Cassali, Angélica Cavalheiro Bertagnolli, Alessandra Estrela da Silva Lima e Maria Cássia Ferreira de Aguiar, aprovou a defesa da dissertação intitulada: **“EXPRESSÃO DE VERSICAN E INVASÃO EM ESTROMA NOS CARCINOMAS EM TUMORES MISTOS DA MAMA DE CADELAS”**, apresentada pela mestranda **KARINE ARAÚJO DAMASCENO**, para obtenção do título de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Geral, da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 24 de fevereiro de 2012.



Prof. Geovanni Dantas Cassali
Orientador



Profa. Angélica Cavalheiro Bertagnolli
Coorientadora



Profa. Alessandra Estrela da Silva Lima



Profa. Maria Cássia Ferreira de Aguiar



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409-9640
cpg@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **KARINE ARAÚJO DAMASCENO**, nº de registro 2010652392. Às quatorze horas do dia **24 de fevereiro de dois mil e doze**, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de defesa de dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“EXPRESSÃO DE VERSICAN E INVASÃO EM ESTROMA NOS CARCINOMAS EM TUMORES MISTOS DA MAMA DE CADELAS”**, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG - Área de Concentração em Patologia Geral. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Geovanni Dantas Cassali, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra à candidata para apresentação do seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Geovanni Dantas Cassali/Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Profa. Angélica Cavalheiro Bertagnolli/Coorientadora	Instituição: FEPAGRO	Indicação: <u>Aprovada</u>
Profa. Alessandra Estrela da Silva Lima	Instituição: UFBA	Indicação: <u>Aprovada</u>
Profa. Maria Cássia Ferreira de Aguiar	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada Aprovada.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 24 de fevereiro de 2012.

Prof. Geovanni Dantas Cassali _____

Profa. Angélica Cavalheiro Bertagnolli Angélica Cavalheiro Bertagnolli

Profa. Alessandra Estrela da Silva Lima Alessandra Estrela da Silva Lima

Profa. Maria Cássia Ferreira de Aguiar Maria Cássia Ferreira de Aguiar

Prof. Wagner Luiz Tafuri (Coordenador) Wagner Luiz Tafuri

Prof. Wagner Luiz Tafuri
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Patologia - Faculdade de Medicina/UFMG

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral-ICB/UFMG, com apoio financeiro do CNPq, FAPEMIG e CAPES.

DEDICATÓRIA

Ao que eu tenho de mais puro e verdadeiro,
o *AMOR* da minha família.

Aos meus amados pais, Luiz e Maria, a minha irmã,
Priscila e a minha madrinha Valderez, *in memoriam*.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pela saúde e pelas oportunidades que me tens dado;

A toda minha família, ao meu pai Luiz, minha mãe Maria José e a minha irmã Priscila. Obrigada sempre pelo apoio incondicional, paciência, conselhos e pelo amor me dedicam;

Ao meu orientador Professor Geovanni, um grande exemplo profissional, por ter acreditado no meu trabalho, pelo total apoio e incentivo. Obrigada pela oportunidade de fazer parte desta grande equipe LPC!

A minha coorientadora Angélica, sem palavras para agradecer tamanha bondade, paciência e doçura, que mesmo tão longe sabe se fazer presente, sempre me ajudando, incentivando e tentando achar respostas. Mais que uma coorientadora, uma amiga!

A Professora Alessandra, agradecerei por toda a vida a quem pegou na minha mão e me mostrou um caminho. Obrigada por ter acreditado em mim e fazer parte da minha história. Minha eterna “mainha patológica”!

Ao setor de clínica e patologia da Universidade Federal da Bahia, por me conceder utilizar os casos e as instalações do LABAP/UFBA. Em especial, aos professores Alessandra e Eduardo, queridos mestres;

Ao setor de Patologia Veterinária da Escola de Medicina Veterinária/UFMG, por disponibilizar parte dos blocos necessários para a execução deste trabalho;

Aos colegas do LPC, Cris, Paty, Cecis, Lili, Conrado, Marinex, Enio, Juninho, Anita, Lu, Tamara, Bruna, Diego, Ana, Fabiana, Juliana, Clarissa e Yasmim. Obrigada pela amizade e por tornarem meus dias de trabalho tão agradáveis;

Ao Dr. Enio, pelos conselhos, pelos questionamentos, por se fazer tão solícito;

Às técnicas, Mirna e Leimar, pela presteza em ajudar-me sempre que precisei;

Aos amigos LABAP... vocês fazem parte da minha história!

A Lorena, mais que amiga, minha “irmã patológica”. Obrigada pelos conselhos, pela amizade e pelo auxílio neste trabalho;

A Liliane, por me ajudar a entender a tão complicada estatística;

A Cecília, pela auxílio na “caça” as fichas e pela árdua correção do artigo;

A Cris, pela cumplicidade e por me apoiar sempre que preciso!!!

A estagiária Bruna, minha fiel escudeira, pela ajuda indispensável na execução deste trabalho;

Às amigas feitas durante o mestrado: Saira, Teresa, Irma e Michele. Obrigada pela cumplicidade, pela boa convivência e pelos momentos de descontração;

Ao Daniel, por ser tão solícito e indispensável nas horas de aperto. Obrigada por “quebrar nosso galhos” tecnológicos!

Ao CNPq pela bolsa de estudos e a FAPEMIG pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho...

Minha sincera gratidão!

“O nosso destino nunca é um lugar, mas uma nova maneira de olhar as coisas.”

Henry Miller

SÚMARIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Tumores mamários em cadela.....	22
2.2 Tumores mistos benignos.....	26
2.2.1 Histogênese.....	27
2.3 Carcinomas em tumores mistos benignos.....	29
2.3.1 Mioepitélio e invasão.....	32
2.4 Matriz extracelular e versican.....	34
3. HIPÓTESE	39
4. OBJETIVOS	39
4.1 Objetivos gerais.....	39
4.2 Objetivos específicos.....	39
5. MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1 Seleção de casos.....	40
5.2 Estadiamento (TNM).....	40
5.3 Histopatologia.....	40
5.4 Graduação histopatológica.....	41
5.5 Índice Prognóstico de Nottingham (IPN).....	42
5.6 Imuno-histoquímica.....	42
5.7 Avaliação imuno-histoquímica.....	44
5.8 Histoquímica.....	45
5.9 Análise estatística.....	45
5.10 Protocolo – Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	46
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
ARTIGO 1	47

	ARTIGO 2.....	75
7.	CONCLUSÕES GERAIS.....	92
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
10.	ANEXOS.....	101
	Anexo 1 - Estadiamento clínico (TNM) dos carcinomas mamários da cadela.....	106
	Anexo 2 - Critérios utilizados na graduação de tumores mamários de cadela conforme o grau de malignidade.....	107
	Anexo 3 - Certificado CETEA.....	108
	Anexo 4 - Comprovante de submissão.....	109
	Anexo 5 - Produção científica.....	110

LISTA DE FIGURAS

		Pág. 36
Figura 1	Isoformas de versican	
Artigo 1 - Versican expression in canine carcinomas in benign mixed tumors: Is there an association with clinical pathological factors, invasion and overall survival?		
Figura 1	Carcinoma in benign mixed tumor. A. <i>In situ</i> carcinomatous area in a carcinoma in benign mixed tumor. HE, 60x. B. Evidence of an intact basement membrane. PAS, 60x. C. Integrity of the myoepithelium layer demonstrated by p63 and α -SMA double staining. 60x. D. Microinvasion area in carcinoma in benign mixed tumor (arrow). HE, 60x. E. Discontinuous basement membrane (arrow). PAS, 60x. F. Absence of p63 and α -SMA expression (arrow). 60x.	67
Figura 2	Carcinoma in benign mixed tumor. A. <i>In situ</i> carcinomatous area with low estromal versican expression. Immunohistochemical stain with Mayer's haematoxylin counterstain, 40x. B. Versican overexpression adjacent to invasive area. Immunohistochemical stain with Mayer's haematoxylin counterstain, 40x.	69
Figura 3	Difference between <i>in situ</i> and invasive areas for p63 and α -SMA (a) and e-cadherin (b) demonstrated by immunohistochemistry. Accumulation of versican in invasive carcinomatous areas when compared with <i>in situ</i> areas (c). *Spearman correlation §Wilcoxon test.	71
Figura 4	Survival rates of animals with canine mammary carcinomas in benign mixed tumors. Survival curves were estimated with the Kaplan-Meier method followed by Log-rank test.	73
Artigo 2 - Carcinomas em tumores mistos benignos mamários caninos: Expressão de versican nos vários estágios de diferenciação das células mioepiteliais		
Figura 1	Carcinoma em tumor misto benigno mamário canino. (A) Expressão de p63 e α -SMA pelas células mioepiteliais poligonais, 60x. (B) Células mioepiteliais fusiformes em proliferação. PAS, 60x. (C) Expressão de p63 e α -SMA pelas células mioepiteliais fusiformes, 60x. (D) Área de matriz mixóide. PAS, 60x. (E) Perda de imunorreatividade na expressão de p63 e ausência de α -SMA em área de matriz mixóide, 60x. (F) Cartilagem madura. PAS, 60x.	90
Figura 2	Carcinoma em tumor misto benigno mamário canino. (A) Área mostrando proliferação de células poligonais,	91

com fraca reatividade de versican, e células fusiformes, moderadamente marcadas. Contra-coloração de hematoxilina de Mayer's, 40x. (B) Proliferação de células estreladas. Safranina-o, 40x. (C) Matrix mixóide expressando fortemente versican. Contra-coloração de hematoxilina de Mayer's, 40x. (D) Matriz mixóide. Safranina-o, 40x. (E) Matriz condróide revelando perda da expressão de versican. Contra-coloração de hematoxilina de Mayer's, 20x. (F) Matriz condróide. Safranina-o, 40x.

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

	Pág.	
Tabela 1	Classificação histológica das neoplasias mamárias caninas.	24
Tabela 2	Lista de anticorpos	43
Artigo 1 - Versican expression in canine carcinomas in benign mixed tumors: Is there an association with clinical pathological factors, invasion and overall survival?		
Tabela 1	Association between pathological and clinical status of mammary carcinomas in mixed tumors in female dogs	64
Tabela 2	Evaluation for PAS and association between immunoreactive for p63, α -SMA, E-cadherin and Ki-67 in groups	65
Tabela 3	Versican immunohistochemistry evaluation in <i>in situ</i> and invasive areas of mammary carcinomas in benign mixed tumors in female dogs	66
Artigo 2 - Carcinomas em tumores mistos benignos mamários caninos: Expressão de versican nos vários estágios de diferenciação das células mioepiteliais		
Tabela 1	Caracterização dos tipos celulares e imunorreatividade para versican, p63 e α -SMA nos carcinomas em tumores mistos benignos mamários caninos	82
Gráfico 1	Expressão de versican pelos tipos celulares durante a condrogênese nos carcinomas em tumores mistos benignos mamários caninos. NMEC= células mioepiteliais normais; PMEC = células mioepiteliais em proliferação; SPMEC = células fusiformes; SMEC = células estreladas; MM = células da matriz mixóide; ICHB = condrócitos em cartilagem imatura; CHB = condrócitos em cartilagem madura. Letras distintas diferem entre si estatisticamente ao valor de $p < 0.05$.	83

LISTA DE ABREVIATURAS

- AFIP - *Armed Forces Institute of Pathology*
- AH - Ácido hialurônico
- BMP - 6 - Proteína morfogênica óssea do tipo 6
- Ca15.3 - Antígeno do câncer 15.3
- cDNA - DNA complementar
- CD44 – Glicoproteína de superfície celular
- CEA - Antígeno carcinoembrionário
- ChM -1 - Condromodulina-1
- CISH - Hibridização cromogênica *in situ*
- CK - Citoqueratina
- CBMT – Carcinoma em tumor misto benigno (Carcinomas in benign mixed tumor)
- CXPA - Carcinoma ex-adenoma pleomórfico
- c-erbB2 - Receptor de Fator de Crescimento Epidermal Humano tipo 2
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- EGF - Fator de crescimento epidermal
- EGFR - Receptor de fator de crescimento epidermal humano tipo 1 também chamado de c-erbB1e HER1
- FISH - Hibridização fluorescente *in situ* (*Fluorescent in situ hybridization*)
- GAG - Glicosaminoglicanos
- ICB - Instituto de Ciências Biológicas
- IPN - Índice de Prognóstico de Nottingham
- LDH - Desidrogenase láctica
- NCAM – Molécula de adesão de célula neural
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- PA - Adenomas pleomórficos
- PLAG1 – Gene do adenoma pleomórfico 1
- p53 - Proteína codificada pelo gene Tp53 responsável pela integridade do genoma
- p63 – Proteína codificada pelo gene TP63 com papel no desenvolvimento epidérmico
- p73 – Proteína homóloga de p53
- S-100 - Proteína cérebro específica
- TGF- α - Fator de Crescimento Tumoral- α

TGF- β - Fator de Crescimento Tumoral- β

TMA - Tissue microarray

UFBA- Universidade Federal da Bahia

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

WHO - *World Health Organization*

WT- Gene do Tumor de Wilms

n = Número de casos

α -SMA - α -actina de músculo liso

Δ Np63 – Isoforma (sem a porção amino-terminal) da proteína p63

RESUMO

Componentes da matriz extracelular tem sido objeto de estudos na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos no comportamento biológico das neoplasias. Dentre eles, o proteoglicano versican tem merecido destaque. Sua presença tem sido fortemente associada a diferenciação celular, a progressão tumoral, invasão, recidiva e fatores prognósticos. Em cadelas, estudos apontam que os carcinomas em tumores mistos benignos (CBMT), tipo histológico mais frequente nesta espécie, podem servir como modelo para estudo da progressão tumoral. Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar a expressão do proteoglicano versican nas áreas carcinomatosas *in situ* e nas áreas invasoras neste tipo histológico, verificando sua associação com fatores prognósticos clássicos em fêmeas caninas e sobrevida. Além disso, avaliar a expressão de versican e sua relação com a expressão de p63, α -actina de músculo liso (α -SMA), proteoglicano sulfatado e mucopolissacarídeos nas células mioepiteliais, nos seus diversos estágios de diferenciação. Para a primeira proposta foram estudados 49 casos de CBMT nos quais foram feitos estadiamento clínico, a partir de dados obtidos nas fichas clínicas, grau histológico, Índice de Prognóstico de Nottingham (IPN), identificação imuno-histoquímica de versican, p63 e α -SMA para confirmar as áreas de invasão, além de E-caderina e Ki-67. Para a segunda proposta foram elegíveis 39 casos, nos quais foram analisadas as expressões de versican, p63 e α -SMA (imuno-histoquímica), de proteoglicano sulfatado e mucopolissacarídes (histoquímica). A imunorreatividade para versican revelou-se menos intensa adjacente às regiões carcinomatosas *in situ* quando comparado às de invasão, onde foram observadas áreas mais extensas de forte expressão ($p < 0.0001$). Na avaliação das células mioepiteliais nas áreas benignas foram observadas diferenças significativas entre a expressão de versican e α -SMA nas células normais ($p < 0.0001$), poligonais ($p < 0.0001$), estreladas ($p = 0.0013$), assim como na matriz mixóide ($p < 0.0001$) e pré-condróide ($p < 0.0001$). E ainda, diferenças também foram observadas entre a reatividade de p63 e versican pelas células mioepiteliais fusiformes ($p = 0.0029$), na área mixóide ($p = 0.0174$) e pré-condróide ($p = 0.0156$). Estes resultados sugerem que à medida que o mioepitélio adquire características mesenquimais ocorre uma diminuição na expressão das moléculas de p63 e alfa-actina e aumento da expressão da versican. Além disso, a relação direta entre versican e invasividade sugere o papel desta molécula na progressão destes tumores.

Palavras-chaves: Versican, invasão, tumor misto, carcinoma, glândula mamária, cadela.

ABSTRACT

Components of the extracellular matrix have been studied with the attempt to elucidate mechanisms involved in the biological behavior of tumors. Among them, the proteoglycan versican deserves highlight. Its presence has been strongly associated to cancer development, cellular differentiation and progression. Carcinomas in benign mixed tumors (CBMT) are the most common malignant tumor in female dogs and may serve as a model for studies on tumor progression. The aim of this work was to evaluate the expression of versican in *in situ* and invasive carcinomatous areas of CBMT, verifying possible associations with other classic prognostic factors and overall survival. Furthermore, to evaluate the expression of versican, and the relation of versican with the expression of p63, smooth muscle α -actin (α -SMA), proteoglycan sulfate and mucopolysaccharides in myoepithelial cells in their different differentiation stages. Clinical staging, histological grade, Nottingham Prognostic Index (NPI), immunohistochemical staining for versican, E-cadherin, Ki-67 and confirmation of invasion areas with staining for p63 and α -SMA were performed on 49 cases of CBMT for the first proposal. Versican, p63 and α -SMA (immunohistochemical) and proteoglycan sulfate and mucopolysaccharides (histochemical) expression were analyzed in 39 eligible cases for the second proposal. Evaluation of double staining for p63 and α -SMA indicated that myoepithelial cells still found in carcinomas with invasion areas presented weak or loss of staining of at least one marker. Versican immunoreactivity was less intense adjacent to *in situ* carcinomatous regions when compared to invasive regions in which staining was found as more extensive areas with strong expression ($p < 0.0001$). Evaluation of myoepithelial cells in benign areas demonstrated significant differences between the expression of versican and α -SMA in normal ($p < 0.0001$), polygonal ($p < 0.0001$) and stellate-shaped ($p = 0.0013$) myoepithelial cells, as well as in the myxoid ($p < 0.0001$) and immature chondroid ($p < 0.0001$) matrix. Furthermore, differences were also observed between p63 reactivity and versican in spindle-shaped myoepithelial cells ($p = 0.0029$), myxoid ($p = 0.0174$) and immature chondroid areas ($p = 0.0156$). These results suggest that, as the myoepithelium gains mesenchymal characteristics, a decrease in p63 and α -SMA molecule expression and increase in versican expression occurs. In addition direct relation between versican and invasion suggests the role of this molecule in tumor progression.

Keywords: versican, invasion, mixed tumor, carcinoma, mammary gland, canine.

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias são as lesões tumorais mais frequentes na cadela (PELETEIRO, 1994), representando cerca de 52% do total. A taxa de malignidade destes tumores é variável, podendo alcançar até 90% (TORÍBIO, 2008; ESTRELA-LIMA *et al.*, 2010), acometendo principalmente animais em idades mais avançadas (PEREZ-ALENZA *et al.*, 2000).

Os tumores mistos benignos são neoplasias frequentes na mama da cadela e são caracterizados por um componente epitelial (células luminais e mioepiteliais) e componente mesenquimal como cartilagem, ossos e gordura, em combinação com tecido fibroso (CASSALI *et al.*, 2011a).

Dentre os tumores malignos de mama em cadelas, o mais frequente é o carcinoma evoluindo em tumor misto benigno (CASSALI *et al.*, 2009; CASSALI *et al.*, 2011a), que tem origem a partir da transformação maligna do componente epitelial do tumor misto benigno. Esta proliferação carcinomatosa pode apresentar crescimento *in situ* ou infiltrativo, evidenciado pela perda da continuidade das camadas mioepitelial e basal associado à invasão de células neoplásicas no estroma, ou ainda substituir completamente a lesão benigna pré-existente (CASSALI *et al.*, 2011a).

A condição indispensável para invasão estromal é a ruptura da membrana basal e da camada de células mioepiteliais (MAN *et al.*, 2003). Na medicina humana, a avaliação da integridade da camada de células mioepiteliais/basais é uma importante ferramenta no diagnóstico diferencial entre as lesões malignas *in situ* e invasoras (STERNLICHT *et al.*, 1997; YAZIJI *et al.*, 2000). A determinação de focos de invasão dos tumores mamários permite prever o comportamento biológico, já que focos de invasão podem ser associados com metástase e com prognóstico desfavorável, comparado aos dos carcinomas *in situ* (HODA *et al.*, 1999).

Os fatores genéticos que resultam no processo de malignização e invasão ainda são pouco conhecidos. No entanto, a avaliação fenotípica das células mioepiteliais e dos componentes da matriz extracelular tem sido objeto de estudos na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos no comportamento biológico destes tumores (ERDÉLYI *et al.*, 2003).

Entre os componentes de matriz extracelular, o proteoglicano denominado versican tem despertado atenção dos pesquisadores (PUKKILA *et al.*, 2004; YEE *et al.*, 2007). O versican é produzido por células do estroma em diversos tecidos maduros, incluindo músculo liso, cartilagem ou pele (BODE-LESNIEWSKA *et al.*, 1996). No entanto, alguns estudos também sugerem sua participação no desenvolvimento e progressão do câncer (PUKKILA *et al.*, 2004; KODAMA *et al.*, 2007; RICCIARDELLI *et al.*, 2007), uma vez que a maior expressão tem sido frequentemente associada à invasão local e angiogênese em carcinomas de mama na mulher (YEE *et al.*, 2007).

Erdélyi e colaboradores (2005) demonstraram que em tumores mamários caninos o versican é altamente expresso nas células fusiformes em proliferação e em áreas mixóides de tumores mistos. O acúmulo de versican na matriz mixóide está relacionado com a diferenciação precoce dos tumores mioepiteliais em cartilagem. Em estudos prévios, estes mesmos autores observaram maior expressão do versican nas áreas de infiltração (ERDÉLYI *et al.*, 2003). Da mesma forma, Mukaratirwa e Nederbragt, (2002) avaliando a expressão de versican em adenomas e adenocarcinomas de cólon em cães mostraram que sua intensidade era elevada nas áreas de invasão carcinomatosas, indicando o envolvimento deste proteoglicano na progressão tumoral.

Considerando que os carcinomas em tumores mistos benignos podem servir como modelo para estudo da progressão tumoral (FERREIRA *et al.*, 2009), a análise da expressão do proteoglicano versican nestes tumores poderá contribuir para o entendimento do mecanismo de transformação e progressão nos tumores mamários caninos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.2 Tumores mamários em cadela

O estudo dos tumores mamários caninos tem despertado grande interesse dos pesquisadores nas últimas décadas. Este fato pode ser explicado pela semelhança em diversos aspectos com os tumores de mama da mulher (PELETEIRO, 1994; CASSALI, 2000; FONSECA e DALECK, 2000; LAS MULAS e REYMUNDO, 2000; UVA *et al.*, 2009) e pela alta frequência desta patologia na rotina clínica dos animais de companhia.

Neoplasias na glândula mamária são comumente diagnosticadas (PELETEIRO, 1994), representando cerca de 52% de todas as neoplasias na fêmea canina. Em média, 50% dos tumores mamários apresentam comportamento maligno (MORRISON, 1998; CASSALI, 2000; QUEIROGA e LOPES, 2002a; DE NARDI, 2007; CASSALI *et al.*, 2009), entretanto, essa frequência pode alcançar até 90,9% (TORÍBIO, 2008). A proporção entre tumores mamários benignos e malignos pode variar de 3:7 ou 4:6 (MISDORP *et al.*, 1999).

A frequência de aparecimento do câncer de mama nas cadelas aumenta significativamente com a idade, observando-se maior susceptibilidade na faixa etária entre sete e 11 anos de idade, com rara ocorrência em animais com idade inferior a dois anos (MITCHELL *et al.*, 1974; MOULTON, 1990; PELETEIRO, 1994). Cães machos raramente são acometidos (BENJAMIN *et al.*, 1999; MISDORP *et al.*, 1999; DE NARDI *et al.*, 2002).

A princípio, não existe predisposição racial para o desenvolvimento de tumores mamários na cadela (PELETEIRO, 1994; DALECK *et al.*, 1998; CAVALCANTI e CASSALI, 2006). Contudo, alguns estudos indicam as raças Poodle, Dachshund, Pointers e Retrievers, além dos animais racialmente indefinidos como os mais frequentes (MISDORP, 2002; CAVALCANTI, 2006; LANA *et al.*, 2007; TORÍBIO, 2008; LAVALLE *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2009).

Macroscopicamente, as neoplasias mamárias comumente apresentam-se como nódulos circunscritos de variados tamanhos e consistência firme, detectáveis ao exame clínico. Muitas vezes estas formações são múltiplas, localizando-se em mamas distintas ou em uma mesma mama, podendo apresentar tipos histológicos variados (MITCHELL *et al.*, 1974; KURZMAN

e GILBERTSON, 1986; MISDORP, 2002). Nestes casos deve-se considerar o nódulo de pior prognóstico a fim de se avaliar o curso clínico da doença (CAVALCANTI e CASSALI, 2006). Dentre os cinco pares de mama da cadela, as glândulas inguinais, abdominais caudais e craniais são, respectivamente, os mais frequentes sítios de desenvolvimento tumoral (MOULTON *et al.*, 1970; CAVALCANTI, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2009).

O tumor de mama apresenta características complexas, com manifestações clínicas diversas e etiologia multifatorial (STEWART e HEPPNER, 1997), envolvendo a participação de fatores genéticos (predisposição hereditária), ambientais (carcinógenos químicos), infecciosos (vírus), nutricionais (obesidade), mas principalmente hormonais, sendo considerada uma neoplasia hormônio-dependente (SILVA *et al.*, 2004).

O conhecimento dos fatores prognósticos é de fundamental importância na determinação dos programas terapêuticos para pacientes com câncer de mama, visto que permite a aplicação de diferentes modalidades terapêuticas utilizadas no câncer de mama, com intensidade e efetividades adequadas e individualizadas (ABREU e KOIFMAN, 2002). O fator prognóstico pode ser definido como sendo uma ou várias características clínicas, patológicas e biológicas dos indivíduos e de seus tumores que permitem prever a evolução clínica e o tempo de sobrevivência do paciente, sem que o mesmo tenha sido submetido a terapias adicionais e adjuvantes após a cirurgia inicial (CAVALCANTI, 2006). A habilidade em definir subpopulações de cães com distintos tempos de sobrevivência facilita na definição do prognóstico e na escolha da terapêutica a ser adotada (KURZMAN e GILBERTSON, 1986).

Dentre os fatores prognósticos, o estadiamento clínico tem grande relevância para entendimento do comportamento biológico do tumor, possibilitando definir a extensão do processo tumoral, sendo estabelecido antes de se proceder qualquer terapêutica (QUEIROGA e LOPES, 2002b; CASSALI *et al.*, 2011a). Consiste na divisão dos casos em grupos por grau de extensão da doença. Proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e aplicado apenas aos carcinomas, o sistema TNM de classificação adaptado para tumores mamários da cadela é baseado no tamanho da lesão primária (T); na extensão de sua disseminação para linfonodos regionais (N) e na presença ou ausência de metástases à distância (M)(Anexo 1) (OWEN, 1980).

Tumores malignos da glândula mamária têm capacidade de disseminação para órgãos à distância. Entretanto, o risco e o padrão metastáticos são influenciados principalmente pelo tipo histológico e grau de malignidade (CAVALCANTI, 2006). Os principais órgãos acometidos são os linfonodos regionais e pulmão, atingidos por via linfática ou por via hematogena (PELETEIRO, 1994; QUEIROGA e LOPES, 2002b). Outros sítios também podem ser alvos de metástase, como o fígado, ossos, útero, bexiga, sistema nervoso central, pleura e miocárdio (MOULTON *et al.*, 1970; CASSALI *et al.*, 1999; NOWAK *et al.*, 2007).

Os métodos de classificação dos tumores mamários caninos variam consideravelmente, tornando difícil a comparação entre estudos a respeito das características biológicas de neoplasias malignas (BENJAMIN *et al.*, 1999; SARLI *et al.*, 2002). Várias classificações têm sido propostas, mas a publicada por Misdorp *et al.* (1999) pela AFIP (*Armed Forces Institute of Pathology*), atualmente tem sido a mais utilizada. Recentemente, um consenso para tumores mamários caninos foi proposto por Cassali *et al.* (2011a), o qual contempla uma classificação mais abrangente adotando novos subtipos não descritos por Misdorp *et al.* (1999), a exemplo das lesões não neoplásicas e os carcinomas micropapilares (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação histológica das neoplasias mamárias caninas. Cassali *et al.*, 2011a modificado de Misdorp *et al.*, 1999.

<u>Lesões epiteliais não-neoplásicas</u>
Hiperplasias epiteliais
Hiperplasias ductais
Hiperplasias lobulares
Adenose
Lesões de células colunares
Alteração de células colunares
Hiperplasia de células colunares
Lesões de celas colunares atípicas
<u>Tumores benignos</u>
Adenoma
Adenoma complexo ou adenomioepitelioma
Adenoma basalóide
Fibroadenoma
Tumor misto benigno
Papiloma ductal
<u>Tumores Malignos</u>
Carcinomas
Carcinomas <i>in situ</i>
Carcinoma ductal <i>in situ</i>

Carcinoma lobular <i>in situ</i>
Carcinoma em tumor misto
Carcinoma complexo ou adenomioepitelioma maligno
Carcinoma papilar
Carcinoma tubular
Carcinoma sólido
Carcinomas tipos especiais
Carcinoma micropapilar
Carcinoma lobular invasivo
Carcinoma lobular pleomórfico
Carcinoma secretor
Carcinoma mucinoso
Carcinoma rico em lípidos
Carcinoma de células escamosas
Carcinoma de células fusiformes
Carcinoma anaplásico
Neoplasia mamária com diferenciação sebácea
Sarcomas
Fibrossarcoma
Osteossarcoma
Carcinossarcoma
Sarcoma em tumor misto
Outros sarcomas
Condrossarcoma puro
Lipossarcoma
Hemangiossarcoma

Fonte: CASSALI *et al.*, 2011a.

Nas neoplasias mamárias, a graduação histológica tem o objetivo de avaliar a arquitetura das células neoplásicas e suas variações morfológicas, refletindo diferenças em relação ao tumor original. Desta forma, o grau apresenta significativa correlação com agressividade tumoral (KURZMAN e GILBERTSON, 1986; ESTON e ELLIS, 1991). Recentemente, vários trabalhos tem adotado o critério para graduação histológica proposto por Nottingham. Seus resultados revelam significativa correlação entre grau e fatores prognósticos como tipo histológico e sobrevida (KURZMAN e GILBERTSON, 1986; DUTRA *et al.*, 2004; DUTRA *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2009; ESTRELA-LIMA *et al.*, 2010).

Atualmente, os oncologistas veterinários buscam conhecer não somente a variante histológica do tumor, mas também outros fatores prognósticos e preditivos que possam ser incorporados à rotina (CASSALI, 2000; FERREIRA *et al.*, 2009). Marcadores imuno-histoquímicos como o receptor de estrógeno e/ou progesterona, ki-67 (índice proliferativo do tumor), E-caderina e β -catenina (as moléculas de adesão), Ciclooxygenase-2 (inflamação), CD31 (angiogênese), p53,

c-erbB2, BRCA-1 e BRCA-2, além das caspases são estudados nos tumores mamários caninos (SCHMITT, 1994; SCHMITT, 1999; CASSALI, 2000; CAVALCANTI e CASSALI, 2006; DE NARDI, 2007; GAMA *et al.*, 2008; LAVALLE *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2009).

A identificação de marcadores sorológicos poderá ter grande valor na clínica veterinária. O monitoramento de pacientes em estágio avançado da doença, a partir da mensuração de marcadores como Ca15.3 e CEA e enzimas como LDH podem ter grande valia na determinação do prognóstico (CAMPOS, 2010). Além disso, o estudo da resposta inflamatória associada ao tumor também é outro fator importante envolvido na agressividade tumoral. A análise imunofenotípica de leucócitos circulantes e intratumorais podem representar importantes biomarcadores (ESTRELA-LIMA *et al.*, 2010; ESTRELA-LIMA *et al.*, 2012). Dessa forma, marcadores séricos assim como inflamatórios podem contribuir como ferramentas no monitoramento do curso clínico e sobrevida de cadelas portadoras de carcinoma mamário.

Pesquisas no campo da biologia molecular têm avançado e novas técnicas baseadas na expressão gênica tem sido utilizadas na classificação de tumores e avaliação prognóstica do desenvolvimento neoplásico, dentre elas a hibridização fluorescente *in situ* (FISH), hibridização cromogênica *in situ* (CISH), Mamma Print, Oncotype e H/I, técnicas de microarranjos de cDNA (CASSALI *et al.*, 2008; CRUSCO *et al.*, 2008) ou tecidual (tissue microarray, TMA) e ainda análise de DNA mitocondrial, utilizadas na detecção de pequenas mutações (CASSALI *et al.*, 2008; BERTAGNOLI *et al.*, 2009). Análise de DNA por citometria de fluxo também tem sido estudada na Medicina Veterinária, o que permite identificar grupos de risco e, por sua vez, determinar uma melhor conduta terapêutica, podendo futuramente ser referido como índice prognóstico (CASSALI *et al.*, 2007; CASSALI *et al.*, 2011a).

2.2 Tumores mistos benignos

Os tumores mistos benignos são neoplasias frequentes na mama da cadela e representam, de acordo com o atual sistema de classificação veterinária, de 40 a 50% dos tumores benignos

nesta espécie (CASSALI *et al.*, 2009). Em média, acometem cadelas de oito anos, variando entre três e 14 anos (GENELHU *et al.*, 2007; BERTAGNOLLI *et al.*, 2011).

Histologicamente, são caracterizados por um padrão complexo constituído por componente epitelial (células luminais e mioepiteliais) e componente mesenquimal como cartilagem, osso e gordura, em combinação com tecido fibroso (MISDORP *et al.*, 1999). O carcinoma evoluindo em tumor misto benigno surge da transformação maligna epitelial em tumores mistos benignos (MISDORP *et al.*, 1999). Em alguns casos de tumores mistos benignos e carcinomas em tumores mistos a formação óssea está associada à presença de medula óssea (HELLMÉN, 2005), caracterizando uma metaplasia mielóide (GRANDI *et al.*, 2010; AULER *et al.*, 2011). Dados recentes apontam que cerca de 4% dos tumores mistos apresentam esta característica (AULER *et al.*, 2011).

Em humanos, os tumores mistos benignos mamários são pouco frequentes, no entanto comumente diagnosticados nas glândulas salivares, onde são denominados tumores mistos ou adenomas pleomórficos (VOZ *et al.*, 2000). Estes também podem sofrer transformação maligna originando carcinomas ex-adenomas pleomórficos (MOULTON *et al.*, 1970; LEWIS *et al.*, 2001). Nas duas espécies fatores como tempo de crescimento e a recorrência apresentam relação com malignidade (MOULTON *et al.*, 1970; AUCLAIR e ELLIS, 1996; LEWIS *et al.*, 2001; FOWLER *et al.*, 2006). Ainda, similaridades na expressão de algumas moléculas como citoqueratinas, p63, vimentina, β -catenina e E-caderina e a mesma faixa etária de acometimento das lesões benignas e malignas sugerem patogênese semelhante destes tumores (GENELHU *et al.*, 2007).

2.2.1 Histogênese

Em tumores mistos caninos, assim como nos adenomas pleomórficos, a formação da matriz mixóide é constituída pela proliferação de células fusiformes, possivelmente de origem mioepitelial e por substância mixomatosa, além de matriz cartilaginosa e/ou óssea (MISDORP *et al.*, 1999; ERDÉLYI *et al.*, 2005). A histogênese dos elementos mesenquimais ainda permanece controversa (GAMA *et al.*, 2003; HELLMÉN, 2005).

Na década de 40, Allen (1940) descreveu quatro casos de tumores mistos mamários caninos e propôs, a partir de observações morfológicas, que a origem cartilaginosa destas neoplasias provavelmente seria derivada de componente epitelial. Segundo o autor, este processo seria similar ao que ocorria nos tumores mistos de glândula salivar em humanos. Em 1944, uma segunda teoria sugerida por Huggins e Moulder, anos depois reafirmada por Palmer e Monlux (1979), defende que a frequente presença de osso nos tumores mamário caninos seria proveniente de estimulação osteogênica do próprio tecido conjuntivo. Atualmente a hipótese mais aceita foi sugerida por Cotchin (1958) e posteriormente defendida por Moulton *et al.* (1970) e Pulley (1973), os quais supõe uma origem mioepitelial para os componentes mesenquimais (DESTEXHE *et al.*, 1993; GÄRTNER *et al.*, 1999; GAMA *et al.*, 2003; RAMALHO *et al.*, 2006). Outros pesquisadores acreditam ainda que as células-tronco sejam as responsáveis por esta transformação (PRIOSOERYANTO *et al.*, 1995; HELLMÉN *et al.*, 2000).

Alterações na expressão de proteínas constituintes das células mioepiteliais apontam a participação do mioepitélio na formação dos tumores mistos mamários caninos. À medida que estas células se transformam, ocorrem perdas na expressão de citoqueratinas, p63, α -SMA, S100 e maspin (GÄRTNER *et al.*, 1999; GAMA *et al.*, 2003; LOS MONTEROS *et al.*, 2005; RAMALHO *et al.*, 2006; BERTAGNOLLI *et al.*, 2009) e conservação do fenótipo mesenquimal, confirmado pela presença de vimentina e S100 nas reações imuno-histoquímicas (DESTEXHE *et al.*, 1993; GÄRTNER *et al.*, 1999; GAMA *et al.*, 2003).

Além disso, estudos avaliando a expressão de proteínas envolvidas na condrogênese reforçam esta hipótese. Calponina (LOS MONTEROS *et al.*, 2002), tubulina-b II (ARAI *et al.*, 2003), versican e agrecan (ERDÉLYI *et al.*, 2003; ERDÉLYI *et al.*, 2005), colágenos (ARAI *et al.*, 1989; ARAI *et al.*, 1995; ERDÉLYI *et al.*, 2005), neoepítipo 3B3 (HINRICHS *et al.*, 1999), proteína morfogênica óssea do tipo 6 e seus receptores (BMP-6, TATEYAMA *et al.*, 2001, AKYOSHI *et al.*, 2004; KAWABATA *et al.*, 2005) e condromodulina-1 (ChM -1, KAWABATA *et al.*, 2005) são expressas pelas áreas de proliferação mioepitelial e/ou condrocitos e parecem ter participação na formação cartilaginosa. Além disso, moléculas envolvidas na adesão célula-matrix extracelular, como tenascina, fibronectina e NCAM, contribuem aparentemente na diferenciação do mioepitélio (ARAI *et al.*, 1994).

HELLMÉN (2005) aborda de forma simplificada três teorias a respeito da origem clonal dos componentes epiteliais e mesenquimais dos tumores mamários caninos: a primeira delas, a teoria da colisão defende que estes tumores sejam independentes e tenha origem biclonal; a segunda, a teoria da combinação se baseia na origem monoclonal para as diferentes células tumorais, originadas de uma célula tronco/ progenitora multipotente (FOWLER *et al.*, 2006); por fim, mudanças fenotípicas em células mioepiteliais/basais caracterizando uma transdiferenciação destas células definem a teoria da conversão ou metaplasia.

Estudos sobre o conteúdo do DNA em tumores mistos mostram similaridades entre os componentes epitelial e mesenquimal reforçando o papel das células mioepiteliais na metaplasia mesenquimal e a possibilidade de uma origem comum para ambos os componentes a partir de uma célula totipotente com capacidade de diferenciação divergente. NIETO *et al.* (2003) identificaram a expressão imuno-histoquímica de BRCA, uma proteína envolvida com a regulação das células-tronco, para os componentes de tumores mistos benignos. Posteriormente, Bertagnolli *et al.* (2009) mostraram que estes componentes apresentam similaridades no perfil de polimorfismos e mutações encontradas na fita de DNA mitocondrial, supondo, assim como GÄRTNER *et al.* (1999), NIETO *et al.* (2003) e CASSALI *et al.* (2011b) uma origem monoclonal para ambos elementos.

Recente avanço na pesquisa de células-tronco foi dado por pesquisadores ao confirmarem a presença destas células em linhagem estabelecida a partir de tumor misto mamário canino. Esta evidência suporta a ideia que células tumorais mamárias caninas apresentam uma população de células tronco cancerígenas ou com potencial cancerígeno (FERLETTA *et al.*, 2011).

2.3 Carcinomas em tumores mistos benignos

Segundo Misdorp *et al.* (1999), carcinomas em tumores mistos são provenientes da transformação maligna do componente epitelial de tumores mistos benignos. Em cadelas, estes tumores representam cerca de 42% das neoplasias malignas (CASSALI *et al.*, 2009) podendo alcançar o percentual de 56,7% segundo achados de Toríbio (2008).

Anteriormente, carcinomas em tumores mistos benignos eram designados tumores mistos malignos, entretanto esta denominação era motivo de confusão uma vez que carcinossarcomas também eram considerados sinônimos (HAMPE e MISDORP, 1974). Este último tipo histológico apresenta malignidade nos componentes epitelial e mesenquimal, diferente do carcinoma em tumor misto benigno em que somente células epiteliais são malignas (MISDORP *et al.*, 1999). Devido à distinção histológica, Misdorp *et al.* (1999) propôs que o termo tumor misto maligno fosse extinto e substituído por carcinoma em tumor misto benigno, atualmente o mais utilizado.

Na espécie humana, o carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CXPA) compreende aproximadamente 3,6% de todos os tumores de glândula salivar e cerca 12% de todas as neoplasias malignas de mesma localização (GNEPP *et al.*, 2005). Em geral, apresentam caráter agressivo e, assim como em caninos, o carcinoma ex-adenoma pleomórfico resulta da malignização do componente epitelial nos adenomas pleomórficos (PA) (MISDORP *et al.*, 1999; FOWLER *et al.*, 2006; KATORI *et al.*, 2007).

O carcinoma em tumor misto benigno e o carcinoma ex-adenoma pleomórfico, assim como suas contrapartes benignas, tumor misto benigno e adenoma pleomórfico respectivamente, apresentam diversas similaridades. Todos são derivados de glândulas exócrinas, as quais apresentam semelhanças arquiteturais. Além disso, são caracterizados histologicamente pela proliferação de elementos mesenquimais, mioepiteliais e epiteliais. Este último componente pode sofrer malignização seja pela longa evolução da neoplasia, seja pela recorrência (MOULTON *et al.*, 1970; GNEPP *et al.*, 2005; LEONETTI *et al.*, 2005; GENELHU *et al.*, 2007).

Similaridades clínicas, histopatológicas e antigênicas (para citoqueratinas, vimentina, β -catenina e E-caderina) entre tumores mistos de glândula salivar humana e de glândula mamária canina foram observadas (GENELHU *et al.*, 2007). Em um estudo, Genelhu e colaboradores (2007) sugerem uma histogênese semelhante para estas neoplasias e propõe o uso dos tumores mamários caninos como modelo de estudo para tumores mistos de glândula salivar humana. Contudo, os mecanismos moleculares envolvidos neste processo de transformação maligna de ambos os tipos histológicos ainda são incertos (BERTAGNOLLI *et al.*, 2011; HU *et al.*, 2011).

Segundo a literatura, carcinomas ex-adenomas pleomórficos representam um modelo para investigação de eventos genéticos relacionados à transformação maligna em tumores de glândula salivar (EL-NAGGAR *et al.*, 2000; ALTEMANI *et al.*, 2005; MATSUBAYASHI e YOSHIHARA, 2007). Fatores como mudanças em certas regiões cromossômicas podem constituir eventos precoces no desenvolvimento destas neoplasias ou estar associadas à transformação maligna e caráter agressivo (EL-NAGGAR *et al.*, 2000). Schache *et al.* (2010) realizaram pela primeira vez um estudo comparativo entre CXPA e PA no qual foi avaliada a metilação de DNA de genes supressores tumorais. Diferenças entre os dois tipos tumorais na metilação de genes como hTERT, WT1, RASSF1 e p16INK4A, demonstraram ser um valor preditivo positivo para malignidade.

O marcador WT1, além de seu valor na malignização dos PAs, tem sido proposto no estudo da histogênese mioepitelial nos tumores de glândula salivar. Esta proteína está aparentemente envolvida na transição epitélio-mesenquimal de adenomas pleomórficos, apresentando duplo papel no desenvolvimento destes tumores (LANGMAN *et al.*, 2010).

Outros fatores como mutações no gene p53 (LEWIS *et al.*, 2001), metilação do gene promotor de p16 (HU *et al.*, 2011), translocações e perda de heterozigose em genes como PLAG1 (ASTRÖM *et al.*, 1999) e HMG1C (RÖIJER *et al.*, 2002) também tem sido relacionadas a transformação maligna dos adenomas pleomórficos.

A superexpressão de proteínas como receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR), fator de crescimento tumoral- α (TGF- α), receptor de andrógeno e Ki-67 estão relacionados a eventos precoces em carcinomas-ex-adenomas pleomórficos (MATSUBAYASHI e YOSHIHARA, 2007; KATORI *et al.*, 2007). Além disso, a perda da expressão de c-kit nas áreas carcinomatosas de CXPA, sem aparente alteração na expressão do componente benigno, sugere o papel desta molécula na transformação destes tumores (KIM *et al.*, 2011).

O microambiente tumoral também pode estar ativamente envolvido na transição de PA para CXPA (ARAÚJO *et al.*, 2009). Análises por imuno-histoquímica tem demonstrado que o contato entre células tumorais e colágeno fibrilar tipo I, particularmente nas áreas invasoras pode estar associado com redução de E-caderina e β -catenina e com caráter invasivo dos CXPA (ARAÚJO *et al.*, 2009). Supõe-se ainda que proteínas da matriz extracelular, como

laminina e colágeno IV, assim como deposição de tenascina estejam relacionadas à malignização (FÉLIX *et al.*, 2004).

Apesar da alta frequência dos carcinomas em tumores mistos benignos e das suas similaridades com os carcinomas ex-adenomas pleomórficos, ainda existem poucos estudos a respeito da progressão maligna das neoplasias caninas (BERTAGNOLLI *et al.*, 2011). Na década de 70, Moulton e colaboradores já levantavam a hipótese de que se os tumores mistos tivessem tempo suficiente para crescer, poderiam sofrer malignização (MOULTON *et al.*, 1970). Tempos depois, Genelhu *et al.* (2007) e posteriormente Bertagnolli *et al.* (2009) observaram alterações de proteínas que podem contribuir para transformação dos tumores mistos benignos, tais como a perda da expressão de p63, Δ Np63, E-caderina e β -catenina.

Uma pesquisa recente revelou que a superexpressão de EGFR pelas células epiteliais malignas pode ser um evento precoce na carcinogênese dos tumores mistos. E ainda, alterações na expressão dessa molécula podem ser cruciais no processo de transformação maligna no componente epitelial deste tipo histológico (BERTAGNOLLI *et al.*, 2011). Diante da escassez de dados na literatura, maiores esforços devem ser direcionados para o estudo dos tumores mistos, na tentativa de se elucidar os mecanismos envolvidos na malignização destes tumores.

2.3.1 Mioepitélio e invasão

Nos carcinomas em tumores mistos benignos, a proliferação carcinomatosa pode apresentar crescimento *in situ* ou infiltrativo, evidenciado pela perda da continuidade das camadas mioepitelial e basal associado à invasão de células neoplásicas no estroma, ou ainda substituir completamente a lesão benigna pré-existente (CASSALI *et al.*, 2011a). Dessa forma, avaliação fenotípica das células mioepiteliais é importante no diagnóstico diferencial entre as lesões.

As células mioepiteliais, nas lesões pré-malignas e carcinomas *in situ*, circundam o arranjo epitelial servindo de barreira (MAN e SANG, 2004) e impedindo a conversão de tumores *in situ* em carcinomas invasivos (GUDJONSSON *et al.*, 2006). Várias evidências sugerem que

células mioepiteliais diferenciadas interrompam a proliferação das células carcinomatosas na mama, induzindo a apoptose (PANDEY *et al.*, 2010).

Uma vez que essa capacidade supressora do mioepitélio depende de sua diferenciação completa, mudanças no seu padrão de expressão podem levar a reversão de sua função. Sendo assim, as células mioepiteliais indiferenciadas podem promover a progressão tumoral ao invés de suprimi-la (ADRIANCE *et al.*, 2005; GUDJONSSON *et al.*, 2006; PANDEY *et al.*, 2010).

A condição indispensável para invasão estromal é a ruptura da membrana basal e da camada de células mioepiteliais (MAN *et al.*, 2003; ADRIANCE *et al.*, 2005). Esta ruptura resulta na liberação de fatores de crescimento, fatores angiogênicos e espécies reativas de oxigênio que causam alterações no microambiente, além de exercerem efeitos sobre as células neoplásicas. Estes estímulos induzem a proliferação celular e aumentam a capacidade invasora das células tumorais (PANDEY *et al.*, 2010).

Na medicina humana, a avaliação da integridade da camada de células mioepiteliais/basais muitas vezes é uma importante ferramenta para diferenciação entre as lesões malignas *in situ*, microinvasoras e invasoras (STERNLICHT *et al.*, 1997; SILVER e TAVASSOLI, 1998; YAZIJI *et al.*, 2000). O uso de anticorpos que identificam proteínas expressas nas células mioepiteliais tais como p63, α -SMA, maspin, S100, calponina e citoqueratinas 5 e 14 têm auxiliado na identificação destas áreas, na espécie humana e na canina (GAMA *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2003; MAN e SANG, 2004; LOS MONTEROS *et al.*, 2005; GENELHU *et al.*, 2006; RAMALHO *et al.*, 2006; BERTAGNOLLI *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2009; PANDEY *et al.*, 2010; SÁNCHEZ-CÉSPEDES *et al.*, 2011).

Bertagnolli *et al.* (2009) observaram em seu estudo que nos carcinomas evoluindo em tumores mistos há uma diminuição na expressão de p63, sugerindo uma perda das células mioepiteliais nestas áreas suportando o caráter invasivo e progressivo desses tumores. Estudos com neoplasias mamárias da mama humana demonstram que próximo às áreas com perda de células mioepiteliais há uma diminuição da expressão de receptores de estrógeno pelas células epiteliais e proteínas supressoras tumorais, como maspin, WT-1 e p73, contribuindo para agressividade e invasão tumoral (MAN *et al.*, 2003; MAN e SANG, 2004; XU *et al.*, 2009).

Contudo, os mecanismos que culminam na interrupção desta camada são pouco elucidados (MAN *et al.*, 2003).

Segundo a literatura, duas teorias são propostas na tentativa de explicar os mecanismos envolvidos na progressão dos carcinomas *in situ* para invasores (PANDEY *et al.*, 2010). A primeira delas supõe que a invasão das células tumorais é resultado da ação proteolítica de enzimas produzidas em excesso pelas células mioepiteliais e células neoplásicas circunjacentes (DUFFY *et al.*, 2000). A segunda teoria, proposta por Man *et al.*, (2003) defende que a interação entre células mioepiteliais danificadas, por anormalidades genéticas inflamação, mutação, trauma local ou outra injúria química/ física leve a ruptura da camada mioepitelial. Moléculas liberadas pelas células lesionadas aumentam a infiltração de leucócitos, que por sua vez secretam enzimas proteolíticas degradantes da membrana basal, e assim criando um microambiente favorável à proliferação e invasão.

A determinação de focos de invasão dos tumores mamários permite prever o comportamento biológico, já que podem ser associados com metástase e com prognóstico desfavorável, comparado aos dos carcinomas *in situ* (HODA *et al.*, 1999). No entanto, ainda permanecem incertos o mecanismo molecular e o papel fisiológico das células mioepiteliais na invasão e metástase tumoral.

2.4 Matrix-extracelular e versican

No processo de desenvolvimento tumoral, a matriz extracelular desempenha o importante papel ao criar um microambiente favorável à invasão (LIOTTA e KOHN, 2001; KISCHEL *et al.*, 2010; CANAVESE *et al.*, 2011). Estas modificações no estroma são reflexos das alterações sofridas pelas células neoplásicas, as quais são capazes de induzir mudanças na matriz através da produção e secreção de citocinas e fatores estimuladores de crescimento (LIOTTA e KOHN, 2001).

Entre os múltiplos componentes da matriz extracelular neoplásica o versican tem posição de destaque. Segundo a literatura, seu papel parece ser confuso e até mesmo contraditório (WU *et al.*, 2005). Todavia, a importância desta molécula deve-se a sua participação na progressão, adesão, proliferação, diferenciação celular e angiogênese (PUKKILA *et al.*, 2004; WU *et al.*,

2004; ZHENG *et al.*, 2004; ERDÉLYI *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2005; YEE *et al.*, 2007; KISCHEL *et al.*, 2010). Versican é um proteoglicano de sulfato de condroitina altamente expresso durante a embriogênese de diversos órgãos e mantém-se presente na matriz de vários tecidos maduros, incluindo músculo liso, cartilagem, coração, vasos sanguíneos, pele e sistema nervoso central (BODE-LESNIEWSKA *et al.*, 1996; WIGHT, 2002; CHOOCHEEP *et al.*, 2010).

Esta proteína contém vários domínios ativos, sendo constituída por um domínio N-terminal (G1), que se liga ao ácido hialurônico (AH), domínio C-terminal (G3) que contém domínios tipo lectina, dois domínios de fator de crescimento epidermal e um domínio regulatório de complemento. O domínio central constituído por duas cadeias de glicosaminoglicanos (GAG) está localizado entre os domínios G1 e G3. Mudanças na transcrição entre estes domínios dão origem a quatro isoformas, conhecidas como v0, v1, v2 e v3. Na matriz extracelular, o versican pode estar associado com várias moléculas incluindo tenascina, fibulina-1, fibrilina, fibronectina, CD44, L-selectina e β 1-integrina (BODE-LESNIEWSKA *et al.*, 1996; ASPBERG *et al.*, 1999; WU *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2005). Normalmente, a interação do versican com elementos da matriz extracelular garante a integridade do tecido e ainda regula a proliferação e diferenciação das células (SHENG *et al.*, 2006).

A expressão das isoformas de versican em tecido humano normal, assim como em tecido neoplásico, tem sido investigada (SHENG *et al.*, 2005; KISCHEL *et al.*, 2010). No entanto informações sobre os níveis de expressão proteica das variantes e quais suas funções em diferentes tecidos e doenças permanecem escassas (KISCHEL *et al.*, 2010). Sabe-se que estas variantes de versican podem atuar realizando a ligação entre moléculas da matriz e célula além de desempenhar um papel central na montagem da matriz pericelular (ERDÉLYI, 2006).

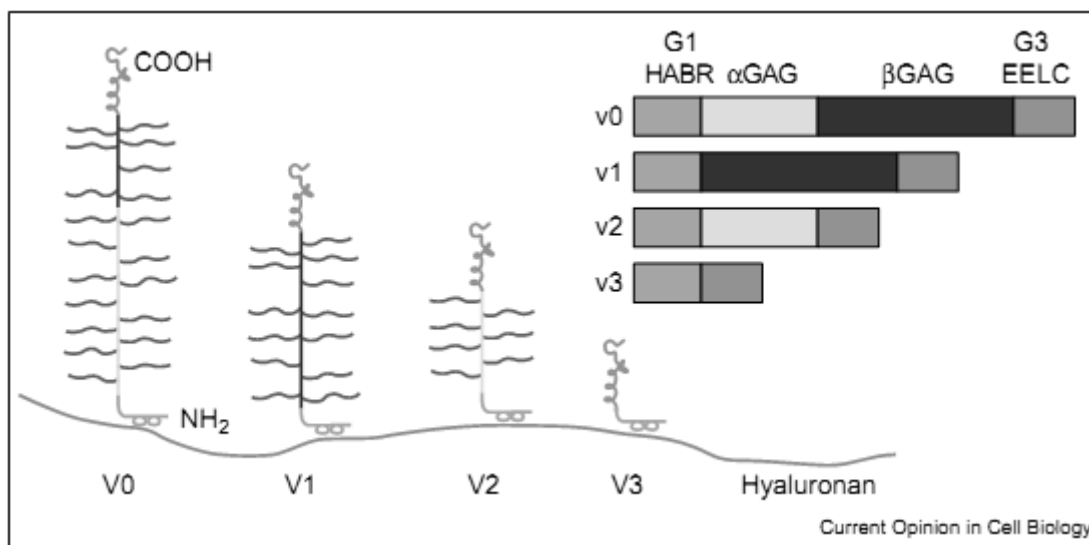


Figura 1. Isoformas de versican

Fonte: Wight, 2002.

Diferenças na estrutura entre as isoformas V1 e V2 indicam que o domínio central de V1, GAG (β), provavelmente está envolvido no aumento da proliferação celular, resistência a apoptose, além de regular a expressão de proteínas da família das caderinas induzindo a epitelização de células fenotipicamente mesenquimais. Em contrapartida a isoforma V2, que possui domínio central GAG (α), é responsável por inibir o efeito proliferativo em modelos experimentais, além de ser questionado seu efeito na transição endotélio-mesenquimal no desenvolvimento de aorta embrionária. Aparentemente, o domínio β é necessário para ativação de EGFR pela isoforma V1, ao contrário do domínio α que atua desregulando este receptor (SHENG *et al.*, 2005; SHENG *et al.*, 2006).

Em um estudo com melanoma, Miquel-Serra *et al.* (2006) observaram que a superexpressão da isoforma V3 apresentava um duplo papel. Por um lado, essa variante é capaz de reduzir a taxa de crescimento do tumor induzindo a apoptose das células, por outro favorece a migração das células no estroma por interação com o ácido hialurônico presente na matriz.

Recentemente, um estudo identificou uma nova isoforma, denominada V4, secretada e regulada por fibroblastos na glândula mamária humana em resposta ao TGF- β 1. A função desta nova variante ainda é incerta, entretanto os níveis de expressão de mRNA e da proteína V4, assim como as outras isoformas, mostraram-se elevados nas lesões mamárias malignas, apontando seu papel no desenvolvimento e progressão tumoral (KISCHEL *et al.*, 2010).

Sendo assim, versican não só apresenta e recruta moléculas para a superfície celular, como também modula a expressão de genes, e coordena complexas vias de sinalização (ERDÉLYI, 2006).

Nos tumores epiteliais malignos, pesquisas evidenciam a estreita relação existente entre a superexpressão de versican e capacidade infiltrativa adquirida pelas células neoplásicas (SUWIWAT *et al.*, 2004; RICCIARDELLI *et al.*, 2007; YEE *et al.*, 2007; SKANDALIS *et al.*, 2011). Esta motilidade é proveniente da ligação do versican com o ácido hialurônico e da interação destes com os receptores de superfície celular CD44 e EGFR, formando um complexo capaz de desencadear mecanismos de sinalização intracelular que regulam a proliferação e migração das células neoplásicas na matriz extracelular (MIQUEL-SERRA *et al.*, 2006; HERNÁNDEZ *et al.*, 2011; WEEN *et al.*, 2011). Ainda, tem sido demonstrado que o domínio C-terminal do versican é capaz de modular a associação de EGFR com a β 1-integrina e regular a proliferação celular (WU *et al.*, 2004). Entretanto, os mecanismos que regulam estas vias de sinalização ainda são pouco elucidados.

Em mulheres com câncer endometrial, os achados demonstram que pacientes que apresentam alta expressão de versican no estroma próximo ao processo neoplásico tem menor taxa de sobrevida (KODAMA *et al.* 2007), sugerindo que a avaliação da expressão de versican nestas lesões podem servir como indicador prognóstico.

Nos carcinomas mamários, a deposição de versican nas áreas adjacentes ao tumor tem sido associada ao grau histológico e pode ser um forte fator preditivo de recidiva em mulheres linfonodo-negativo (SUWIWAT *et al.*, 2004). Além disso, sua maior expressão tem sido frequentemente associada à invasão local e angiogênese em carcinomas de mama na mulher (YEE *et al.*, 2007). Os mecanismos que alteram a expressão deste proteoglicano ainda são pouco elucidados, entretanto seu papel modulando perda de adesão e mobilidade celular também tem sido reconhecido em casos de metástases de câncer de mama (SUWIWAT *et al.*, 2004; YEE *et al.*, 2007).

Dados recentes demonstram que, em mulheres, a presença alterada do versican no estroma pode influenciar a proliferação e crescimento de células neoplásicas através dos domínios G3 e G1, e ainda facilitar a invasão com a superexpressão de V0 e V1 (TAKAHASHI *et al.*, 2011).

Além disso, acentuada expressão deste proteoglicano foi associada com elevada expressão de receptores hormonais, estrógeno e progesterona, pelas células neoplásicas e com alto grau de diferenciação (SKANDALIS *et al.*, 2011).

Trabalhos em cães avaliando a expressão de versican em adenomas e adenocarcinomas de cólon mostraram que sua intensidade aumenta quando associada às áreas de invasão carcinomatosas, indicando que alterações nos níveis deste proteoglicano induzem a progressão tumoral (MUKARATIRWA e NEDERBRAGT, 2002). Erdélyi *et al.* (2003) observaram a expressão aumentada versican nas áreas invasivas de tumores malignos de mama de cadela, indicando o envolvimento deste proteoglicano na invasão de células neoplásicas.

Em tumores mamários caninos, autores reportam o acúmulo de proteoglicanos e sulfato de condroitina, presente tanto no estroma circunjacente às células tumorais, quanto na matriz produzida pelas células mioepiteliais em proliferação (HINRICHS *et al.*, 1999). Sabe-se que o versican representa um dos tipos de proteoglicano sulfatado, como dito anteriormente, e é altamente expresso em células fusiformes em proliferação e em áreas mixóides de tumores mistos (ERDÉLYI *et al.*, 2005). Erdélyi e colaboradores (2005) demonstraram que o acúmulo de versican na matriz mixóide está relacionado com a diferenciação precoce do tecido em cartilagem.

Choocheep *et al.* (2010), ao avaliar o papel desta molécula na formação de tecido cartilaginoso em camundongos, observaram evidências de que o versican é responsável por mediar a sinalização do TGF- β , presente na matriz extracelular, sugerindo sua importância para a condrogênese e morfogênese óssea. Em humanos bem como em cães, os mecanismos pelos quais o proteoglicano versican regula o desenvolvimento cartilaginoso e a formação óssea ainda permanecem incertos.

Deste modo, a pesquisa da presença do proteoglicano sulfatado versican, no estroma ou expresso pelas células mioepiteliais, bem como sua relação com invasividade, fatores clínico-patológicos, e marcadores de adesão e proliferação celular poderá contribuir no entendimento do comportamento biológico dos carcinomas em tumores mistos mamários caninos.

3. HIPÓTESE

Nos carcinomas em tumores mistos mamários caninos existe diferença na expressão do proteoglicano sulfatado versican entre as áreas carcinomatosas *in situ* e invasoras, assim como nos diversos estágios de diferenciação mioepitelial da contraparte benigna destes tumores.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

- Verificar se há associação entre a expressão de versican e a invasão estromal nos carcinomas em tumores mistos mamários caninos;
- Verificar se a expressão de versican diverge nos estágio de diferenciação das células mioepiteliais na contraparte benigna dos carcinomas em tumores mistos mamários caninos.

4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a marcação imuno-histoquímica do proteoglicano sulfatado versican no estroma adjacente às áreas carcinomatosas *in situ* e invasoras de carcinomas em tumores mistos benignos;
- Verificar a associação entre a expressão no estroma de versican e a ruptura da camada basal, avaliada em PAS, e da camada de células mioepiteliais, avaliada com auxílio da dupla-marcação para p63 e α -SMA, nas áreas carcinomatosas *in situ* e invasoras dos carcinomas em tumores mistos benignos;
- Verificar se existe associação entre a expressão de versican no estroma adjacente as áreas de invasão epitelial e o índice de proliferação das células invasoras;
- Verificar a associação da expressão da molécula de adesão E-caderina e versican nas áreas carcinomatosas *in situ* e invasoras;
- Verificar se existe associação entre a expressão de versican no estroma dos carcinomas em tumores mistos e fatores clínico-patológicos, tais como TNM, IPN, metástase, grau histológico e sobrevida das pacientes portadoras das neoplasias;
- Verificar a expressão de versican e sua relação com p63, α -SMA pelas células mioepiteliais nos carcinomas em tumores mistos benignos;

- Correlacionar a presença de proteoglicano sulfatado na contraparte benigna dos carcinomas em tumores mamários mistos por meio da análise histoquímica com Safranina- O e de mucopolissacarídeos pelo Ácido Periódico de Schiff com a expressão do proteoglicano sulfatado versican, p63 e α -SMA pelas células mioepiteliais.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Seleção de casos

Para realização deste estudo foram selecionados 49 casos de carcinomas em tumores mistos disponíveis nos Laboratórios de Patologia Comparada (ICB/UFMG) e Anatomia Patológica (HOSPMEV/UFBA). As amostras destes tumores mamários foram obtidas de cadelas, independente da raça ou idade, submetidas à mastectomia.

5.2. Estadiamento (TNM)

Foi realizado o estadiamento clínico com base no tamanho do tumor (T), envolvimento neoplásico de linfonodos regionais (N) e presença de metástases à distância (M), de acordo com o sistema TNM estabelecido pelo *World Health Organization* (WHO) para tumores mamários caninos (modificado de OWEN, 1980)(Anexo 1). Estes dados foram obtidos das fichas clínico-patológicas de cada animal.

5.3. Histopatologia

A partir dos blocos selecionados, secções histológicas de 4 μ m foram obtidas e coradas pelas técnicas da Hematoxilina-Eosina (LUNA, 1968). Para todos os casos foram confeccionadas duplicatas das lâminas, visando à análise por dois patologistas veterinários e a confirmação do tipo histológico seguiu a padronização do *Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors* (CASSALI *et al.*, 2011a).

Para este estudo foram analisadas todas as áreas de proliferação carcinomatosa *in situ* e invasoras, além das áreas de proliferação mioepitelial presentes na contraparte benigna dos carcinomas em tumores mistos, em pelo menos cinco campos da lâmina.

5.4. Graduação histopatológica

Os tumores foram graduados pelo Sistema de Nottingham (ELSTON e ELLIS, 1998), e os critérios incluíram formação tubular, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica (Anexo 2). As estruturas tubulares foram definidas como aquelas que apresentaram lúmen claro e visível. O escore 1 foi atribuído aos tumores que apresentarem mais de 75% da área carcinomatosa formada por túbulos; escore 2 entre 10% - 75% e escore 3 entre 0 - 10% da área do tumor. Para análise de pleomorfismo nuclear, foi observado tamanho e forma dos núcleos das células epiteliais normais adjacentes ao tumor, sendo utilizado como parâmetro. Escore 1 foi atribuído para núcleos pequenos e regulares e cromatina uniforme. Quando os núcleos apresentaram-se de tamanho aumentado e com variabilidade foi dado escore 2. A presença de células com acentuado pleomorfismo, com grande variação no tamanho e forma do núcleo, apresentando ainda núcleos bizarros e vesiculosos, com múltiplos nucléolos caracterizaram o escore 3. A contagem mitótica foi realizada por dois observadores de forma individualizada, sendo o resultado final obtido a partir da média dos valores. Foi utilizado o microscópio BX-41 com ocular de 10x e objetiva de 40x. Este equipamento fornece uma área de 0,237 mm visualizada em campo de maior aumento (CGA). As figuras mitóticas foram contadas em 10 CGA, selecionados preferencialmente na periferia do tumor onde se observa maior atividade de proliferação celular (ELSTON e ELLIS, 1991; ELSTON e ELLIS, 1998). O escore foi atribuído de acordo com o número de mitoses detectadas: escore 1 (0-8 mitoses); escore 2 (9-16 mitoses) e escore 3 (acima de 17 mitoses). Núcleos picnóticos ou hiper cromáticos não foram contados uma vez que estas células poderiam estar relacionadas com processos de necrose ou apoptose.

Para a obtenção do grau histológico combinado do tumor, o escore para cada fator foi somado, resultando em um valor total que varia de 3 a 9. O grau tumoral foi alocado baseado nos valores a seguir:

3 – 5 pontos: grau I – baixo grau;

6 – 7 pontos: grau II – grau intermediário;

8 – 9 pontos: grau III – alto grau.

5.5. Índice Prognóstico de Nottingham (IPN)

O Índice Prognóstico de Nottingham (IPN) é utilizado na Medicina Humana a fim de prever a sobrevivência de pacientes com neoplasia mamária primária em que seja possível a exérese cirúrgica (ELSTON e ELLIS, 1998). O prognóstico é considerado pior quanto maior for o IPN (CAVALCANTI, 2006). No presente estudo, este índice foi empregado em todos os casos, sendo calculado segundo o tamanho do nódulo (cm), escore do linfonodo e graduação definido pelo sistema de Nottingham. Desta forma:

$$IPN = 0,2 \times \text{tamanho (cm)} + \text{escore de linfonodos (1-3 de acordo com o estadio)} + \text{grau (I-III)}$$

Os valores de IPN permitiram distribuir os casos em três grupos: < 3,4 (bom prognóstico); 3,41 – 5,4 (prognóstico moderado) e > 5,41 (prognóstico ruim) (ELSTON e ELLIS, 1998).

5.6. Imuno-histoquímica

Para análise imuno-histoquímica, assim como histoquímica, foram avaliadas células mioepiteliais normais (NMEC; localizadas ao redor de ductos e ácinos em repouso ou lactante), células mioepiteliais localizadas entre a membrana basal e o epitélio luminal apresentando morfologia poligonal (proliferativas)(PMEC), células mioepiteliais fusiformes intersticiais (SPMEC), células mioepiteliais estreladas intersticiais (SMEC), células estreladas em áreas de matriz mixóide (MM), condrócitos em cartilagem imatura ou pré-condróide (ICHB) e condrócitos em cartilagem madura (CHB)(ARAI *et al.*, 1995; TATEYAMA *et al.*, 2001; AKIYOSHI *et al.*, 2004; BERTAGNOLLI *et al.*, 2009).

Para avaliar a integridade da camada de células mioepiteliais foi avaliada a dupla expressão imuno-histoquímica de p63 e alfa actina de músculo liso (α -SMA). A camada de células mioepiteliais foi considerada rompida quando houve perda total de imunorreatividade para α -actina e p63 acompanhada de perda de células mioepiteliais resultando em lacunas correspondentes ao espaço correspondente a 3 células (MAN *et al.*, 2003).

Os anticorpos primários utilizados na avaliação imuno-histoquímica estão listados na tabela a seguir:

Tabela 2. Lista de anticorpos

ANTICORPO	CLONE	MARCA	DILUIÇÃO
Versican	12C5	DSHB, Iowa City, IA, US	1:50
P63	4A 4	Neomarkers, Fremont, CA, USA	1:80
Ki-67	Mib-1	Dako, Denmark	1:25
Alfa-actina de músculo liso	1A 4	Dako, Denmark	1:100
E-caderina	4A2C7	Invitrogen, Camarillo, CA, USA	1:60

Para esta técnica, secções de 4µm foram cortadas e coletadas sobre lâminas gelatinizadas. As lâminas foram desparafinadas, reidratadas em uma série de álcoois progressivamente diluídos, e submetidas à recuperação antigênica pelo calor (banho-maria a 95° por 20 minutos) com *Target Retrieval Solution*, pH 6.0, exceto as lâminas destinadas a marcação de versican. Neste caso foi realizada recuperação enzimática com 0.5 U/mL de condroitinase ABC (*Proteus vulgaris*; Sigma Chemicals) em 0.25 M de tampão Tris (pH 8.0) contendo 0.18 M de cloreto de sódio e 0.05% de albumina sérica bovina (BSA), a temperatura de 37 °C durante 1 hora e 30 minutos. Para inibir a atividade da protease, foi utilizada uma solução de 0.25 M de tampão Tris (pH 8.0) contendo 0.1 M 6-amino-n-ácido-capróico e 5 mM de cloridrato de benzamidina por 30 minutos (adaptado de ERDÉLYI *et al.*, 2005). Posteriormente todas as lâminas foram incubadas em peróxido de hidrogênio 3% em metanol para o bloqueio da atividade da peroxidase endógena por 15 minutos. Após o resfriamento, as lâminas foram cobertas com soro normal de coelho a 10% em PBS por 10 minutos. Em seguida incubadas com o anticorpo primário por uma hora a 25° (p63, α-sma, E-caderina, ki-67) ou *overnight* (versican) a 4°C, e na sequência aplicado o método de amplificação biotina-peroxidase com identificação a partir de anticorpo secundário e revelação polimérica (ADVANCE HRP–ready to use–DakoCytomation). Por último, as secções foram expostas ao cromógeno 3,3 – diaminobenzidina 4 HCL e contra-coradas com hematoxilina de Mayer’s. Nas lâminas destinada a dupla-marcação (p63/ α-SMA) foi utilizado o Kit EnVision™ G|2 Doublestain System, Rabbit/Mouse (DAB+/Permanent Red).

Controles negativos foram obtidos pela substituição do anticorpo primário por PBS. Amostras de mama normal foram utilizadas como controle positivo para p63, α -SMA e E-caderina. Como controles positivos para ki-67 e versican foram utilizados um carcinoma de mama com positividade previamente confirmada e um tumor misto com abundante área de matriz mixóide, respectivamente.

5.7. Avaliação imuno-histoquímica

A expressão de versican no estroma das áreas adjacentes a proliferação epitelial maligna *in situ* e invasora foi avaliada de forma semiquantitativa com base no sistema de escore proposto por Skandalis *et al.* (2011), o qual inclui (i) a porcentagem total de tecido positivamente marcado (0-100%), e (ii) a intensidade de marcação para o proteoglicano. De acordo com a escala, (1) é considerado negativo ou fracamente marcado, (2) positivo fraco, (3) positivo moderado e (4) positivo forte. O grau de expressão de versican foi então dado pela multiplicação da porcentagem (0-100%) pela intensidade (1-4). A partir destes resultados foi obtida a média de expressão das áreas invasoras e então dois grupos foram definidos: grupo 1 representado pelos valores abaixo da mediana, considerados de baixa expressão; e grupo 2 representado pelos valores acima da média, ou seja de superexpressão de versican.

A expressão de versican pelas células mioepiteliais foi realizada utilizando o critério qualitativo proposto por Erdélyi *et al.* (2005): (-) ausência de marcação; (+) marcação fraca e; (++) marcação moderada; (+++) marcação forte.

Reatividade para p63 foi indicada pela presença de distinta marcação nuclear, assim como marcação citoplasmática indicou reatividade para α -SMA. Ambos marcadores foram avaliados semiquantitativamente usando o sistema de escore: (-) ausência de marcação; (+) marcação fraca ou <5% das células mioepiteliais positiva; (++) marcação moderada ou entre 5 – 50% das células mioepiteliais; (+++) marcação forte pelas células mioepiteliais (BERTAGNOLLI *et al.*, 2009).

A atividade proliferativa de ki-67 foi determinada pelo percentual de núcleos marcados com MIB-1 entre 1.000 células tumorais (DUTRA *et al.*, 2004).

A avaliação de E-caderina se fez pela presença de marcação na membrana citoplasmática das células epiteliais nas áreas *in situ* e invasoras. A intensidade de marcação foi avaliada de forma semiquantitativa através do seguinte escore: (0) negativo, ausência de expressão; (1) moderado, quando expressão mais fraca que epitélio normal; (2) forte, quando expressão foi semelhante ao epitélio normal (RESTUCCI *et al.*, 1997).

5.8. Histoquímica

Na análise histoquímica, foi usada a coloração de Safranina-O para detectar a presença de proteoglicano sulfatado e sua distribuição (ERDÉLYI *et al.*, 2005). Também foram utilizados em todas as secções colorações em PAS. Esta reação indicou a presença de polissacarídeos presentes na membrana basal e nos vasos sanguíneos, verificando a integridade destas estruturas (BUIJS *et al.*, 2004).

5.9. Análise estatística

Análise estatística foi realizada empregando o programa estatístico Graph Pad Prism v.3 software (San Diego, CA).

Para verificar se as variáveis contínuas (tamanho, idade, IPN, ki-67) diferiram entre os grupos (com alta e baixa expressão de versican), foi utilizado o Teste T (dados paramétricos) e Mann Whitney (dados não paramétricos). Para as variáveis categóricas como metástase para linfonodo, estadiamento, mitose, grau histológico, expressão de α -SMA e p63 foram feitas análises pelo teste exato de Fischer.

A associação da expressão de versican, ki-67, p63, α -SMA e E-caderina entre áreas *in situ* e invasoras foi avaliada pelo teste de Wilcoxon.

A associação da expressão de versican, p63, α -SMA, PAS e safranina-o, pelas células mioepiteliais e pelos condrócitos, foi avaliada pelo teste de Wilcoxon. Para observar a diferença da expressão de versican entre os diferentes estágios da condrogênese, foi realizado o teste de Kruskal Wallis. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0.05$.

Para avaliação do tempo de sobrevida livre da doença foi utilizada a análise da Kaplan Meyer. Pelo teste log-rank os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. O tempo de sobrevida livre da doença foi definido (em dias) como sendo o período entre a exérese cirúrgica do tumor primário e a recorrência local/metástase à distância ou data de óbito do animal que morreu pela doença. Os animais cujo contato foi perdido foram considerados censurados.

5.10. Protocolo - Comitê de Ética em Experimentação Animal

Aprovado pelo CETEA (protocolo 219/09)(Anexo 3).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos e a discussão serão apresentados de forma alternativa, como artigos científicos:

- 1) Artigo 1 foi submetido para o periódico *The Veterinary Journal* e está formatado segundo as normas da revista (Anexo 4).
- 2) Artigo 2 está sendo preparado para submissão.

ARTIGO 1

Versican expression in canine carcinomas in benign mixed tumors: Is there an association with clinical pathological factors, invasion and overall survival?

K.A. Damasceno^a, A.C. Bertagnolli^b, A. Estrela-Lima^c, L.G.R. Ribeiro^c, B.S. Rabelo^a, C.B. Campos^a, A.L.B. Barros^d, G.D. Cassali^{a*}

^a *Department of General Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil*

^b *Fepagro Animal Health - Desidério Finamor Institute of Veterinary Research (IPVDF), Eldorado do Sul, RS, Brazil*

^c *Department of Pathology and Clinics, School of Veterinary Medicine and Zootechnic, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil*

^d *Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmacy, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil*

* Corresponding author: Tel.: +55 31 3409 2891.

Email: cassalig@icb.ufmg.br (G.D. Cassali)

Abstract

Components of the extracellular matrix have been studied with the attempt to elucidate mechanisms involved with biological behavior of tumors. Presence of the proteoglycan versican has been strongly associated to cancer development and progression, however its relationship with clinical pathological factors and overall survival has not been studied in veterinary medicine. Carcinomas in benign mixed tumors (CBMT) are the most common malignant tumor in female dogs and can serve as a model for studies on tumor progression. The aim of this paper was to evaluate the expression of versican in *in situ* and invasive carcinomatous areas of CBMT, verifying possible associations with other classic prognostic factors and overall survival. Clinical staging, histological grade, Nottingham Prognostic Index (NPI), immunohistochemical staining for versican, E-cadherin, Ki-67 and confirmation of invasion areas with staining for p63 and smooth muscle α -actin (α -SMA) were performed on 49 cases of CBMT. Versican immunoreactivity was less intense adjacent to *in situ* carcinomatous regions when compared to invasive regions in which staining was found as more extensive areas with strong expression ($p < 0.0001$). Direct relation between versican and invasion suggests the role of this molecule in tumor progression. Association between the studied proteoglycan and prognostic factors was not observed, indicating that the isolated evaluation of versican does not represent an independent prognostic factor in CBMT in female dogs.

Key-words: Versican, Mixed tumor, Carcinoma, Invasion, Canine

Introduction

Mammary neoplasms are the most common proliferative lesions among female dogs (Peleteiro, 1994), representing around 52% of all neoplasms. The malignant ratio of these tumors is variable and can reach up to 90% (Estrela-Lima *et al.*, 2010). Animals of advanced ages are more commonly affected (Perez-Alenza *et al.*, 2000).

Among canine malignant mammary tumors, carcinomas evolving in a benign mixed tumor are the most common histological type (Cassali, 2009), and they originate from a malignant transformation of the epithelial component of a benign mixed tumor. This carcinomatous proliferation may present *in situ* or infiltrative growth, evidenced by loss in continuity of myoepithelial and basal layers associated with neoplastic cells invasion in the stroma, or with possible substitution of pre-existing benign lesion (Cassali *et al.*, 2011a).

Genetic factors that result in the malignization process are still relatively unknown. However, phenotypical evaluation of myoepithelial cells and extracellular matrix components have been studied in the attempt of clarifying the mechanisms involved in the biological behavior of these tumors (Erdélyi *et al.*, 2003).

Among the extracellular matrix components, the proteoglycan versican has caught the attention of researchers (Pukkila *et al.*, 2004; Yee *et al.*, 2007). Versican is produced by stromal cells within a wide range of mature tissues, including smooth muscles, cartilage, and skin (Bode-Lesniewska *et al.*, 1996). However, some studies also suggest its involvement in cancer development and progression (Pukkila *et al.*, 2004; Kodama *et al.*, 2007; Ricciardelli *et al.*, 2007), since higher expressions has been frequently associated to local invasion and angiogenesis in breast cancer in women (Yee *et al.*, 2007).

Elevated versican expression in peritumoral stromal tissue has been associated to histological grading and may be a strong factor in predicting disease relapse in lymph node-negative breast cancer patients (Suwivat *et al.*, 2004). In addition, its overexpression has been frequently associated with local invasion and angiogenesis in breast cancer in woman (Yee *et al.*, 2007). Mechanisms that alter the expression of this proteoglycan are still poorly understood, however its role modulating loss of adhesion and cell motility has also been recognized in cases of breast cancer metastasis (Suwivat *et al.*, 2004; Yee *et al.*, 2007).

Erdélyi and colleagues (2005) demonstrated that in canine mammary tumors, versican is highly expressed in proliferating fusiform cells and myxoid areas of mixed tumors. Versican accumulation in myoepithelial tumors is related to early differentiation of myxoid matrix to cartilage. In prior studies, these same authors observed an increased versican expression in tumor infiltration areas (Erdélyi *et al.*, 2003). While evaluating versican expression in adenomas and colon adenocarcinomas, Mukaratirwa e Nederbragt (2002) demonstrated that its intensity increased in areas of carcinomatous invasion, indicating the involvement of this proteoglycan in tumor progression. Its relationship with clinical pathological factors and survival has not been studied in veterinary medicine.

Considering that carcinomas in benign mixed tumors can serve as a model for tumor progression studies (Ferreira *et al.*, 2009), the analysis of versican expression in these tumors can contribute towards the understanding of transformation and progression mechanisms in mammary malignant tumors. In this context, the present work aims to evaluate the expression of the proteoglycan versican in *in situ* and invasive carcinomatous areas in canine carcinomas in benign mixed tumors, verifying its association with other classical prognostic factors and overall survival.

Materials and methods

Case selection

To carry out this study, 49 cases of carcinomas in mixed tumors were selected at the Comparative Pathology and Pathological Anatomy Laboratories. Samples of mammary tumors were obtained from female dogs, regardless of breed or age, which had undergone mastectomy.

Histological sections of 4µm were obtained from tumor samples and stained using Hematoxylin-Eosin (HE). In all cases, duplicate slides were prepared and analyzed by two veterinarian pathologists and confirmation of histological type followed standards proposed by the Consensus for Diagnosis, Prognosis, and Treatment of Canine Mammary Tumors (Cassali *et al.*, 2011a) adapted from Misdorp *et al.* (1999).

Clinical staging: TNM

Clinical staging was based on tumor size (T), regional lymph node involvement (N) and presence of distant metastasis (M) and determined according to the TNM staging system, established by the World Health Organization (WHO) for canine mammary tumors (modified by Owen, 1980). Data was obtained from clinical and pathological records of all patients.

Histological grading

Tumors were graded by the Nottingham System (Elston and Ellis, 1998) and criteria included tubular formation, nuclear pleomorphism and mitotic index.

Nottingham Prognostic Index (NPI)

The Nottingham Prognostic Index (NPI) is used in Human Medicine to predict survival of patients with primary mammary neoplasms of which surgical excision is possible (Elston and Ellis, 1998). Prognosis worsens as NPI increases. In the present study, this index was employed in all cases and was calculated according to lymph node size and stage and histologic grade as defined by the Nottingham system. Therefore:

$$NPI = 0.2 \times \text{size (cm)} + \text{lymph nodes stage (1-3)} + \text{histologic grade (I - III)}$$

NPI values allowed cases to be distributed in three groups: < 3.4 (good prognosis); 3.41 – 5.4 (moderate prognosis), and > 5.41 (poor prognosis) (Elston and Ellis, 1998).

Immunohistochemistry

The following monoclonal antibodies were used in the present study: versican (12C5, DSHB, 1:50), p63 (4A 4, Neostains, 1:80), smooth muscle α -actin (α -SMA) (1A 4, Dako, 1:100) and E-cadherin (NCH-38, Dako, 1:60), and ki-67 (Mib-1, Dako, 1:25). Sections of 3 μ m were cut from one representative block of each case and collected onto glass slides. Tissue sections were deparaffined in xylene, subjected to heat-induced antigen retrieval with an antigen retrieval solution (DAKO) at pH 6.0, in a water bath at 98 °C for 20 min, and incubated for 60 minutes at room temperature, except versican. For versican antigen retrieval, chondroitinase ABC (from *Proteus vulgaris*; Sigma Chemicals) digestion was performed at 37 °C for one hour and 30 min with 0.5 U/mL of the enzyme in 0.25 M Tris buffer (pH 8.0) containing 0.18 M sodium chloride and 0.05% bovine serum albumin (BSA). After 0.25 M

Tris buffer (pH 8.0) containing 0.1 M 6-amino-n-caproic-acid and 5 mM benzamidine hydrochloride were used to inhibit protease activity for 30 min (adapted from Erdelyi *et al.*, 2005). Slides were then incubated overnight at 4°C with the monoclonal antibody 12C5. Endogenous peroxidase activity block was performed with 3% hydrogen peroxidase in metanol. A biotin-peroxidase system was used in the immunohistochemical procedure with identification of the secondary antibody by the polymer (ADVANCE HRP–ready to use–DakoCytomation). Diaminobenzidine was used as a chromogen and sections were counterstained with Mayer’s haematoxylin, dehydrated, and mounted in synthetic medium. EnVision™ G|2 Doublestain System Kit, Rabbit/Mouse (DAB+/Permanent Red) was used for the double staining immunohistochemical technique (used to identify p63/ α -SMA).

Negative controls were obtained by omission of primary antibodies. Adjacent normal canine mammary tissue was used as positive control for p63, α -SMA and E-cadherin. Canine mammary tumors previously known to express high levels of Ki-67 and abundant myxoid tissues were, respectively, used as positive controls for Ki-67 and versican.

Immunohistochemical evaluation

Areas of carcinomatous *in situ* and invasive proliferation in carcinomas in mixed tumors were analyzed in at least five fields in this study.

Versican expression was assessed by semiquantitative scoring described by Skandalis *et al.* (2011) which includes (i) the overall percentage of the tissue section stained positive (0-100%), and (ii) the signal intensity (4-point scale) for each proteoglycan. The scoring used for the 4-point scale was: 1, negative or very weak staining; 2, weak positive; 3, moderate positive; 4, strong positive. The semiquantitative immunohistochemical (IHC) score for the expression level for each proteoglycan was provided by the multiplication of the percentage (0-100) of the tissue section staining positive by the factor (1-4) corresponding to the staining intensity of the tissue section.

Areas previously suspected of estromal invasion in HE staining were confirmed through p63 and α -SMA double reaction. Immunoreactivity for p63 and α -SMA was assessed semiquantitatively using a scoring system: (-) no staining, (+) weak or <5% of stained

myoepithelial cells, (++) moderate or between 5 and 50% of stained myoepithelial cells, and (++++) strong or 50% of stained myoepithelial cells (Bertagnolli *et al.*, 2009).

Ki-67 staining was confined to nuclei presenting a diffuse staining pattern. Ki-67 proliferative activity was assessed with an image analysis system, determining the percentage of positive cells among 1,000 tumor cells (proliferation index)(Dutra *et al.*, 2004).

Cases presenting positive E-cadherin membrane staining of neoplastic epithelial cells were considered positive in *in situ* and invasive areas. Immunostaining intensity for E-cadherin was evaluated semi-quantitatively and scored as: 0 = negative, when absent, 1 = moderate, when weaker than in normal epithelium, 2 = strong, when positivity found in tumor cells was equal to normal mammary epithelium (Restucci *et al.*, 1997).

Histochemistry

Periodic Acid Schiff (PAS) staining was performed in all sections. This reaction indicates the presence of polysaccharides in the basal membrane and in blood vessels, verifying the integrity of these structures (Buijs, *et al.*, 2004).

Statistical analysis

To verify if continuous variables (size, age, NPI, Ki-67) in fact differ among groups (with low and high versican expression), T Test was used for parametric data and Mann-Whitney Test for non-parametric data. For categorical variables, such as lymph nodes metastasis, clinical staging, mitosis, histological grade, α -SMA and p63 expression, Fischer's Exact Test was performed.

Association of versican, ki-67, p63, α -SMA and E-cadherin expression between *in situ* and invasive areas were evaluated by the Wilcoxon Test.

Kaplan Meyer analysis (log-rank test) was used to evaluate overall survival. Values were considered statistically significant when $p < 0.05$. Overall survival was defined (in days) as the period between surgical excision of the primary tumor and death of the animal due to the disease. Animals with loss of follow-up or death unrelated to the tumor were considered as censored.

Ethic Aspects

All procedures were performed under the guidelines and with the approval of the Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG), protocol 219/2009.

Results

Clinical and pathologic features

The present study demonstrated higher incidence of the disease among poodles (55.77%), followed by mongrel dogs (9.62%) and doberman pinschers (9.62%). Dogs ages varied from 4.5 to 19 years, with a mean of 10.5 years (4.5-15).

Comparative analyses of the clinical and pathological characteristics among groups are presented in table 1.

Invasion, loss of adhesion, and proliferation index

Evaluation of myoepithelial cell layer integrity was performed through morphological analysis of p63 and α -SMA immunoreactivity (Fig. 1). Invasion was considered when suspicious HE stained areas revealed a total loss of immunoreactivity for α -SMA and p63, denoting loss of myoepithelial cells in gaps corresponding to a three cell space (Man *et al.*, 2003). In addition, rupture of the basal membrane, viewed through PAS staining, associated with the observation of malignant epithelial cells in the adjacent stroma, could also be observed (Fig. 1). These results are represented in table 2.

Double staining evaluation for p63 and α -SMA in carcinomas with invasion areas presented a loss of or weak staining for at least one marker in remaining myoepithelial cells, which differs from what was observed in *in situ* areas where the double expression was notable. A significant difference was observed in p63 and α -SMA expression in *in situ* and invasive areas, with $P < 0.0001$ (Fig. 3).

E-cadherin adhesion molecule expression in *in situ* and invasive areas was evaluated to investigate its possible relation to versican. *In situ* carcinomatous areas revealed strong and diffuse immunoreactivity for the E-cadherin protein, whereas invasive areas showed weak or absent expression (Fig. 3). In groups 1 and 2, a significant difference was observed in the

expression of this molecule in *in situ* and invasive areas, with $P < 0.0001$ (Fig. 3). However, no statistically significant correlation could be observed with versican.

Versican expression in peritumoral stroma

Immunoreactivity for the proteoglycan versican in areas adjacent to *in situ* carcinomatous regions proved to be less intense (median, 140.0) when compared to areas adjacent to invasive regions (median, 280.0), characterized by more extensive areas of strong expression (Fig. 3).

According to the final results of this evaluation, a median versican expression score (280.0) was obtained for invasive areas. Thus, two distinct categories were determined: Group 1, represented by cases with a low versican expression; and Group 2, represented by cases with a versican overexpression. Table 3 presents the results of versican analysis, according to the intensity and percentage of stained areas in both *in situ* and invasive regions.

Survival curves

Considering only versican expression, overall survival was found to be longer in female dogs with low immunostaining for this proteoglycan than in those with high immunostaining; however, no statistically significant difference could be observed ($P = 0.1947$)(Fig. 4).

Overall survival was analyzed in 40 cases. Thirty-two (80%) dogs remained alive, four (10%) dogs died during the study and four (10%) were considered censored due to loss of follow-up and death unrelated to the tumor.

Discussion

Versican is one of the most studied components of the extracellular matrix associated to human breast cancer (Canavese *et al.*, 2011). This proteoglycan is synthesized mainly by stromal cells and presents anti-adhesive properties which interfere in cell motility (Yamagata *et al.*, 1993). This property appears to be related to the association of the proteoglycan and hyaluronic acid, which presents an altered expression in neoplastic conditions (Mukaratirwa *et al.*, 2004).

The most important criteria for invasion diagnosis in mammary carcinomas is the absence of myoepithelial cells surrounding neoplastic proliferations associated with basal

layer rupture (Silver and Tavassoli 1998, Man *et al.*, 2003). Nevertheless, the recognition of these areas based solely on HE staining evaluation can be quite difficult. In this context, p63, α -SMA and PAS staining were implemented to aid the research in invasive regions.

In this study, myoepithelial cells revealed a progressive loss in immunoreactivity for both p63 and α -SMA from *in situ* to invasive areas. In *in situ* areas, flaws in the expression of these molecules suggest that myoepithelial cells have suffered dedifferentiation, no longer expressing important functional and characterization molecules (Adriance *et al.*, 2005; Cavalcante *et al.*, 2007; Bertagnolli *et al.*, 2009). In sites suspected of invasion, absence of staining denotes a flaw in the myoepithelial layer, which, in association with the discontinuity of the basal membrane, confirm the lesion. In this manner, double staining immunohistochemistry proved to be useful in evidencing these areas.

Once areas with infiltration of neoplastic cells in adjacent stroma were confirmed, the presence of versican was evaluated. Its expression differed significantly between *in situ* and invasive areas ($P < 0.0001$), both in cases of low and high versican expression. Upon comparing versican immunoreactivity of *in situ* areas in the two groups, statistical difference ($P = 0.0002$) could also be observed. An extremely significant difference was observed when comparing immunoreactivity in invasive and *in situ* areas ($P < 0.0001$), suggesting a direct relation between versican and invasion.

Canavese *et al.* (2011) analyzed versican expression adjacent to *in situ* and invasive carcinomatous areas in human breast cancer. These researchers believe that mechanisms involved in cell and stroma interaction lead to the development of invasive lesions from *in situ* mammary lesions. In this study, elements typically expressed in the invasive stroma, such as versican, suggests that pre-invasive lesions can acquire some characteristics commonly attributed to invasive areas, contributing with the progression of the neoplastic processes.

Many authors have also shown extracellular matrix components, including the proteoglycan versican, plays a critical role facilitating progression and dissemination of malignant neoplastic cells (Brown *et al.*, 1999; Mukaratirwa and Nederbragt, 2002; Erdélyi *et al.*, 2003; Mukaratirwa *et al.*, 2004; Kodama *et al.*, 2007; Ricciardelli *et al.*, 2007; Skandalis *et al.*, 2011). Mukaratirwa and colleagues (2004) observed a significant correlation between

stromal immunoreactivity intensity for versican and invasion in colorectal carcinomas in dogs, suggesting that this proteoglycan supports tumor progression. They believe that carcinomatous cells which invade the stroma are capable of stimulating fibroblasts to produce versican, which can in turn play a crucial role in tumor progression.

The possible association between versican expression and clinical-pathological factors were evaluated in this study to verify the biological significance and prognostic power of versican. However, no statistical relation was observed between evaluated prognostic factors and high and low versican expression or such factors and *in situ* and invasive areas. These results are justified by the fact that the studied cases are mostly represented by low grade tumors, unaggressive and associated to good prognosis, reflecting a certain sample homogeneity. Furthermore, no association was found between biological factors and immunohistochemical expression of versican in human pharyngeal squamous carcinomas (Pukkila *et al.*, 2004).

Versican has also been related with neoplastic cell adhesion and proliferation (Pukkila *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2004; Erdélyi *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2005; Yee *et al.*, 2007; Kischel *et al.*, 2010). Some studies suggest that an isoform, known as v1, is involved in the increase in cell proliferation, apoptosis resistance and the regulation of the cadherin family protein expression, inducing mesenchymal-epithelial transition (Sheng *et al.*, 2005; Sheng *et al.*, 2006). In this study, no difference regarding proliferation index was observed between low and high versican expression groups. Thus, ki-67 expression did not indicate relation between proteoglycan overexpression and tumoral proliferation in CBMT.

Studies indicating a relation between versican and E-cadherin expression in epithelial tumors are scarce. Thus, one goal of this study was to investigate the association between versican and e-cadherin. However, despite the existence of a significant statistical difference between E-cadherin expression and *in situ* and invasive areas, as was with versican expression, no relation between these molecules was observed in CBMT. This finding probably indicates that versican expression interferes in carcinomatous cell adhesion through other mechanisms not yet understood.

Conclusions

Obtained data reveal that, in carcinomas in benign mixed tumors, versican expression differs significantly within invasive and *in situ* areas, suggesting the role of this molecule in tumor progression. However, no associations between the proteoglycan and prognostic factors could be observed. Therefore, although a direct relation exists between versican and invasiveness, results indicate that isolated evaluation of this proteoglycan does not represent an independent prognostic factor in canine CBMT.

Conflict of interest statement

None of the authors received any financial support or has any personal relationship that could inappropriately influence or bias the content of this article.

Acknowledgements

This research was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq), Fundação de amparo à pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais.

References

- Adriance, M.C., Inman, J.L., Petersen, O.W., Bissell, M.J., 2005. Myoepithelial cells: good fences make good neighbors. *Breast Cancer Research* 7, 190-197.
- Bertagnolli, A.C., Cassali, G.D., Genelhu, M.C.L.S., Costa, F.A., Oliveira, J.F.C., Gonçalves, P.B.D., 2009. Immunohistochemical expression of p63 and Δ Np63 in mixed tumors of canine mammary glands and its relation with p53 expression. *Veterinary Pathology* 46, 407-415.
- Bode-Lesniewska, B., Dours-Zimmermann, M.T., Odermatt, B.F., Briner, J., Heitz, P.U., Zimmermann, D.R., 1996. Distribution of the large aggregating proteoglycan versican in adult human tissues. *Journal Histochemistry & Cytochemistry* 44, 303-312.

- Brown, L.F., Guidi, A.J., Schnitt, S.J., Water, L.V., Iruela-Arispe, M.L., Yeo, T.K., Tognazzi, K., Dvorak, H. F., 1999. Vascular stroma formation in carcinoma *in situ*, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast. *Clinical Cancer Research* 5, 1041–1056.
- Buijs, J.T., Cleton, A.M., Smit, V.T.H.B.M., Löwik, C.W.G.M., Papapoulos, S.E., Van Der Pluijm, G., 2004. Prognostic significance of periodic acid-Schiff-positive patterns in primary breast cancer and its lymph node metastases. *Breast Cancer Research and Treatment* 84, 117–130.
- Canavese, G., Candelaresi, G., Castellano, I., Mano, M.P., 2011. Expression of proteoglycan versican in *in situ* breast lesions: Relations between stromal changes, histotype, and invasion. *Pathology Research and Practice* 207, 97–103.
- Cassali, G.D. ; Melo, B.M. ; Madureira, N. ; Ferreira, E. ; Bertagnolli, A.C. ; Ribeiro, G.M. ; Campos, C.B., 2009. Mammary gland diagnosis of the Laboratory of Comparative Pathology - UFMG, from 2000 to 2008. *Clínica Veterinária (Suppl.)* 14, 173-173.
- Cassali, G.D., Lavalle, G.E., De Nardi, A.B., Ferreira, E., Bertagnolli, A.C., Estrela-Lima, A., Alessi, C.A., Daleck, C.R., Salgado, B.S., Fernandes, C.G., Sobral, R.A., Amorim, R. L., Gamba, C.O., Damasceno, K. A., Auler, P.A., Magalhaes, G.M., Silva, J.O., Raposo, J.B., Ferreira, A.M.R., Oliveira, L.O., Malm, C., Zuccari, D.A.P.C., Tanaka, N.M., Ribeiro, L. R., Campos, L.C., Souza, C.M., Leite, J.S., Soares, L.M.C., Cavalcanti, M.F., Fonteles, Z. G.C., Schuch, I.D., Paniago, J., Oliveira, T.S., Terra, E.M., Castanheira, T.L.L., Felix, A. O.C., Carvalho, G.D., Guim, T.N., Garrido, E., Fernandes, S.C., Maia, F.C.L., Dagli, M.L. Z., Rocha, N.S., Fukumasu, H., Grandi, F., Machado, J.P., Silva, S.M.M.S., Bezerril, J.E., Frehse, M.S., Almeida, E.C.P., Campos, C.B., 2011. Consensus for the diagnosis, prognosis *and* treatment of canine mammary tumours. *Brazilian Journal Veterinary Pathology* 4, 153-180.
- Cavalcante, R.B., Lopes, F.F., Ferreira, A.S., Freitas, R.A., Souza, L.B., 2007. Immunohistochemical expression of vimentin, calponin and HHF-35 in salivary gland tumors. *Brazilian Dental Journal* 18, 192-197.

- Dutra, A.P., Azevedo Júnior, G.M., Schmitt, F.C., Cassali, G.D., 2008. Assessment of cell proliferation and prognostic factors in canine mammary gland tumors. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 60, 1403-1412.
- Elston, C.W., Ellis, I.O. Assessment of histological grade. In:_____ Systemic Pathology. The breast. Third Ed. Churchill Livingstone, London, ENG, 1998, pp. 365-384.
- Erdélyi, I., Nieskens, D.H.M., Dijk, J.E., Vass, L., Nederbragt, H., 2003. Immunohistochemical evaluation of versican, in relation to chondroitin sulphate, in canine mammary tumors. *Histology and histopathology* 18, 1067–1080.
- Erdélyi, I., Van Asten, A.J.A.M., Van Dijk, J.E., Nederbragt, H., 2005. Expression of versican in relation to chondrogenesis-related extracellular matrix components in canine mammary tumors. *Histochemistry and Cell Biology* 124, 139-149.
- Estrela-Lima, A., Araújo, M.S.S., Costa-Neto, J.M., Teixeira-Carvalho, A., Barrouin-Melo, S.M., Cardoso, S.V., Martins-Filho, O.A., Serakides, R., Cassali G.D., 2010. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer* 10, 1-14.
- Ferreira, E., Bertagnolli, A.C., Cavalcanti, M.F., Schmitt, F.C., Cassali, G.D., 2009. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Veterinary Comparative Oncology* 7, 230-235.
- Kischel, P., Waltregny, D., Dumont, B., Turtoi, A., Greffe, Y., Kirsch, S., Pauw, E.D., Castronovo, V., 2010. Versican overexpression in human breast cancer lesions: known and new isoforms for stromal tumor targeting. *International Journal of Cancer* 126, 640–650.
- Kodama, J., Hasengaowa, Kusumoto, T., Seki, N., Matsuo, T., Ojima, Y., Nakamura, K., Hongo, A., Hiramatsu, Y., 2007. Prognostic significance of stromal versican expression in human endometrial cancer. *Annals of Oncology* 18, 269–274.

- Man, Y.G., Tai. L., Barner, R., Vang, R., Saenger, J.S., Shekitka, K.M., Bratthauer, G.L., Wheeler, D.T., Liang, C.Y., Vinh, T.N., Strauss, B.L., 2003. Cell clusters overlying focally disrupted mammary myoepithelial cell layers and adjacent cells within the same duct display different immunohistochemical and genetic features: implications for tumor progression and invasion. *Breast Cancer Research* 5, 231-241.
- Mukaratirwa, S., Nederbragt, H., 2002. Tenascin and proteoglycans: the role of tenascin and proteoglycans in canine tumours. *Research in Veterinary Science* 73, 1-8.
- Mukaratirwa, S., Van Ederen, A.M., Gruys, E., Nederbragt, H., 2004. Versican and hyaluronan expression in canine colonic adenomas and carcinomas: relation to malignancy and depth of tumour invasion. *Journal Comparative Pathology* 131, 259-270.
- Owen L.N., 1980. The TNM Classification of tumors in domestic animals. *World Health Organization*, 26-32.
- Peleteiro, M.C., 1994. Tumores mamários na cadela e na gata. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 89, 509, 10-29.
- Perez-Alenza, M.D., Peña, L., Del Castillo, N., Nieto, A.I., 2000. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *Journal of Small Animal Practice* 41, 287-291.
- Pukkila, M.J., Kosunen, A.S.T., Virtaniemi, J.A., Kumpulainen, E.J., Johansson, R.T., Kellokoski, J.K., Nuutinen, J., Kosma, V.W., 2004. Versican expression in pharyngeal squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *Journal of Clinical Pathology* 57, 735-739.
- Restucci B., Papparella S., De Vigo G., Maiolino P., 1997. E-cadherin expression in normal and neoplastic canine mammary gland. *Journal Comparative Pathology* 116, 191-202.

- Ricciardelli, C., Russell, D.L., Ween, M.P., Mayne, K., Suwivat, S., Byers, S., Marshall, V. R., Tilley, W.D., Horsfall, D.J., 2007. Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix by prostate cancer cells promotes cell motility. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 10814–10825.
- Sheng, W., Wang, G., Wang, Y., Liang, J., Wen, J., Zheng, P.S., Wu, Y., Lee, V., Slingerland, J., Dumont, D., Yang, B.B., 2005. The roles of versican v1 and v2 isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 1330-1340.
- Sheng, W., Wang, G., Pierre, D.P.L., Wen, J., Deng, Z., Wong, C.K.A., Lee, D.Y., Yang, B.B. 2006. Versican Mediates Mesenchymal–Epithelial Transition. *Molecular Biology of the Cell* 17, 2009-2020.
- Silver, S.A., Tavassoli, F.A., 1998. Mammary ductal carcinoma *in situ* with microinvasion. *Cancer* 82, 2382- 2390.
- Skandalis, S.S., Labropoulou, V.T., Ravazoula, P., Likaki-Karatza, E., Dobra, K., Kalofonos, H.P., Karamanos, N.K., Theocharis, A.D., 2011. Versican but not decorin accumulation is related to malignancy in mammographically detected high density and malignant-appearing microcalcifications in non-palpable breast carcinomas. *BMC Cancer* 11, 1-13.
- Suwivat, S. Ricciardelli, C., Tammi, R., Tammi, M., Auvinen, P., Kosma, V.M., LeBaron, R.G., Raymond, W.A., Tilley, W.D., Horsfall, D.J., 2004. Expression of extracellular matrix components versican, chondroitin sulfate, tenascin, and hyaluronan, and their association with disease outcome in node-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research* 10, 2491–2498.
- Wu, Y., Chen, L., Cao, L., Sheng, W., Yan, B.B. 2004. . Overexpression of the C-terminal PG-M/versican domain impairs growth of tumor cells by intervening in the interaction between epidermal growth factor receptor and β 1-integrin. *Journal of Cell Science* 117, 2227-2237.

- Wu, Y.J., La Pierre, D.P., Wu, J., Yee, A.J., Yang, B.B., 2005. The interaction of versican with its binding partners. *Cell Research* 15, 483-494.
- Yamagata, M., Saga, S., Kato, M., Bernfield, M., Kimata, K., 1993. Selective distributions of proteoglycans and their ligands in pericellular matrix of cultured fibroblasts. Implications for their roles in cell-substratum adhesion. *Journal of Cell Science* 106, 55-65.
- Yee, A.J.M., Akens, M., Yang, B.L., Finkelstein, J., Zheng, P.S., Deng, Z., Yang, B., 2007. The effect of versican G3 domain on local breast cancer invasiveness and bony metastasis. *Breast Cancer Research* 9, 1-11.
- Zheng, P.S., Wen, J., Ang, L.C., Sheng, W., Vitoria-Petit, A., Wang, Y., Wu, Y., Kerbel, R.S., Yang, B.B., 2004. Versican/PDGF-M G3 domain promotes tumor growth and angiogenesis. *The FASEB Journal* 18, 754- 756.

Table 1

Association between pathological and clinical status of mammary carcinomas in mixed tumors in female dogs

<i>Parameters</i>	<i>All (n=49)</i>	<i>Group 1 (n=25)</i>	<i>Group 2 (n=24)</i>	<i>P value</i>
<i>Lymph node metastasis</i>	6	3	3	-
<i>Pulmonary metastasis</i>	1	0	1	-
<i>Size</i>				
<i>< 3 cm</i>	28	13	15	
<i>3<x<5</i>	11	6	5	0.3735
<i>≥ 5 cm</i>	10	6	4	
<i>Clinical staging</i>				
<i>I</i>	24	12	12	
<i>II</i>	11	6	5	
<i>III</i>	7	4	3	0.9657
<i>IV</i>	6	3	3	
<i>V</i>	1	0	1	
<i>Histological grade</i>				
<i>I</i>	44	21	23	0.714
<i>II</i>	5	4	1	
<i>III</i>	0	0	0	
<i>NPI</i>				
<i><3.4</i>	46	24	22	
<i>3.41 – 5.4</i>	3	1	2	0.6882
<i>>5.41</i>	0	0	0	

Group 1, represented by cases with a low versican expression; and Group 2, represented by cases with a versican overexpression.

T test was used for parametric data (size and NPI)

Fisher's exact test used for categorical variables (clinical staging and histological grade)

Table 2

Evaluation for PAS and association between immunoreactive for p63, α -SMA, E-cadherin and Ki-67 in groups

	<i>Areas</i>				
	<i>Score</i>	<i>In situ</i>		<i>Invasive</i>	
		<i>Group 1</i>	<i>Group 2</i>	<i>Group 1</i>	<i>Group 2</i>
<i>p63</i>	<i>0</i>	0/20	1/21	12/21	13/21
	<i>1</i>	0/20	3/21	6/21	5/21
	<i>2</i>	7/20	6/21	3/21	3/21
	<i>3</i>	13/20	11/21	0/21	0/21
<i>α-SMA</i>	<i>0</i>	1/20	6/21	13/21	14/21
	<i>1</i>	5/20	5/21	8/21	6/21
	<i>2</i>	4/20	3/21	0/21	1/21
	<i>3</i>	10/20	7/21	0/21	0/21
<i>PAS</i>	<i>0</i>	0/23	0/23	23/23	23/23
	<i>1</i>	23/23	23/23	0/23	0/23
<i>E-cadherin</i>	<i>0</i>	0/24	0/24	17/25	15/24
	<i>1</i>	3/24	7/24	8/25	9/24
	<i>2</i>	21/24	17/24	0/25	0/24
<i>Ki-67</i> (<i>Mean value</i>)		5.6 (22)	8.7 (22)	5.62 (22)	12 (22)

Group 1, represented by cases with a low versican expression; and Group 2, represented by cases with a versican overexpression.

Significant differences at $P < 0.0001$ between in situ and invasive areas in p63, α -SMA, e-cadherin. Wicoxon Test.

Table 3

Versican immunohistochemistry evaluation in *in situ* and invasive areas of mammary carcinomas in benign mixed tumors in female dogs

<i>Areas</i>	<i>Parameters</i>	<i>All</i>	<i>Score</i>	<i>Group 1</i> <i>(n=25)</i>	<i>Group 2</i> <i>(n=24)</i>
<i>In situ</i>	<i>Intensity</i>	49	1	6/25	1/24
			2	15/25	5/24
			3	4/25	14/24
			4	0/25	4/24
	<i>Percentage of the tissue section stained positive (mean)</i>	49		43.24	68.96
<i>Invasive</i>	<i>Intensity</i>	49	1	1/25	0/24
			2	1/25	0/24
			3	17/25	0/24
			4	6/25	24/24
	<i>Percentage of the tissue section stained positive (mean)</i>	49		67.6	88.96
<i>P value</i>				<0.0001	<0.0001

Group 1, represented by cases with a low versican expression; and Group 2, represented by cases with a versican overexpression.

Wilcoxon Test

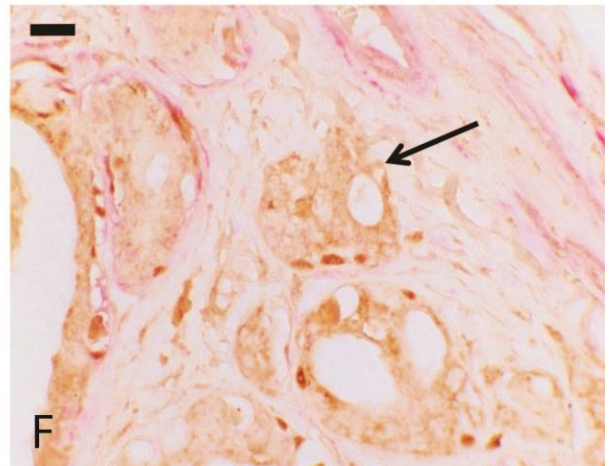
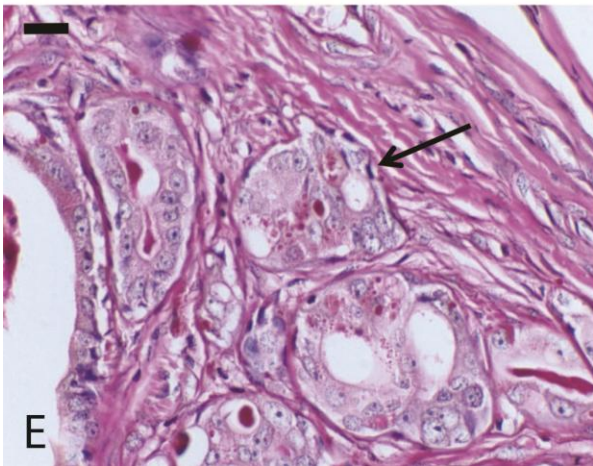
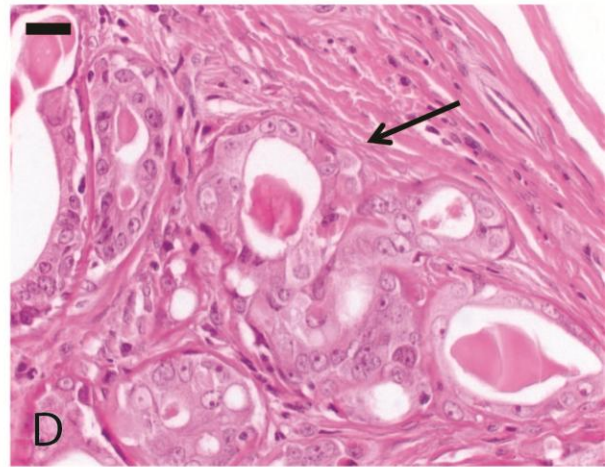
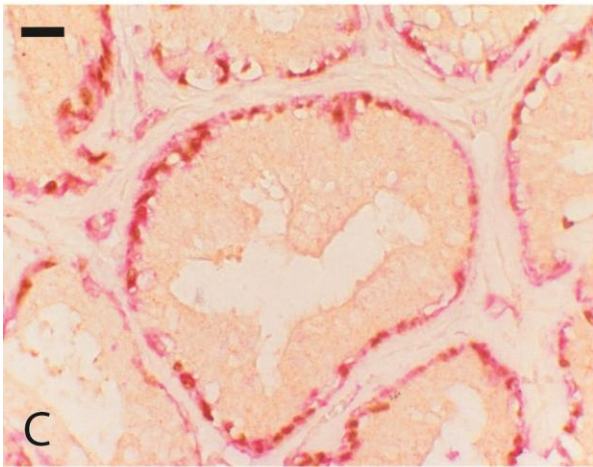
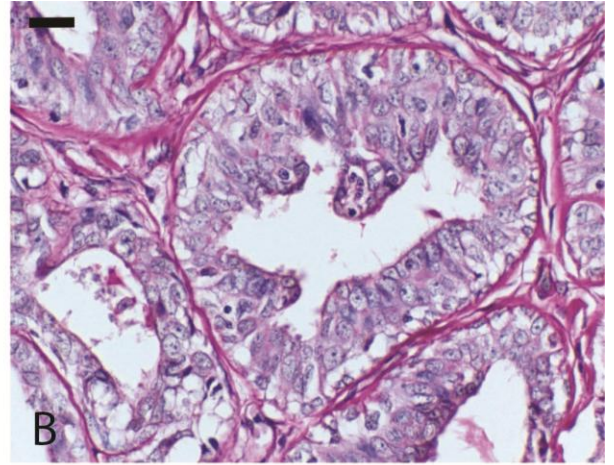
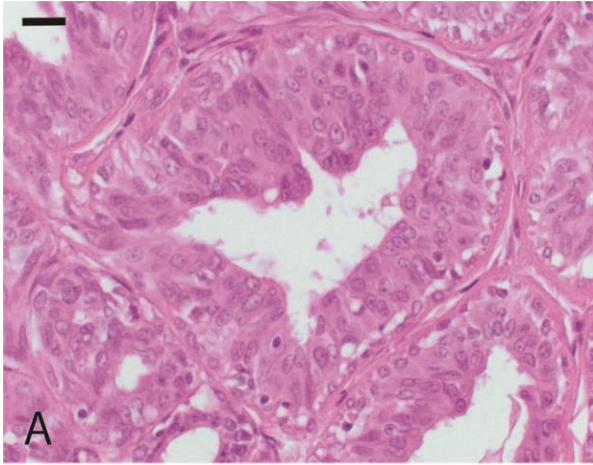


Fig. 1. Carcinoma in benign mixed tumor.

A. *In situ* carcinomatous area in a carcinoma in benign mixed tumor. HE, 60x.

B. Evidence of an intact basement membrane. PAS, 60x.

C. Integrity of the myoepithelium layer demonstrated by p63 and α -SMA double staining. 60x.

D. Microinvasion area in carcinoma in benign mixed tumor (arrow). HE, 60x.

E. Discontinuous basement membrane (arrow). PAS, 60x.

F. Absence of p63 and α -SMA expression (arrow). 60x

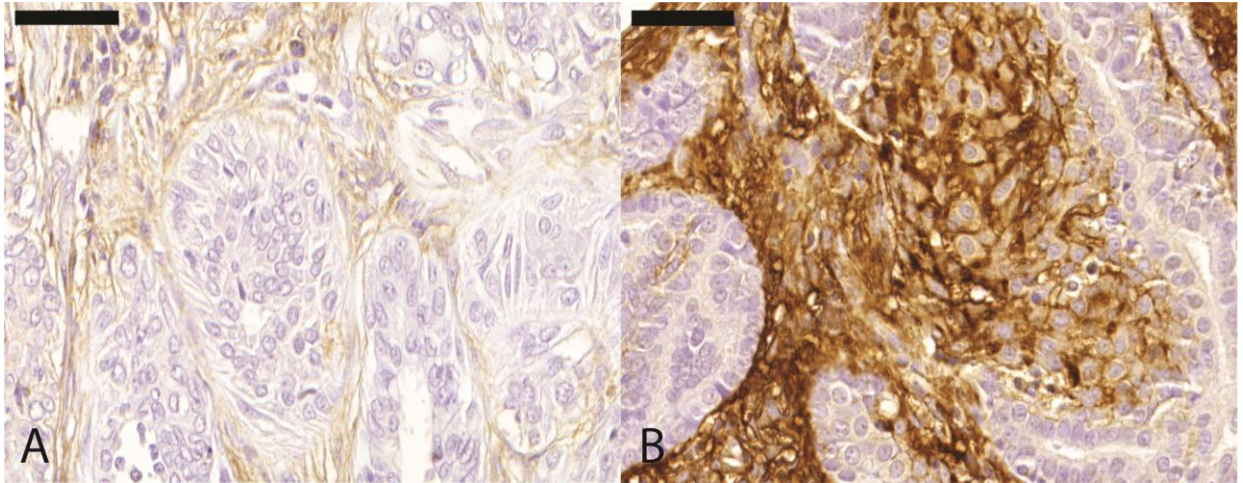


Fig. 2. Carcinoma in benign mixed tumor.

A. *In situ* carcinomatous area with low estromal versican expression. Immunohistochemical stain with Mayer's haematoxylin counterstain, 40x.

B. Versican overexpression adjacent to invasive area. Immunohistochemical stain with Mayer's haematoxylin counterstain, 40x.

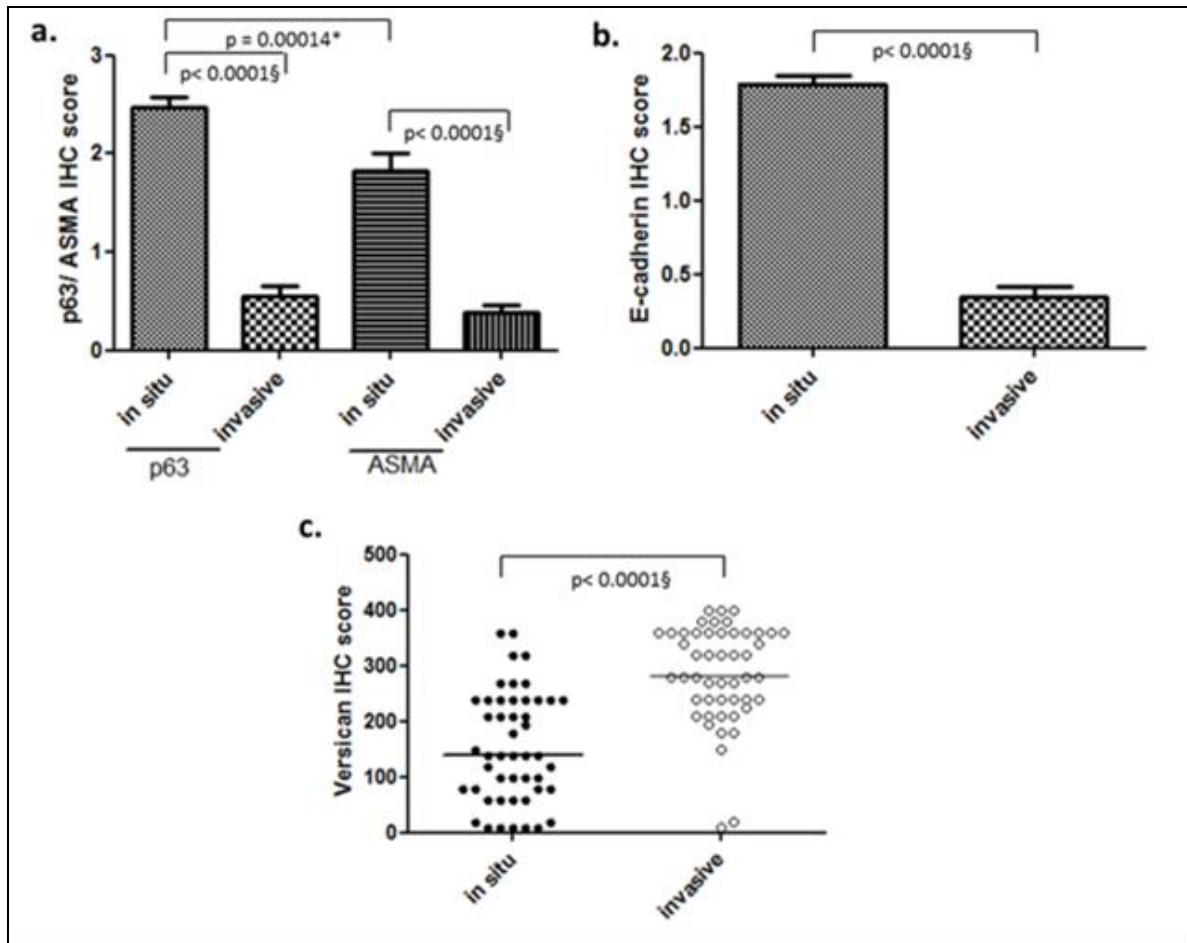


Fig. 3. Difference between *in situ* and invasive areas for p63 and α -SMA (a) and e-cadherin (b) demonstrated by immunohistochemistry. Accumulation of versican in invasive carcinomatous areas when compared with *in situ* areas (c). *Spearman correlation §Wilcoxon test.

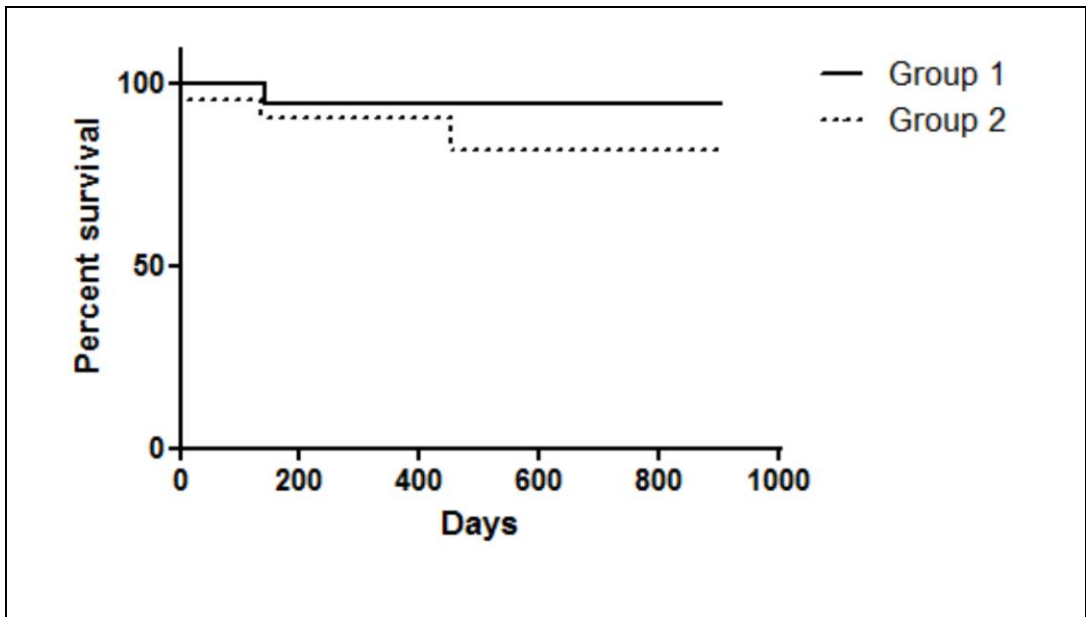


Fig. 4. Survival rates of animals with canine mammary carcinomas in benign mixed tumors. Survival curves were estimated with the Kaplan-Meier method followed by Log-rank test.

ARTIGO 2

Carcinomas em tumores mistos benignos mamários caninos: Expressão de versican nos vários estágios de diferenciação das células mioepiteliais

DAMASCENO, K.A.¹; BERTAGNOLLI, A.C.²; ESTRELA-LIMA, A.³; RABELO, B.S.¹; CAMPOS, L.C.¹; RIBEIRO, L.G.R.³; CASSALI, G.D.¹

¹ Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

² Fepagro Saúde Animal - Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor - IPVDF, Eldorado do Sul, RS, Brasil

³ Departamento de Patologia e Clínicas, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

Resumo:

Em tumores mistos da glândula mamária canina a formação da matriz é constituída pela proliferação de células fusiformes, possivelmente de origem mioepitelial e por substância mixomatosa, além de matriz cartilaginosa e/ou óssea. Entre os múltiplos componentes da matriz extracelular neoplásica o versican tem posição de destaque devido a sua importância na progressão, proliferação e diferenciação celular. No entanto, ainda são escassas as evidências da associação do versican e o processo de diferenciação das células mioepiteliais em tumores mistos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão do proteoglicano versican (imuno-histoquímica) e proteoglicano sulfatado e mucopolissacarídeos (histoquímica) pelas células mioepiteliais, nos seus diversos estágios de diferenciação, e sua relação com a expressão de p63 e α -SMA. Diferença estatística significativa foi observada entre a expressão de versican e α -SMA, no mioepitélio normal ($p < 0.001$), poligonal ($p < 0.001$), estrelado ($p = 0.0013$), mixóide ($p < 0.001$) e pré-condróide ($p < 0.001$). A reatividade de versican e p63 diferiu nas células fusiformes ($p = 0,0029$), nas áreas mixóides ($p = 0.0174$) e nas áreas pré-condróides ($p = 0.0156$). Também foi possível verificar significativa diferença da expressão de versican entre estágios de diferenciação das células mioepiteliais. Estes resultados sugerem que já no estágio inicial de proliferação as células adquirem fenótipo indicativo da sua participação na condrogênese precoce. Além disso, esta diferenciação é reforçada pelas correlações inversas entre a presença deste proteoglicano e a expressão de p63 e α -SMA. A afinidade por safranina e PAS pelas células mioepiteliais nos diferentes estágios de proliferação reitera os achados prévios a respeito da origem mioepitelial para os tumores mistos mamários caninos.

Palavras-chave: Cadela, tumor misto, célula mioepitelial, carcinoma, versican, condrogênese.

Introdução

Os tumores mistos são neoplasias frequentes na mama da cadela e representam, de acordo com o atual sistema de classificação veterinária, de 40 a 50% dos tumores benignos nesta espécie (CASSALI *et al.*, 2009). Histologicamente são caracterizados por um padrão complexo constituído por componente epitelial (células luminais e mioepiteliais) e componente mesenquimal como gordura, tecido fibroso, cartilagem e osso, podendo apresentar até mesmo metaplasia mielóide (MISDORP *et al.*, 1999; HELLMÉN, 2005; AULER *et al.*, 2011). O carcinoma evoluindo em tumor misto benigno surge da transformação maligna do componente epitelial dos tumores mistos benignos (MISDORP *et al.*, 1999).

Em humanos, os tumores mistos benignos mamários são pouco frequentes, no entanto comumente diagnosticados nas glândulas salivares, onde são denominados tumores mistos ou adenomas pleomórficos (VOZ *et al.*, 2000). Estes também podem originar carcinomas ex-adenomas pleomórficos (MOULTON, 1990; LEWIS *et al.*, 2001).

Em tumores mistos caninos, assim como nos adenomas pleomórficos, a formação da matriz é constituída pela proliferação de células fusiformes, possivelmente de origem mioepitelial e por substância mixomatosa, além de matriz cartilaginosa e/ou óssea (MISDORP *et al.*, 1999; ERDÉLYI *et al.*, 2005). Contudo, a histogênese destes elementos mesenquimais ainda permanece obscura (GAMA *et al.*, 2003; HELLMÉN, 2005). A hipótese mais aceita atualmente defende uma origem mioepitelial para os componentes mesenquimais (PULLEY, 1973; DESTEXHE *et al.*, 1993; GÄRTNER *et al.*, 1999; GAMA *et al.*, 2003; RAMALHO *et al.*, 2006).

Alterações na expressão de proteínas constituintes das células mioepiteliais apontam a participação do mioepitélio na formação dos tumores mistos mamários caninos. À medida que estas células se transformam, ocorrem perdas na expressão de moléculas como p63 e α -SMA, (GAMA *et al.*, 2003; LOS MONTEROS *et al.*, 2005; RAMALHO *et al.*, 2006; BERTAGNOLLI *et al.*, 2009) e conservação do fenótipo mesenquimal (DESTEXHE *et al.*, 1993; GÄRTNER *et al.*, 1999; GAMA *et al.*, 2003).

Neste processo de transformação e desenvolvimento tumoral, a matriz extracelular também desempenha importante papel (LIOTTA e KOHN, 2001). Entre os múltiplos componentes da matriz extracelular neoplásica o versican, um proteoglicano de sulfato de condroitina, tem posição de destaque devido a sua participação na progressão, proliferação, diferenciação celular, além de interferir na adesão e angiogênese (PUKKILA *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2004; ZHENG *et al.*, 2004; ERDELYI *et al.*, 2005; YEE *et al.*, 2007; KISCHEL *et al.*, 2010).

Em tumores mamários caninos, alguns autores reportam o acúmulo de proteoglicanos e sulfato de condroitina, tanto no estroma circunjacente às células tumorais, quanto na matriz produzida pelas células mioepiteliais em proliferação (HINRICHS *et al.*, 1999). Sabe-se que o versican é altamente expresso em células fusiformes e em áreas mixóides de tumores mistos (ERDÉLYI *et al.*, 2005). *In vivo*, foi demonstrado por Erdelyi e colaboradores (2005) que o acúmulo de versican na matriz mixóide está relacionado com a diferenciação precoce do tecido em cartilagem.

Nos carcinomas evoluindo em tumores mistos já foi observada perda na expressão de p63 pelas células mioepiteliais em proliferação, suportando o caráter progressivo desses tumores. Todavia ainda são escassas as evidências do papel do versican e sua relação com moléculas características de mioepitélio, tais como p63 e α -SMA, no processo de diferenciação das células mioepiteliais em tumores mistos da glândula mamária canina. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão do proteoglicano versican (imunohistoquímica) e proteoglicano sulfatado e mucopolissacarídeos (histoquímica) pelas células mioepiteliais, nos seus diferentes estágios de diferenciação, e sua relação com a expressão de p63 e α -SMA.

Material e Métodos

- Seleção de casos

Para realização deste estudo foram selecionados 39 casos de carcinomas em tumores mistos disponíveis nos Laboratórios de Patologia Comparada e Anatomia Patológica. As amostras destes tumores mamários foram obtidas de cadelas, independente da raça ou idade, submetidas à mastectomia.

- Histopatologia

A partir dos blocos selecionados, secções histológicas de 4µm foram obtidas e coradas pelas técnicas da Hematoxilina-Eosina. Para todos os casos foram confeccionadas duplicatas das lâminas, visando à análise por dois patologistas veterinários e a confirmação do tipo histológico seguiu a padronização do *Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors* (CASSALI *et al.*, 2011a), modificado de Misdorp *et al.* (1999).

- Imuno-histoquímica

Para a análise imuno-histoquímica, os anticorpos primários utilizados foram: versican (12C5, DSHB, 1:50), p63 (4A 4, Neomarkers, 1:80) e α -SMA (1A 4, Dako, 1:100). Secções de 4µm foram cortadas e colocadas sobre lâminas gelatinizadas. As lâminas foram desparafinadas, rehidratadas em uma série de álcoois progressivamente diluídos, e submetidas a recuperação antigênica pelo calor (banho-maria a 95° por 20 minutos) com Target Retrieval Solution, pH 6.0, exceto as lâminas destinadas a marcação de versican. Nestas foi realizado tratamento enzimático por meio de condroitinase ABC, segundo o protocolo descrito por Erdelyi *et al.* (2005). Posteriormente todas as lâminas foram incubadas em peróxido de hidrogênio 3% em metanol para o bloqueio da atividade da peroxidase endógena por 15 minutos. Após o resfriamento, as lâminas foram cobertas com soro normal de coelho a 10% em PBS por 10 minutos. Em seguida incubadas com o anticorpo primário por uma hora a 25° (p63 e α -sma) ou overnight (versican) a 4°C, na seqüência aplicado o método de amplificação biotina-peroxidase com identificação a partir de anticorpo secundário e revelação polimérica (ADVANCE HRP-ready to use-DakoCytomation). Por último, as secções foram expostas ao cromógeno 3,3 – diaminobenzidina 4 HCL e contra-coradas com hematoxilina de Mayer's. Nas lâminas destinada a dupla-marcação (p63/ α -SMA) foi utilizado o Kit EnVision™ G|2 Doublestain System, Rabbit/Mouse (DAB+/Permanent Red).

Controles negativos foram obtidos pela substituição do anticorpo primário por PBS. Amostras de mama normal foram utilizadas como controle positivo p63 e α -SMA. Como controle positivo para versican foi utilizados um tumor misto com abundante área de matriz mixóide.

- Avaliação imuno-histoquímica

Na análise imuno-histoquímica, assim como na histoquímica, foram observadas as células mioepiteliais normais (NMEC; localizadas ao redor de ductos e ácinos em repouso ou lactante), células mioepiteliais localizadas entre a membrana basal e o epitélio luminal apresentando morfologia poligonal (proliferativas)(PMEC), células mioepiteliais fusiformes intersticiais (SPMEC), células mioepiteliais estreladas intersticiais (SMEC), células estreladas em áreas de matriz mixóide (MM), condrócitos em cartilagem imatura ou pré-condróide (ICHB) e condrócitos em cartilagem madura (CHB) presentes em pelo menos cinco campos do fragmento analisado (ARAI *et al.*, 1995; TATEYAMA *et al.*, 2001; AKIYOSHI *et al.*, 2004; BERTAGNOLLI *et al.*, 2009).

A expressão de versican pelas células mioepiteliais e condrócitos foi realizada utilizando o critério qualitativo proposto por Erdélyi *et al.* (2003): (-) ausência de marcação; (+) marcação fraca; (++) marcação moderada; (+++) marcação forte.

A reatividade para p63 foi indicada pela presença de distinta marcação nuclear, assim como marcação citoplasmática indicou reatividade para α -SMA. Ambos marcadores foram avaliados semiquantitativamente usando o sistema de escore: (-) ausência de marcação; (+) marcação fraca ou <5% das células mioepiteliais positivas; (++) marcação moderada ou entre 5 – 50% das células mioepiteliais; (+++) marcação forte ou acima de 50% das células mioepiteliais (BERTAGNOLLI *et al.*, 2009).

- Histoquímica

Na análise histoquímica, foi usada a coloração de Safranina-O para detectar a presença de proteoglicano sulfatado e sua distribuição (ERDÉLYI *et al.*, 2005). Também foram utilizados em todas as secções colorações em PAS no intuito de identificar mucopolissacarídes (BUIJS, *et al.*, 2004).

- Análise estatística

Análise estatística foi realizada empregando o programa estatístico Graph Pad Prism v.3 software (San Diego, CA). A associação da expressão de versican, p63, α -SMA, PAS e

safranina-o, pelas células mioepiteliais e pelos condrócitos, foi avaliada pelo teste de Wilcoxon. Para observar a diferença da expressão de versican entre os diferentes estágios da condrogênese, foi realizado o teste de Kruskal Wallis. A correlação entre versican, p63 e α -SMA foi analisada pelo teste de Spearman. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0.05$.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal e Experimental (CETEA/UFMG), protocolo 219/2009.

Resultados

No parênquima glandular normal adjacente ao tumor, as células mioepiteliais foram altamente reativas para p63 e α -SMA (+++), formando uma contínua camada circundando ductos e ácinos. Imunorreatividade para p63 foi detectada no núcleo da célula, enquanto que a α -SMA foi observada no citoplasma das células mioepiteliais. Nenhuma reatividade foi observada para versican. Na histoquímica, a maioria das células mioepiteliais não apresentou afinidade pela safranina-o, nem pelo PAS.

As células poligonais, visualmente localizadas entre o componente epitelial luminal e a membrana basal íntegra, revelaram fraca reatividade para versican, representado por 52,63% dos casos e forte expressão (+++) de p63 e α -SMA (Figura 1A e 2A). Estas células não coraram em PAS e safranina em grande parte das amostras.

As células fusiformes mostraram reatividade fraca a moderada para versican e α -SMA em 26 e 22 casos, respectivamente. Além disso, moderada reatividade (++) para p63 foi observada em 17 casos. Neste estágio, as células mioepiteliais começam a apresentar fraca afinidade pelo PAS e pela safranina (Figura 1B e 1C).

As células estreladas apresentaram moderada marcação (++) para versican, p63 e α -SMA em 18, 20 e 16 casos, respectivamente. Estas células revelaram afinidade pelo PAS e pela safranina (Figura 2B).

As áreas de matriz mixóide foram fortemente reativas para versican (+++) em 30 casos. Nesta fase, a perda da expressão de p63, e mais acentuadamente de α -SMA ficam mais evidentes, mostrando em sua maioria expressão moderada (++) e fraca (+), respectivamente. Estas células coram-se mais róseas e alaranjadas, demonstrando maior afinidade pelos corantes PAS e safranina (Figura 1D, 1E, 2C e 2D).

Nas zonas de condróide imaturo, a perda da expressão de α -SMA já é mais acentuada, 18 casos, assim como de p63, mostrando-se fraca em 11 casos e moderada em 10 casos. A imunorreatividade para versican foi moderada, diferente do que foi observado na matriz mixóide, Safranina e PAS coraram uniformemente estas áreas (Figura 1F, 2E e 2F). Vale ressaltar que 15 casos não apresentavam a área de interesse.

Condrócitos foram imunorreativos para p63 em quatro casos, sem observação de reatividade para α -SMA. Versican marcou fracamente estas células, predominando nas áreas da periferia da matriz condróide. Safranina corou fortemente estas áreas e PAS, apesar de fraco, mostrou a presença de mucopolissacarídeos/glicoproteínas. Osteoblastos não foram observados em nenhum caso. Os resultados da análise imuno-histoquímica estão representadas na tabela 1.

Tabela 1. Caracterização dos tipos celulares e imunorreatividade para versican, p63 e α -SMA nos carcinomas em tumores mistos benignos mamários caninos

	Tipo celular	α -SMA				p63				Versican			
		(-)	(+)	(++)	(+++)	(-)	(+)	(++)	(+++)	(-)	(+)	(++)	(+++)
Carcinomas em tumores mistos benignos	NMEC	0	2	6	26	0	0	0	35	25	8	1	0
	PMEC	0	3	7	28	0	0	0	38	7	20	8	0
	SPMEC	3	13	13	6	0	4	17	15	3	11	11	7
	SMEC	6	12	16	3	0	3	20	15	1	5	18	13
	MM	11	13	12	2	0	1	22	15	0	2	6	30
	ICHB	18	3	0	0	0	11	10	0	0	3	16	4
	CHB	16	0	0	0	12	4	0	0	4	16	0	0

* NMEC= células mioepiteliais normais; PMECC = células mioepiteliais em proliferação; SPMEC = células fusiformes; SMEC = células estreladas; MM = células da matriz mixóide; ICHB = condrocitos em cartilagem imatura; CHB = condrocitos em cartilagem madura; - = células negativas; + = < 5% das células reativas ou fraca marcação; ++ = 5–50% das células reativas ou moderada marcação; +++ = > 50% das células reativas ou forte marcação.

Diferença estatística significativa foi observada entre a expressão de versican e α -SMA, no mioepitélio normal ($p < 0.0001$), poligonal ($p < 0.0001$), estrelado ($p = 0.0013$), mixóide ($p < 0.0001$) e pré-condróide ($p < 0.0001$). A reatividade de versican e p63 diferiu nas células fusiformes ($p = 0,0029$), nas áreas mixóides ($p = 0.0174$) e nas áreas pré-condróides ($p = 0.0156$). Ainda foi verificado diferenças na expressão de versican e na coloração em safranina-o nas células poligonais ($p < 0.0001$), fusiformes ($p < 0.0001$) e estreladas ($p < 0.0001$). Versican e PAS diferiram apenas nas áreas de proliferação fusiforme ($p = 0.0007$) e estrelada ($p < 0.0001$). Foi observada correlação significativa na expressão de versican nos estágios de diferenciação desde as células mioepiteliais poligonais em proliferação até o estágio da produção de matriz mixóide ($r = 0.531$ e $p = 0.001$). No teste de Kruskal Wallis foi possível verificar significativa diferença da expressão de versican entre estágios de diferenciação das células mioepiteliais (Gráfico 1).

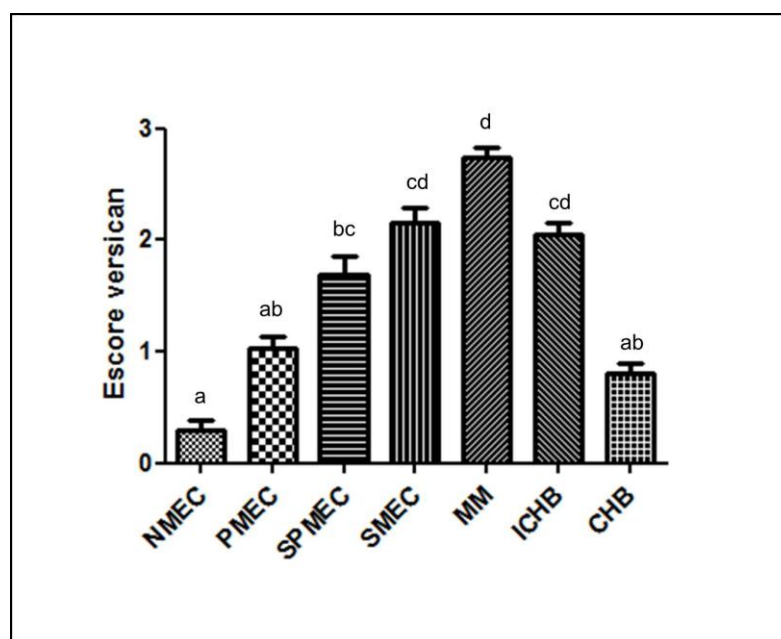


Gráfico 1. Expressão de versican pelos tipos celulares durante a condrogênese nos carcinomas em tumores mistos benignos mamários caninos. NMEC= células mioepiteliais normais; PMEC = células mioepiteliais em proliferação; SPMEC = células fusiformes; SMEC = células estreladas; MM = células da matriz mixóide; ICHB = condrócitos em cartilagem imatura; CHB = condrócitos em cartilagem madura. Letras distintas diferem entre si estatisticamente ao valor de $p < 0.05$.

Discussão

A participação de proteoglicanos no desenvolvimento do tecido cartilaginoso tem despertado o interesse dos pesquisadores. Todavia, poucos estudos ainda abordam seu papel na condrogênese ectópica em tumores produtores de matriz na glândula mamária canina e humana, ou na glândula salivar em humanos (HINRICHS *et al.*, 1999; KUSAFUKA *et al.*, 2004; ERDÉLYI *et al.*, 2005; KUSAFUKA *et al.*, 2008). Além disso, pouca relevância tem sido dada a análise das células mioepiteliais em seus estágios iniciais de proliferação em relação à expressão de moléculas relacionadas à condrogênese.

As células mioepiteliais são responsáveis pela formação do tecido mixomatoso em tumores mistos mamários caninos, assim como em adenomas pleomórficos salivares humanos. Estudos demonstram a expressão de proteoglicanos como lumican e agrecan associados à formação de elementos condrogênicos em adenomas pleomórficos (KUSAFUKA *et al.*, 2004). Poucos achados retratam a presença de versican nestes tumores. Os carcinomas em tumores mistos caninos, tipo histológico abordado no presente estudo, revelaram forte expressão do proteoglicano versican tanto na matriz mixóide como na matriz pré-condróide, como já descrito por Erdélyi *et al.* (2005). Além disso, estes autores analisaram apenas a expressão de versican pelas células mioepiteliais fusiformes e estreladas, arranjadas em pequenos grupos por vezes isoladas da matriz mixóide/condróide principal, negligenciando estágios iniciais de diferenciação.

As células mioepiteliais em estágios iniciais de diferenciação são muitas vezes negligenciadas na análise de tumores mistos. Neste trabalho, a avaliação das áreas de proliferação de células mioepiteliais poligonais demonstrou, ainda que em poucos casos, discreta expressão de versican que aumentou gradativamente até o estágio de matriz mixóide. Este achado pode ser confirmado pela correlação significativa na reatividade para este proteoglicano nas fases de proliferação mioepitelial que antecedem a formação da matriz. Segundo a literatura consultada, nenhum trabalho descreve a presença de versican no princípio da diferenciação destas células em tumores mamários caninos.

A expressão de proteínas sensíveis e específicas das células mioepiteliais é importante na caracterização e pode indicar perda da diferenciação destas células (GAMA *et al.*, 2003;

RAMALHO *et al.*, 2006; BERTAGNOLLI *et al.*, 2009). No presente estudo vale ressaltar que a análise estatística revelou diferenças significativas entre a expressão de versican e α -SMA nas células mioepiteliais normais ($p < 0.0001$), poligonais ($p < 0.0001$), estreladas ($p = 0.0013$), assim como na matriz mixóide ($p < 0.0001$) e pré-condróide ($p < 0.0001$). E ainda, diferenças também foram observadas entre a reatividade de p63 e versican pelas células mioepiteliais fusiformes ($p = 0.0029$), na área mixóide ($p = 0.0174$) e pré-condróide ($p = 0.0156$). Estes resultados sugerem que a medida que o mioepitélio adquire características mesenquimais, iniciando a progressão da diferenciação condróide (células mioepiteliais poligonais), ocorre uma diminuição na expressão das moléculas de p63 e α -SMA e aumento da expressão da versican.

Caterson *et al.* (1990) assim como Hinrichs *et al.* (1999) ao estudarem a expressão do epítipo 3B3 do sulfato de condroitina, GAG que se liga a porção central em vários tipos de proteoglicanos inclusive versican, observaram a presença desta molécula em vários estágios de diferenciação celular e desenvolvimento da cartilagem. Diante de tal evidência, estes pesquisadores sugeriram que a formação da cartilagem era sequencial a formação da matriz mixóide e pré-condróide pelas células mioepiteliais fusiformes nos tumores complexos.

Erdélyi e colaboradores (2005) observaram que as células fusiformes em proliferação e a matriz mixóide expressaram, em algumas áreas, citoqueratinas (CK) (5, 6, 8, 17 e 19), CK 14, α -SMA, sendo a reatividade para vimentina e S-100 maior. Assim como no presente trabalho, eles demonstraram algumas mudanças sofridas pelo mioepitélio proliferado ratificando a hipótese da transição mioepitélio-mesenquimal das células neoplásicas na condrogênese em tumores mistos mamários caninos.

No presente trabalho, pode se observar discreta marcação de versican na periferia da cartilagem madura, assim como os achados de Erdélyi *et al.* (2005). Estes pesquisadores analisaram a expressão de moléculas sabidamente expressas em cartilagem normal e compararam com a presença de versican. Mesmo não sendo expresso no centro da matriz madura, o papel desta molécula na diferenciação precoce de cartilagem ectópica de tumores mistos mamários caninos pode ser demonstrado neste trabalho.

Recentemente, Willems *et al.* (2010) em uma revisão aborda os conceitos básicos de matriz mixóide e descreve os principais elementos constituintes desta matriz extracelular, dentre eles, os glicosaminoglicanos, assim como os proteoglicanos, tem grande relevância em tecidos patológicos ou não (WILLEMS *et al.*, 2010). Dentre os glicosaminoglicanos, o sulfato de condroitina é conhecido pelo seu papel modulando proliferação e prevenindo apoptose celular (WILLEMS *et al.*, 2010). ERICHSEN (1955) demonstrou que o ácido sulfúrico de condroitina produzido pelas células epiteliais e mioepiteliais está presente na substância intercelular em todos os estágios de desenvolvimento entre epitélio e cartilagem e na matriz desta cartilagem. No presente trabalho, em dois casos foi observada uma discreta coloração em safranina em mioepitélio poligonal, intensificando gradativamente a afinidade desta coloração nas células fusiformes, estreladas, na matriz mixóide, assim como nas áreas pré-condróides e condróides. Esta observação reforça que a produção de proteoglicano sulfatado, necessário para a composição tanto da matriz extracelular quanto para a formação da matriz condróide, tem origem nas células mioepiteliais no estágio inicial de diferenciação.

Nas áreas carcinomatosas *in situ* e invasoras, achados prévios (dados não publicados) demonstraram uma significativa diferença na imunorreatividade de versican. Entretanto, nas regiões *in situ* foi possível observar ausência da expressão deste proteoglicano pelas células mioepiteliais presentes entre o epitélio luminal e a membrana basal em grande parte dos casos. Esta evidência pode indicar que a célula mioepitelial circunjacente as áreas carcinomatosas *in situ*, que não sofreu alterações em sua diferenciação, não produz versican, sugerindo que a expressão desta molécula está diretamente relacionada a diferenciação celular durante a condrogênese nos carcinomas em tumores mistos mamários caninos. A participação do versican na diferenciação celular já foi demonstrada em tumores mamários caninos e humanos (ERDÉLYI *et al.*, 2005; SKANDALIS *et al.*, 2011).

Neste contexto, concluímos que as células mioepiteliais poligonais expressam versican, e esta reatividade é crescente nas áreas de proliferação fusiforme, estrelada, pela matriz mixóide e pré-condróide, sugerindo que em estágio inicial de proliferação as células adquirem fenótipo indicativo da sua participação na condrogênese precoce. Além disso, esta diferenciação é reforçada pelas correlações inversas entre a presença deste proteoglicano e a expressão de p63 e α -SMA. A afinidade por safranina e PAS pelas células mioepiteliais nos diferentes estágios

de proliferação reitera os achados prévios a respeito da origem mioepitelial dos componentes mesenquimais nos tumores mistos mamários caninos.

Referências Bibliográficas

AKIYOSHI, T.; UCHIDA, K.; TATEYAMA, S. Expression of Bone Morphogenetic Protein-6 and Bone Morphogenetic Protein Receptors in Myoepithelial Cells of Canine Mammary Gland Tumors. *Veterinary Pathology*, v.41, n.2, p.154-163, 2004.

ARAI, K.; UEHARA, K.; NAOI, M. Simultaneous expression of type IX collagen and an inhibin-related antigen in proliferative myoepithelial cells with pleomorphic adenoma of canine mammary glands. *Japanese Journal of Cancer Research*, v.86,n.6, p.577-584, 1995.

AULER, P. *et al.* Myeloid metaplasia in canine mixed mammary tumors: occurrence and characterization. *The Veterinary Quarterly*, v.31, n.4, p. 173-177, 2011.

BERTAGNOLLI, A. C. *et al.* Immunohistochemical Expression of p63 and Δ Np63 in Mixed Tumors of Canine Mammary Glands and Its Relation with p53 Expression. *Veterinary Pathology*, v. 46, n.3, p. 407-415, 2009.

BERTAGNOLLI, A. C. *et al.* Canine mammary mixed tumours: immunohistochemical expressions of EGFR and HER-2. *Australian Veterinary Journal*, v. 89, n. 8, Aug. 2011.

BUIJS, J.T. *et al.* Prognostic significance of periodic acid-Schiff-positive patterns in primary breast cancer and its lymph node metastases. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 84, n.2, p. 117-130, 2004.

CASSALI, G.D. *et al.* Mammary gland diagnosis of the Laboratory of Comparative Pathology - UFMG, from 2000 to 2008. In: 34 World Small Animal Veterinary Association Congress, 2009, São Paulo. *Clínica Veterinária (Supplement)*. São Paulo : Editora Guará, 2009. v. 14. p. 173-173.

CASSALI, G.D. *et al.* Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumours. *Brazilian Journal Veterinary Pathology*, v.4, n.2, p.153-180, 2011.

CATERSON, B. *et al.* Modulation of native chondroitin sulphate structure in tissue development and in disease. *Journal of Cell Science*, v. 97, p. 411-417, 1990.

DESTEXHE, E. *et al.* Immunohistochemical identification of myoepithelial, epithelial, and connective tissue cells in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, v.30, n.2, p.146-154, 1993.

ERDÉLYI, I. *et al.* Expression of versican in relation to chondrogenesis-related extracellular matrix components in canine mammary tumors. *Histochemical and Cell Biology*, v. 124, n.2, p. 139-149, Aug. 2005.

- ERICHSEN, S. A histochemical study on mixed tumours of the canine mammary gland. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, v.36, n.6, p.490-502, 1955.
- GAMA, A. *et al.* P63: A novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues. *Veterinary Pathology*, v.40, n.4, p.412-240, Jul. 2003.
- GÄRTNER, F. *et al.* DNA measurement and immunohistochemical characterization of epithelial and mesenchymal cells in canine mixed mammary tumors: putative evidence for a common histogenesis. *Veterinary Pathology*, v. 158, n.1, p.39-47, 1999.
- GENELHU, M.C.L.S. *et al.* A comparative study between mixed-type tumours from human salivary and canine mammary glands, *BMC Cancer*, v.28, n.7, p. 218, 2007.
- HELLMÉN, E. Complex mammary tumours in the female dog : a review. *The journal of Dairy Research*, v. 72, p. 90- 97, 2005.
- HINRICHS, U.; RUTTEMAN, G.R.; NEDERBRAGT, H. Stromal accumulation of chondroitin sulphate in mammary tumours of dogs. *British Journal of Cancer*, v. 80, n. 8, p. 1359-65, 1999.
- HU, Y.H. *et al.* Aberrant protein expression and promoter methylation of p16 gene are correlated with malignant transformation of salivary pleomorphic adenoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 135, n.7, p. 882-9, 2011.
- KISCHEL, P. *et al.* Versican overexpression in human breast cancer lesions: known and new isoforms for stromal tumor targeting. *International Journal of Cancer*, v. 126, p. 640–650, 2010.
- KUSAFUKA, K. *et al.* Lumican expression is associated with the formation of mesenchyme-like elements in salivary pleomorphic adenomas. *The Journal of Pathology*, v. 203, n.4, p. 953–960, 2004.
- KUSAFUKA, K. *et al.* Cartilaginous features in matrix-producing carcinoma of the breast: four cases report with histochemical and immunohistochemical analysis of matrix molecules. *Modern Pathology*, v.21, n.10, p.1282–1292, 2008.
- LEWIS, J.E. *et al.* Carcinoma ex pleomorphic adenoma: pathologic analysis of 73 cases. *Human Pathology*, v.32, n.6, p.596-604, 2001.
- LIOTTA, L.A; KOHN, E.C. The microenvironment of the tumor – host interface. *Nature*, v.411, p.375-379, 2001
- MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, E. Definitions and explanatory notes. In: _____. *Who Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat*. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1999. p.18-27.
- MOULTON, J.E. Tumors of the mammary gland. In: MOULTON, JE. (Ed.). *Tumors in Domestic Animals*, 3rd ed, Berkeley, CA: University of California Press, 1990, p. 518–552.

- PUKKILA, M.J. *et al.* Versican expression in pharyngeal squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *Journal of Clinical Pathology*, v.57, n.7, p.735-739, 2004.
- PULLEY, L.T. Ultrastructural and histochemical demonstration of myoepithelium in mixed tumors of the canine mammary gland. *American Journal of Veterinary Research*, v.34, p.1513-1522, 1973.
- RAMALHO, L. N. Z. *et al.* 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*, v.43, n.4, p.424-429, 2006.
- SHENG, S. *et al.* Versican Mediates Mesenchymal–Epithelial Transition. *Molecular Biology of the Cell*, v.17, n.7, p.2009–2020, 2006.
- SKANDALIS *et al.* Versican but not decorin accumulation is related to malignancy in mammographically detected high density and malignant-appearing microcalcifications in non-palpable breast carcinomas. *BMC Cancer*, v.11, p.1-13, 2011.
- TATEYAMA, S. *et al.* Expression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in myoepithelial cells in canine mammary gland tumors. *Veterinary Pathology*, v.38, n.6, p.703-709, 2001.
- VOZ, M. L.; VAN de VEN, W.J.; KAS, K. First insight into the molecular basis of pleomorphic adenomas of the salivary glands. *Advances in Dental Research*, v.14, n.1, p.81-83, 2000.
- WILLEMS, S.M. *et al.* Running GAGs: myxoid matrix in tumor pathology revisited: What's in it for the pathologist? *Virchows Archiv*, v. 456, n.2, p.181–192, 2010.
- WU, Y. *et al.* Overexpression of the C-terminal PG-M/versican domain impairs growth of tumor cells by intervening in the interaction between epidermal growth factor receptor and β 1-integrin. *Journal of Cell Science*, v.117, n.11, p.2227-2237, 2004.
- YEE, A. J.M. *et al.* The effect of versican G3 domain on local breast cancer invasiveness and bony metastasis. *Breast Cancer Research*, v. 9, n. 4, p.11, 2007.
- ZHENG *et al.* Versican/Pg-M G3 domain promotes tumor growth and angiogenesis. *The FASEB Journal*, v.18, n.6, p.754-756, 2004.

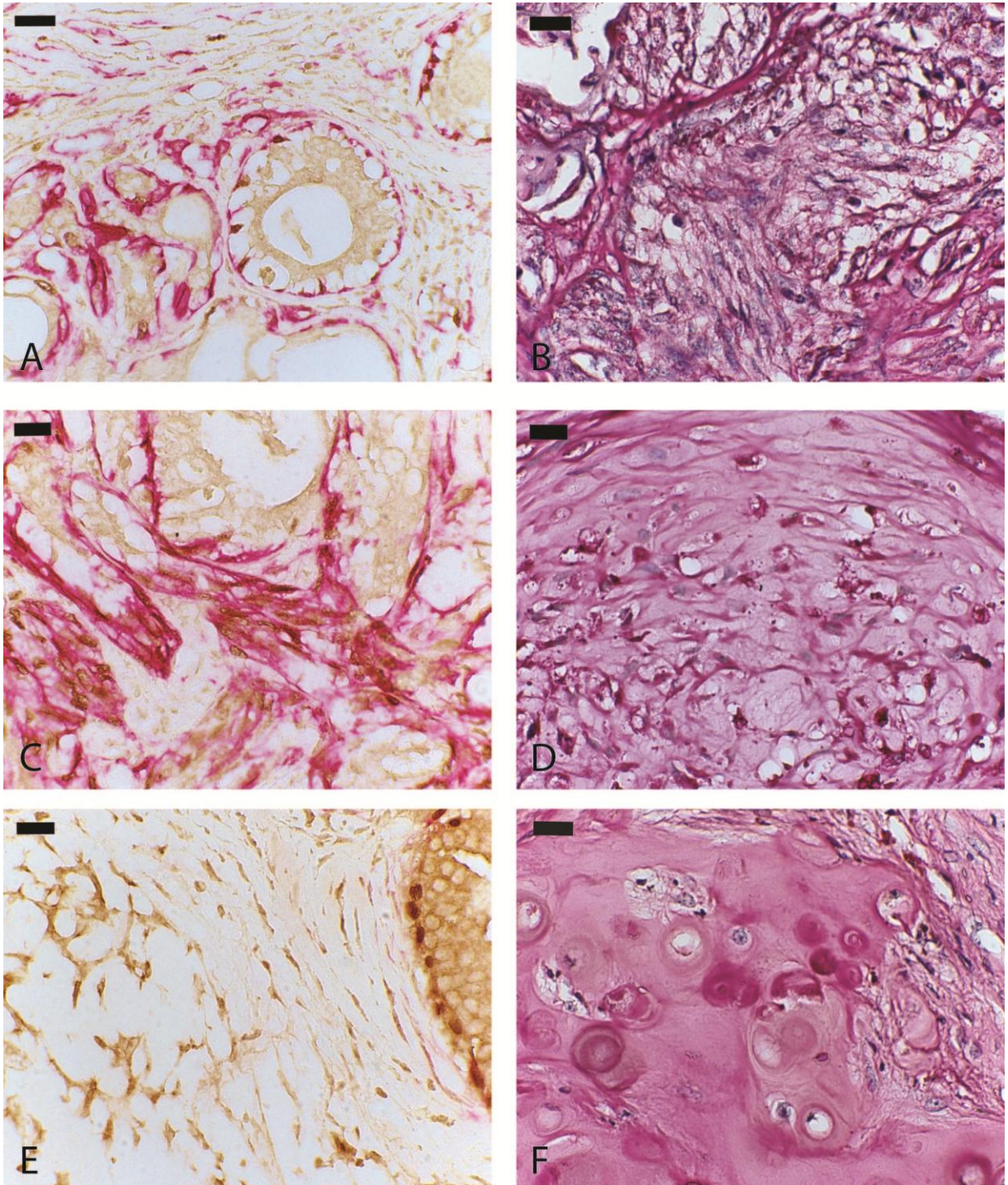


Figura 1. Carcinoma em tumor misto benigno mamário canino.

(A) Expressão de p63 e α -SMA pelas células mioepiteliais poligonais. 60x. (B) Células mioepiteliais fusiformes em proliferação. PAS, 60x. (C) Expressão de p63 e α -SMA pelas células mioepiteliais fusiformes. 60x. (D) Área de matriz mixóide. PAS, 60x. (E) Perda de imunorreatividade na expressão de p63 e ausência de α -SMA em área de matriz mixóide. 60x. (F) Cartilagem madura. PAS, 60x.

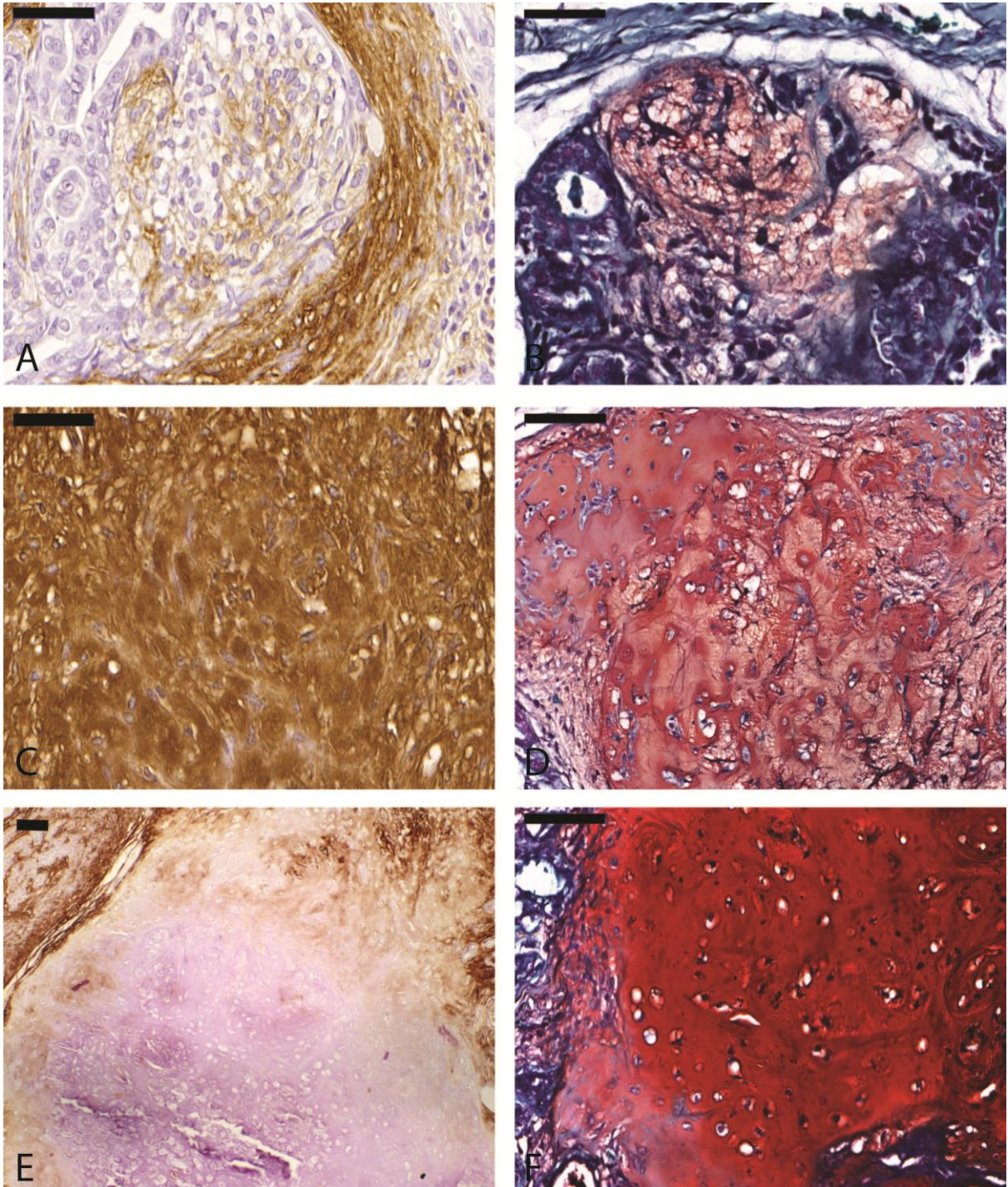


Figura 2. Carcinoma em tumor misto benigno mamário canino.

(A) Área mostrando proliferação de células poligonais, com fraca reatividade de versican, e células fusiformes, moderadamente marcadas. Contra-coloração de hematoxilina de Mayer's, 40x. (B) Proliferação de células estreladas. Safranina-o, 40x. (C) Matrix mixóide expressando fortemente versican. Contra-coloração de hematoxilina de Mayer's, 40x. (D) Matriz mixóide. Safranina-o, 40x. (E) Matriz condróide revelando perda da expressão de versican. Contra-coloração de hematoxilina de Mayer's, 20x. (F) Matriz condroide. Safranina-o, 40x.

7. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos nesse estudo, nas condições metodológicas empregadas, permitiram concluir:

- Em carcinomas em tumores mistos a expressão de versican difere significativamente entre as áreas *in situ* e invasoras, sugerindo o papel desta molécula na progressão destes tumores;
- Não foram observadas associações entre o proteoglicano versican e os fatores prognósticos avaliados (tamanho do tumor, acometimento de linfonodo, metástase, estadiamento clínico, grau histológico e Índice de Prognóstico de Nottingham);
- A avaliação da integridade da camada mioepitelial através da análise da dupla expressão de p63 e α -SMA permitiu confirmar áreas suspeitas de invasão em HE. Este achado pode ser ratificado pelas diferenças significativas na expressão de p63 e α -SMA observadas entre as áreas *in situ* e invasoras;
- A diferença de expressão da molécula de adesão E-caderina, entre áreas *in situ* e invasoras apesar de significativa não apresentou correlação com versican;
- Na avaliação da diferenciação das células mioepiteliais, as células poligonais expressaram versican, e esta reatividade foi mantida nas áreas de proliferação fusiforme, estrelada, pela matriz mixóide e pré-condróide;
- Correlações inversas entre a presença de versican e a expressão de p63 e α -SMA pelas células mioepiteliais também foram observadas sugerindo que a medida que o mioepitélio se diferencia ocorre perda de elementos cruciais para sua caracterização e função;
- A afinidade das células mioepiteliais por safranina e PAS pelas nos diferentes estágios de proliferação reitera os achados prévios a respeito da origem mioepitelial dos tumores mistos mamários caninos.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tumores mistos mamários são neoplasias frequentes em cadelas, entretanto sua heterogeneidade histomorfológica ainda é motivo de controvérsias no diagnóstico destes tumores. Além disso, pouco se conhece a respeito dos fatores que resultam no processo de malignização e invasão nestes tumores. Pesquisas devem ser encorajadas na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos no comportamento biológico destas lesões.

Como caracterizado neste trabalho, as células mioepiteliais em proliferação podem apresentar aspecto fusiforme ou estrelado, e muitas vezes encontram-se embebidas em abundante matriz extracelular (matriz mixóide). Verificou-se também que a proliferação de células mioepiteliais associada à presença de matriz mixóide é precursora da cartilagem ectópica observada nos tumores mistos, sugerindo que a mesma resulta da transição (mio) epitelial-mesenquimal, hipótese levantada por Erdélyi *et al.*, 2005. Considera-se como tumor misto benigno, quando é observada proliferação de células mioepiteliais associada à presença de matrix mixóide. Se mesmo nas fases iniciais de diferenciação das células mioepiteliais (células poligonais, fusiformes e estreladas) já se observa a presença de elementos que compõem a matriz, característica marcante para o diagnóstico de tumor misto, haveria a necessidade de subdivirmos em tumores complexos? Qual a importância clínica desta subclassificação? As evidências conhecidas de diferenciação e progressão das células mioepiteliais não conduzem para o raciocínio de um diagnóstico único?

Outro importante foco do nosso estudo foi à participação das células mioepiteliais na caracterização do processo de invasão. Processo bastante estudado e caracterizado nas lesões da glândula mamária humana, mas ainda pouco descrito na literatura veterinária e, portanto, pouco conhecido e adotado pelos patologistas veterinários na rotina diagnóstica. Praticamente não temos trabalhos caracterizando as lesões carcinomatosas *in situ* na glândula mamária da cadela. Assim como, os mecanismos de interação entre as células neoplásicas e matriz no processo de progressão tumoral.

O conhecimento sobre a matriz extracelular e seus componentes tem tido avanços significativos na patologia oncológica. A presença de proteoglicanos, como o versican, e seu papel nessa complexa rede de vias e sinalizações que culminam no microambiente favorável a

progressão e desenvolvimento tumoral instiga novas descobertas. Considerando a possibilidade de que os tumores mistos podem servir como modelo de progressão tumoral, o estudo da matriz produzida por estes tumores é extremamente relevante. A identificação dos elementos que a compõe, sua interação com as células neoplásicas e os possíveis mecanismos de regulação poderão contribuir para o entendimento dos fatores que culminam na transformação e progressão dos tumores produtores de matriz da glândula mamária canina.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIANCE, M.C. *et al.* Myoepithelial cells: good fences make good neighbors. *Breast Cancer Research*, v.7, n.5, p.190-197, 2005.

ABREU, E.; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. *Revista Brasileira de cancerologia*, v.48, n.1, p.113-131, 2002.

AKIYOSHI, T.; UCHIDA, K.; TATEYAMA, S. Expression of bone morphogenetic protein-6 and bone morphogenetic protein receptors in myoepithelial cells of canine mammary gland tumors. *Veterinary Pathology*, v.41, n.2, p.154-163, 2004.

ALTEMANI, A. *et al.* Carcinoma ex pleomorphic adenoma (CXPA): immunoprofile of the cells involved in carcinomatous progression. *Histopathology*, v.46, n.6, p.635-641, 2005.

ARAI, K.; UEHARA, K.; NAGAI, Y. Expression of type II and type XI collagens in canine mammary mixed tumors and demonstration of collagen production by tumor cells in collagen gel culture. *Japanese Journal of Cancer Research*, v.80, p.840-847, 1989.

ARAI, K.; NAOI, M.; UEHARA, K. Immunohistochemical examination of neural cell adhesion molecule (NCAM), tenascin and fibronectin on the development of cartilaginous tissue in mammary mixed tumors. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.56, n.4, p.809-811, 1994.

ARAI, K.; UEHARA, K.; NAOI, M. Simultaneous expression of type IX collagen and an inhibin-related antigen in proliferative myoepithelial cells with pleomorphic adenoma of canine mammary glands. *Japanese Journal of Cancer Research*, v.86, n.6, p.577-584, 1995.

ARAI, K. *et al.* Expression of Class II b-Tubulin by Proliferative Myoepithelial Cells in Canine Mammary Mixed Tumors. *Veterinary Pathology*, v.40, p.670-676, 2003.

ARAÚJO, V.C. *et al.* Collagen type I may influence the expression of E-cadherin and beta-catenin in carcinoma ex-pleomorphic adenoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, v.17, n.4, p.312-318, 2009.

ASPBERG, A. *et al.* Fibulin-1 Is a Ligand for the C-type Lectin Domains of Aggrecan and Versican. *The Journal of Biological Chemistry*, v.274, n.29, p.20444 -20449, 1999.

ASTRÖM, A.K. *et al.* Conserved mechanism of PLAG1 activation in salivary gland tumors with and without chromosome 8q12 abnormalities: identification of SII as a new fusion partner gene. *Cancer Research*, v.59, n.4, p.918-923, 1999.

AUCLAIR, P.L.; ELLIS, G.L. Atypical features in salivary gland mixed tumors: their relationship to malignant transformation. *Modern Pathology*, v.9, n.6, p.652-657, 1996.

AULER, P. *et al.* Myeloid metaplasia in canine mixed mammary tumors: occurrence and characterization. *The Veterinary Quarterly*, v.31, n.4, p.173-177, 2011.

BENJAMIN, S.A.; LEE, A.C.; SAUNDERS, W.J. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in Beagles. *Veterinary Pathology*, v.36, p.423-436, 1999.

BERTAGNOLLI, A. C. *et al.* Immunohistochemical Expression of p63 and Δ Np63 in Mixed Tumors of Canine Mammary Glands and Its Relation with p53 Expression. *Veterinary Pathology*, v.46, n.3, p.407-415, 2009.

BERTAGNOLLI, A.C. *et al.* Canine mammary mixed tumours: immunohistochemical expressions of EGFR and HER-2. *Australian Veterinary Journal*, v.89, n.8, 2011.

BODE-LESNIEWSKA, B. *et al.* Distribution of the large aggregating proteoglycan versican in adult human tissues. *Journal Histochemistry & Cytochemistry*, v.44, n.4, p.303–312, 1996.

BROWN, L.F. *et al.* Vascular stroma formation in carcinoma *in situ*, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast. *Clinical Cancer Research*, v.5, p.1041–1056, 1999.

BUIJS, J.T. *et al.* Prognostic significance of periodic acid-Schiff-positive patterns in primary breast cancer and its lymph node metastases. *Breast Cancer Research and Treatment*, v.84, n.2, p.117–130, 2004.

CAMPO, L.C. *Avaliação de marcadores tumorais séricos em cadelas com e sem metástase em câncer de mama.* 2010. 82f. Dissertação (Mestrado em Patologia Geral) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CANAVESE, G. *et al.* Expression of proteoglycan versican in *in situ* breast lesions: Relations between stromal changes, histotype, and invasion. *Pathology Research and Practice*, v.207, p.97–103, 2011.

CASSALI, G.D. *et al.* Cytological diagnosis of a metastatic canine mammary tumor in pleural effusion. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.51, n.4, p.307-310, 1999.

CASSALI, G.D. *Estudo morfológico, imunohistoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela: Aspectos comparativos com neoplasias da mama humana.* 2000. 73f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CASSALI, G.D. *et al.* Microarrays em câncer de mama. *Prática Hospitalar*, ano IX, n.51, p.106-108, 2007.

CASSALI, G.D. *et al.* Genética aplicada ao câncer de mama. *Prática Hospitalar*, ano X, n.57, p.15-17, 2008.

CASSALI, G.D. *et al.* Mammary gland diagnosis of the Laboratory of Comparative Pathology - UFMG, from 2000 to 2008. In: 34 World Small Animal Veterinary Association Congress, 2009, São Paulo. *Clínica Veterinária (Supplement)*. São Paulo : Editora Guará, 2009. v.14. p.173-173.

- CASSALI, G.D. *et al.* Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumours. *Brazilian Journal Veterinary Pathology*, v.4, n.2, p.153-180, 2011a.
- CASSALI, G.D. *et al.* Canine mammary tumours: A quantitative DNA study using static cytometry. *Revista Española de Patología*, 2011b. In press.
- CAVALCANTE, R.B. *et al.* Immunohistochemical expression of vimentin, calponin and HHF-35 in salivary gland tumors. *Brazilian Dental Journal*, v.18, p.192-197, 2007.
- CAVALCANTI, M.F. *Fatores prognósticos na abordagem clínica e histopatológica dos carcinomas mamários de cadelas: Estadiamento TNM e Sistema de Nottingham*. 2006. 105f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CAVALCANTI, M.F.; CASSALI, G.D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas - revisão. *Revista Clínica Veterinária*, ano XI, n.61, p.56-63, 2006.
- CATERSON, B. *et al.* Modulation of native chondroitin sulphate structure in tissue development and in disease. *Journal of Cell Science*, v.97, p.411-417, 1990.
- CHOOCHEEP, K. *et al.* Versican facilitates chondrocyte differentiation and regulates joint morphogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, v.285, n.27, p.21114-21125, 2010.
- COTCHIN, E. Mammary neoplasms of the bitch. *Comparative pathology*. v.68, p.1-22, 1958.
- CRUSCO, S.E. *et al.* Canine breast cancer and microarray: what we learn with them. In: 6th Biannual European Veterinary Society for Small Animal Reproduction Congress, 2008. Proceedings... Vienna.
- DALECK, C.R. *et al.* Aspectos clínico e cirúrgicos do tumor mamário canino. *Revista Ciência Rural*, v.28, n.1, p.95-100, 1998.
- DE NARDI, A.B. *et al.* Prevalência de neoplasias e modalidade de tratamentos em cães, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. *Archives of Veterinary Science*, v.7, n.2, p.15-26, 2002.
- DE NARDI, A.B. *Correlação da ciclooxigenase-2 com Ki-67, P53 e caspase-3 nas neoplasias de mama em cadelas*. 2007. 92f. Tese de Doutorado (Cirurgia Veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Jaboticabal.
- DESTEXHE, E. *et al.* Immunohistochemical identification of myoepithelial, epithelial, and connective tissue cells in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, v.30, n.2, p.146-154, 1993.
- DUFFY, M.J. *et al.* Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Research*, v.2, n.4, p.252-257, 2000.
- DUTRA, A.P. *et al.* C-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary

tumors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.37, p.1673-1681, 2004.

DUTRA, A.P. *et al.* Assessment of cell proliferation and prognostic factors in canine mammary gland tumors. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, n.6, p.1403-1412, 2008.

EL-NAGGAR, A.K. *et al.* Molecular genetic alterations in carcinoma ex-pleomorphic adenoma: a putative progression model? *Genes, Chromosomes & Cancer*, v.27, n.2, p.162-168, 2000.

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, v. 19, p. 403-410, 1991.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Assessment of histological grade. In: *Systemic Pathology. The breast*. 3.ed. London: Churchill Livingstone. 1998, p.365-384.

ERDÉLYI, I. *et al.* Immunohistochemical evaluation of versican, in relation to chondroitin sulphate, in canine mammary tumors. *Histology and histopathology*, v.18, p.1067-1080, 2003.

ERDÉLYI, I. *et al.* Expression of versican in relation to chondrogenesis-related extracellular matrix components in canine mammary tumors. *Histochemical and Cell Biology*, v.124, n.2, p.139-149, 2005.

ERDÉLYI, I. *Extracellular matrix in canine mammary tumors with special focus on versican, a versatile extracellular proteoglycan*. 2006. 158f. Tese. Proefschrift Universiteit Utrecht, Budapeste.

ERICHSEN, S. A histochemical study on mixed tumours of the canine mammary gland. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, v.36, n.6, p.490-502, 1955.

ESTRELA-LIMA, A. *et al.* Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer*, v.10, n.1, p.1-14, 2010.

ESTRELA-LIMA, A. *et al.* Understanding of the immunological heterogeneity of canine mammary carcinomas to provide immunophenotypic features of circulating leukocytes as clinically relevant prognostic biomarkers. *Breast Cancer Research and Treatment*, v.131, n.3, p.751-763, 2012.

FÉLIX, A. *et al.* Pleomorphic adenoma and carcinoma ex pleomorphic adenoma: immunohistochemical demonstration of the association between tenascin expression and malignancy. *Histopathology*, v.45, n.2, p.187-192, 2004.

- FERLETTA, M.; GRAWÉ, J.; HELLMÉN, E. Canine mammary tumors contain cancer stem-like cells and form spheroids with an embryonic stem cell signature. *International Journal of Developmental Biology*, v.55, n.7-9, p.791-799, 2011.
- FERREIRA, E. *et al.* The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Veterinary Comparative Oncology*, v.7, n.4, p.230-235, 2009.
- FONSECA, C.S.; DALECK, C.R. Neoplasias mamárias em cadelas: Influência hormonal e efeitos da ovariectomia como terapia adjuvante. *Ciência Rural*, v.30, n.4, p.731-735, 2000.
- FOWLER, M.H. *et al.* Malignant mixed tumors of the salivary gland: a study of loss of heterozygosity in tumor suppressor genes. *Modern Pathology*, v.19, p.350-355, 2006.
- GAMA, A. *et al.* P63: A novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues. *Veterinary Pathology*, v.40, n.4, p.412-240, 2003.
- GAMA, A. *et al.* 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*, v.177, p.45-53, 2008.
- GÄRTNER, F. *et al.* DNA measurement and immunohistochemical characterization of epithelial and mesenchymal cells in canine mixed mammary tumors: putative evidence for a common histogenesis. *Veterinary Pathology*, v.158, n.1, p.39-47, 1999.
- GENELHU, M.C.L. *et al.* Immunohistochemical expression of p63 in pleomorphic adenomas and carcinomas ex-pleomorphic adenomas of salivary glands. *Oral Oncology*, v.42, n.2, p.154-160, 2006.
- GENELHU, M.C.L.S. *et al.* A comparative study between mixed-type tumours from human salivary and canine mammary glands, *BMC Cancer*, v.28, n.7, p. 1-9, 2007.
- GNEPP, D.R. *et al.* Carcinoma ex-pleomorphic adenoma. In: BARNES, L. *et al.* (eds.) WHO Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press, 2005. p.242-243.
- GRANDI, F. *et al.* Extramedullary hematopoiesis in a case of benign mixed mammary tumor in a female dog: cytological and histopathological assessment. *BMC Veterinary Research*, v.6, n.45, p.1-6, 2010.
- GUDJONSSON, T. *et al.* Myoepithelial cells: their origin and function in breast morphogenesis and neoplasia. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v.10, n.3, p. 261-272, 2006.
- HAMPE, J.F.; MISDORP W. Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bull World Health Organ*, v.50, p.111-133, 1974.

HELLMÉN, E. *et al.* Expression of different phenotypes in cell lines from canine mammary spindle-cell tumours and osteosarcomas indicating a pluripotent mammary stem cell origin. *Breast Cancer Research and Treatment*, v.61, p.197–210, 2000.

HELLMEN, E. Complex mammary tumours in the female dog : a review. *The journal of Dairy Research*, v.72, p.90-97, 2005.

HERNÁNDEZ, D. *et al.* V3 versican isoform alters the behavior of human melanoma cells by interfering with CD44/erbB-dependent signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, v.286, n.2, p.1475–1485, 2011.

HINRICHS, U. *et al.* Stromal accumulation of chondroitin sulphate in mammary tumours of dogs. *British Journal of Cancer*, v.80, n.8 , p.1359-65, 1999.

HODA, S.A. *et al.* Microinvasive carcinoma of the breast: can it be diagnosed reliably and it's clinically significant? *Histopathology*, v.35, p.468-472, 1999.

HU, YH. *et al.* Aberrant Protein Expression and Promoter Methylation of p16 Gene Are Correlated With Malignant Transformation of Salivary Pleomorphic Adenoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v.135, n.7, p.882-9, 2011.

HUGGINS, C.; MOULDER, P.V. Studies on the mammary tumours of dog. I. Lactation and influence of ovariectomy and suprarenalectomy thereon. *The Journal of Experimental Medicine*, v.80, p.441-454, 1944.

KATORI, H.; NOZAWA, A.; TSUKUDA, M. Expression of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor- α and Ki-67 in relationship to malignant transformation of pleomorphic adenoma. *Acta Oto-Laryngologica*, v.127, p.1207-1213, 2007.

KAWABATA, A. *et al.* Co-localization of chondromodulin-I (ChM-I) and bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in myoepithelial cells of canine mammary tumors. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v.67, n.11, p.1097-1102, 2005.

KIM, J.W. *et al.* Carcinoma ex pleomorphic adenoma of the salivary glands: distinct clinicopathologic features and immunoprofiles between subgroups according to cellular differentiation. *Journal of Korean Medical Science*, v.26, p.1277-1285, 2011.

KISCHEL, P. *et al.* Versican overexpression in human breast cancer lesions: known and new isoforms for stromal tumor targeting. *International Journal of Cancer*, v.126, p.640–650, 2010.

KODAMA, J. *et al.* Prognostic significance of stromal versican expression in human endometrial cancer. *Annals of Oncology*, v.18, p.269–274, 2007.

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

KUSAFUKA, K. *et al.* Lumican expression is associated with the formation of mesenchyme-like elements in salivary pleomorphic adenomas. *The Journal of Pathology*, v.203, n.4, p.953–960, 2004.

KUSAFUKA, K. *et al.* Cartilaginous features in matrix-producing carcinoma of the breast: four cases report with histochemical and immunohistochemical analysis of matrix molecules. *Modern Pathology*, v.21, n.10, p.1282–1292, 2008.

LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J. Tumors of the Mammary Gland. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 4.ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p.619-636.

LANGMAN, G.; ANDREWS, C.; WEISSFERDT, A. WT1 expression in salivary gland pleomorphic adenomas: a reliable marker of the neoplastic myoepithelium. *Modern Pathology*, p.1-7, 2010.

LAS MULAS, J. M.; REYMUNDO, C. Revisión Animal models of human breast carcinoma: canine and feline neoplasms. *Revista Oncología*, v.2, p.274-281, 2000.

LAVALLE, G.E. *et al.* COX-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Veterinary Pathology*, v.46, n.6, p.1275–1280, 2009.

LEONETTI, J.P. *et al.* Recurrent pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, v.133, n.3, p.319-22, 2005.

LEWIS, J.E. *et al.* Carcinoma ex pleomorphic adenoma: pathologic analysis of 73 cases. *Human Pathology*, v.32, n.6, p.596-604, 2001.

LIOTTA, L.A; KOHN, E.C. The microenvironment of the tumor – host interface. *Nature*, v.411, p.375-379, 2001.

LOS MONTEROS, A.E. *et al.* Immunolocalization of 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*, v.39, p.247-256, 2002.

LOS MONTEROS, A.E *et al.* Expression of Maspin in mammary gland tumours of the dog. *Veterinary Pathology*, v.42, p.250–257, 2005.

LUNA, L.G. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. New York: McGraw Hill, 1968.

MAN, Y.G. *et al.* Cell clusters overlying focally disrupted mammary myoepithelial cell layers and adjacent cells within the same duct display different immunohistochemical and genetic features: implications for tumor progression and invasion. *Breast Cancer Research*, v.5, p.231-241, 2003.

MAN, Y.G.; SANG, Q.X.A. The significance of focal myoepithelial cell layer disruptions in human breast tumor invasion: a paradigm shift from the “protease-centered” hypothesis. *Experimental Cell Research*, v.301, p.103-118, 2004.

- MATSUBAYASHI, S.; YOSHIHARA, T. Carcinoma ex- pleomorphic adenoma of the salivary gland: An immunohistochemical study. *European Archives of Otorhinolaryngology*, v.264, p.789–795, 2007.
- MIQUEL-SERRA, L. *et al.* V3 versican isoform expression has a dual role in human melanoma tumor growth and metastasis. *Laboratory Investigation*, v.86, p.889–901, 2006.
- MISDORP, W. *et al.* Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat. In Second Series. WHO International Histological Classification Tumors of Domestic Animals. Washington: DC, AFIP; 1999. p.59.
- MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D.J. *Tumors in Domestic Animals*. 4. ed. Iowa State: University of California, 2002. p. 575-606.
- MITCHELL, L. *et al.* Mammary tumors in dogs: survey of clinical and pathological characteristics. *The Canadian Veterinary Journal*, v.15, n.5, p.131-138, 1974.
- MORRISON, W.B. Cancers in dogs and cats. Medical and surgical management. Philadelphia: Willians e Wilkins, 1998. 785p.
- MOULTON, J.E. *et al.* Canine Mammary Tumors. *Pathology Veterinary*, v.7, p.289-320, 1970.
- MOULTON, J.E. Tumors of the mammary gland. In: MOULTON, JE. (Ed.). *Tumors in Domestic Animals*, 3rd ed, Berkeley, CA: University of California Press, 1990, p.518–552.
- MUKARATIRWA, S.; NEDERBRAGT, H. Tenascin and proteoglycans: the role of tenascin and proteoglycans in canine tumours. *Research in Veterinary Science*, v.73, p.1-8, 2002.
- MUKARATIRWA, S. *et al.* Versican and hyaluronan expression in canine colonic adenomas and carcinomas: relation to malignancy and depth of tumour invasion. *Journal Comparative Pathology*, v.131, p.259-270, 2004.
- NIETO, A. *et al.* BRCA1 expression in canine mammary dysplasias and tumors: relationship with prognostic variables. *J Comp Pathol*, v.128, p.260-268, 2003.
- NOWAK, M. *et al.* Metastasis of mammary carcinoma to myocardium in a dog: clinical and morphological correlation. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, v.51, p.313-319, 2007.
- OWEN, L.N. TNM Classification of tumors in Domestic Animals. World Health Organization, Geneva, p.26-32, 1980.
- PALMER, T.E.; MONLUX, A.W. Acid mucopolysaccharides in mammary tumors of dog. *Veterinary Pathology*, v.16, p.493-509, 1979.
- PANDEY, P.R.; SAIDOU, J.; WATABE, K. Role of myoepithelial cells in breast tumor progression. *Frontiers in Bioscience*, v.15, p.226–236, 2011.

- PELETEIRO, M.C. Tumores mamários na cadela e na gata. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.89, n.509, p.10-29, 1994.
- PEREZ-ALENZA, M.D. et al. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *Journal of Small Animal Practice*, v.41, p.287-291, 2000.
- PRIOSOERYANTO, B.P. et al. Establishment of a cell line (MCM-B2) from a benign mixed tumour of canine mammary gland. *Research in Veterinary Science*, v.58, n.3, p.272-276, 1995.
- PUKKILA, M.J. et al. Versican expression in pharyngeal squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *Journal of Clinical Pathology*, v.57, n.7, p.735-739, 2004.
- PULLEY, L.T. Ultrastructural and histochemical demonstration of myoepithelium in mixed tumors of the canine mammary gland. *American Journal of Veterinary Research*, v.34, p.1513-1522, 1973.
- QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos – Novas perspectivas. In: CONGRESSO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 2002a, Proceedings..., p.183-190, Oeiras, Portugal.
- QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.57, n.543, p.119-127, 2002b.
- RAMALHO, L. N. Z. et al. 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*, v.43, n.4, p.424-429, 2006.
- RESTUCCI, B. et al. E-cadherin expression in normal and neoplastic canine mammary gland. *Journal Comparative Pathology*, v.116, n.2, p.191-202, 1997.
- RIBEIRO, L.G.R. et al. Expressão da Cox-2 nos carcinomas mamários de cadela. *Veterinária em Foco*, v.6, p.134-139, 2009.
- RICCIARDELLI, C. et al. Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix by prostate cancer cells promotes cell motility. *The Journal of Biological Chemistry*, v.282, n.14, p.10814–10825, 2007.
- RÖIJER, E. et al. Translocation, deletion/amplification, and expression of HMGIC and MDM2 in a carcinoma ex pleomorphic adenoma. *The American Journal of Pathology*, v.160, n.2, p.433-440, 2002.
- SÁNCHEZ-CÉSPEDES, R. et al. Myoepithelial cell layer integrity in canine mammary carcinoma. *Journal of Comparative Pathology*, v.145, n.1, p.25-30, 2011.
- SARLI, G. et al. Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.14, p.25-34, 2002.

SCHACHE, A.G. *et al.* Quantitative promoter methylation differentiates carcinoma ex-pleomorphic adenoma from pleomorphic salivary adenoma. *British Journal of Cancer*, v.103, p.1846–1851, 2010.

SCHMITT, F.C. Prognóstico do cancro da mama: avaliação do impacto de novos métodos face aos fatores prognósticos tradicionais. *Arquivo de Medicina*, v.8, p.319-324, 1994.

SCHMITT, F.C. Marcadores prognósticos em carcinoma mamário. In: ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALO, J. *Manual de Imunohistoquímica*. São Paulo, Sociedade Brasileira de Patologia, 1999, p.30-46.

SHENG, W. *et al.* The roles of versican v1 and v2 isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Molecular Biology of the Cell*, v.16, p.1330-1340, 2005.

SHENG, S. *et al.* Versican Mediates Mesenchymal–Epithelial Transition. *Molecular Biology of the Cell*, v.17, n.7, p.2009-2020, 2006.

SILVA, A.E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Carcinogênese Hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. *Revista Ciência Rural*, v.34, n.2, p.625-633, 2004.

SILVER, S.A.; TAVASSOLI, F.A. Mammary ductal carcinoma *in situ* with microinvasion. *Cancer*, v.82, n.12, p.2382-2390, 1998.

SKANDALIS *et al.* Versican but not decorin accumulation is related to malignancy in mammographically detected high density and malignant-appearing microcalcifications in non-palpable breast carcinomas. *BMC Cancer*, v.11, p.1-13, 2011.

STERNLICHT, M.D. *et al.* The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor. *Clinical Cancer Research*, v.3, p.1949-1958, 1997.

STEWART, T.H.M.; HEPPNER, G.H. Immunological enhancement of breast cancer. *Parasitology*, v.115, p.S141-S153, 1997

SUWIWAT, S. *et al.* Expression of extracellular matrix components versican, chondroitin sulfate, tenascin, and hyaluronan, and their association with disease outcome in node-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*, v.10, p.2491–2498, 2004.

TAKAHASHI, Y. *et al.* Versican G1 and G3 domains are upregulated and latent transforming growth factor- β binding protein-4 is downregulated in breast cancer stroma. *Breast Cancer*, v.19, n.1, p.46-53, 2011.

TATEYAMA, S. *et al.* Expression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in myoepithelial cells in canine mammary gland tumors. *Veterinary Pathology*, v.38, n.6, p.703-709, 2001.

TORÍBIO, J.M.M.L. *Caracterização clínica, classificação histopatológica e georreferenciamento das neoplasias mamárias em cadelas no município de Salvador*. 2008. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos)-Universidade Federal da Bahia, Salvador.

- UVA, P. *et al.* Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics*, v.135, n.10, p.1-20, 2009.
- VOZ, M.L. *et al.* First insight into the molecular basis of pleomorphic adenomas of the salivary glands. *Advances in Dental Research*, v.14, n.1, p.81-83, 2000.
- WEEN, M.O.; OEHLER, M.K.; RICCIARDELLI, C. Role of versican, hyaluronan and CD44 in ovarian cancer metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, v.12, p.1009-1029, 2011.
- WIGHT, T. N. Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Current Opinion in Cell Biology*, v.14, p.617-623, 2002.
- WILLEMS, S.M. *et al.* Running GAGs: myxoid matrix in tumor pathology revisited: What's in it for the pathologist? *Virchows Archiv*, v.456, n.2, p.181-192, 2010.
- WU, Y. *et al.* Overexpression of the C-terminal PG-M/versican domain impairs growth of tumor cells by intervening in the interaction between epidermal growth factor receptor and β 1-integrin. *Journal of Cell Science*, v.117, n.11, p.2227-2237, 2004.
- WU, Y.J. *et al.* The interaction of versican with its binding partners. *Cell Research*, v.15, n.7, p.483-494, 2005.
- XU, Z. *et al.* Aberrant p63 and WT-1 expression in myoepithelial cells of pregnancy-associated breast cancer: implications for tumor aggressiveness and invasiveness. *International Journal of Biological Sciences*, v.5, n.1, p.82-96, 2009.
- YAMAGATA, M. *et al.* Selective distributions of proteoglycans and their ligands in pericellular matrix of cultured fibroblasts. Implications for their roles in cell-substratum adhesion. *Journal of Cell Science*, v.106, p.55- 65, 1993.
- YAZIJI, H. *et al.* Detection of stromal invasion in breast cancer: the myoepithelial markers. *Advanced in Anatomy Pathological*, v.7, p.100-109, 2000.
- YEE, A. J.M. *et al.* The effect of versican G3 domain on local breast cancer invasiveness and bony metastasis. *Breast Cancer Research*, v.9, n.4, p.1-11, 2007.
- ZHANG, S.R. *et al.* A subset of morphologically distinct mammary myoepithelial cells lacks corresponding immunophenotypic markers. *Breast Cancer Research*, v.5, n.5, p.R151-R156, 2003.
- ZHENG, P.S. *et al.* Versican/PG-M G3 domain promotes tumor growth and angiogenesis. *The FASEB Journal*, v.18, n.6, p.754- 6, 2004.

10. ANEXOS

Anexo 1 - Estadiamento clínico (TNM) dos carcinomas mamários da cadela

Tumor Primário (T)	Linfonodos Regionais (N)
T0 Tumor não detectável	N0 Sem evidência de linfonodo regional (axilares ou inguinais)
T1 Tumor < 3 cm a : não fixo b : fixo à Pele c : fixo ao Músculo	N1 Linfonodo Ipsilateral envolvido a : não fixo b : fixo
T2 Tumor de 3 – 5 cm a : não fixo b : fixo à Pele c : fixo ao Músculo	N2 Linfonodos bilaterais envolvidos a : não fixo b : fixo
T3 Tumor > 5 cm a : não fixo b : fixo à Pele c : fixo ao músculo	Metástases à Distância (M)
T4 Tumor de qualquer tamanho (Carcinoma inflamatório)	M0 Sem evidência de metástase distante M1 Metástase distante incluindo linfonodos não-regionais

Agrupamento por estádios

Estadiamento da OMS modificado para tumores mamários da cadela

Estadiamento	T	N	M
Estádio I	T1	N0	M0
Estádio II	T2	N0	M0
Estádio III	T3	N0	M0
Estádio IV	T1; T2; T3	N1	M0
Estadio V	T1; T2; T3	N0 ; N1	M1

T- Tamanho do tumor primário; N – Linfonodo; M – Metástase

(FONTE: CAVALCANTI e CASSALI, 2006, modificado de OWEN, 1980).

Anexo 2 - Critérios utilizados na graduação de tumores mamários de cadela conforme o grau de malignidade.

Características	Pontuação
Formação tubular	
75% do tumor	1
10 a 75% do tumor	2
< 10% do tumor	3
Pleomorfismo nuclear	
Tamanho nuclear semelhante á célula normal (2 a 3 x o tamanho da hemácia)	1
Moderado aumento e variabilidade	2
Grande variação	3
Índice mitótico	
0 a 8 mitoses	1
9 a 16 mitoses	2
17 ou mais mitoses	3

Alocação do grau tumoral

<u>Total de escore</u>	<u>Grau de malignidade</u>
3 – 5	I
6 – 7	II
8 – 9	III

(FONTE: CASSALI *et al.*, 2011a, modificado de ELSTON e ELLIS, 1998)

Anexo 3- Certificado CETEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 219/2009**, relativo ao projeto intitulado "**Expressão de versican e a invasão estromal em carcinomas em tumores mistos da mama de cadelas**", que tem como responsável(is) **Geovanni Dantas Cassali**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **24/ 02/2010**.

Este certificado expira-se em **24/ 02/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 219/2009**, related to the project entitled "**Expression of versican and stromal invasion in carcinomas in mixed tumors of the canine mammary gland**", under the supervisors of **Geovanni Dantas Cassali**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **February 24, 2010**.

This certificate expires in **February 24, 2015**.

Belo Horizonte, 3 de Março de 2010.

Humberto A.M. Oliveira
Pl **Prof. Humberto Pereira Oliveira**
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@proq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

Anexo 4- Comprovante de submissão

Elsevier Editorial System(tm) for The Veterinary Journal
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Versican expression in canine carcinomas in benign mixed tumors: study of pathological clinical factors, invasion and overall survival

Article Type: Original Article

Keywords: Versican, Mixed tumor, Carcinoma, Invasion, Canine

Corresponding Author: Prof. Geovanni D Cassali, PhD

Corresponding Author's Institution: UFMG

First Author: Karine A Damasceno, DVM

Order of Authors: Karine A Damasceno, DVM; Angelica C Bertagnolli, PhD.; Alessandra Estrela-Lima, PhD.; Lorena R Ribeiro, DVM; Bruna S Rabelo, Academic; Cecilia B Campos, DVM; Andre B Barros, MSc; Geovanni D Cassali, PhD

Abstract: Components of the extracellular matrix have been studied with the attempt to elucidate mechanisms involved with biological behavior of tumors. Presence of the proteoglycan versican has been strongly associated to cancer development and progression. Carcinomas in benign mixed tumors (CBMT) are the most common malignant tumor in female dogs and can serve as a model for studies on tumor progression. The aim of this paper was to evaluate the expression of versican in in situ and invasive carcinomatous areas of CBMT, verifying possible associations with other classic prognostic factors and overall survival. Clinical staging, histological grade, Nottingham Prognostic Index (NPI), immunohistochemical staining for versican, E-cadherin, Ki-67 and confirmation of invasion areas with staining for p63 and smooth muscle α -actin (α -SMA) were performed on 49 cases of CBMT. Evaluation of double staining for p63 and α -SMA indicated that myoepithelial cells still present in carcinomas with invasion areas presented weak or loss of staining of at least one markers. Versican immunoreactivity was less intense adjacent to in situ carcinomatous regions when compared to invasive regions in which staining was found as more extensive areas with strong expression ($p < 0.0001$). Direct relation between versican and invasion suggests the role of this molecule in tumor progression. Association between the studied proteoglycan and prognostic factors was not observed, indicating that the isolated evaluation of versican does not represent an independent prognostic factor in CBMT in female dogs.

Anexo 5- Produção científica

PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO DE MARÇO DE 2010 A FEVEREIRO DE 2012

RELACIONADA À DISSERTAÇÃO:

a) Artigo submetido:

DAMASCENO, K.A.; BERTAGNOLLI, A.C.; ESTRELA-LIMA, A.; RIBEIRO, L.G.R.; RABELO, B.S.; CAMPOS, C.B.; BARROS, A.L.B.; CASSALI, G.D. Versican expression in canine carcinomas in benign mixed tumors: study of pathological clinical factors, invasion and overall survival. Revista The Veterinary Journal.

b) Resumos Publicado em Anais/Periódicos de Eventos:

DAMASCENO, K. A.; ESTRELA-LIMA, A.; BERTAGNOLLI, A. C.; GAMBA, C. O.; DIAS, E. J.; MELO, A.P.D.; CASSALI, G. D. Expressão de versican e a invasão estromal nos carcinomas em tumores mistos mamários em cadelas. In: II Encontro de Patologia do Programa de Pós Graduação em Patologia da UFMG, Belo Horizonte/MG, 2010.

DAMASCENO, K.A.; BERTAGNOLLI, A.C.; ESTRELA-LIMA, A.; RIBEIRO, L.G.R.; RABELO, B.S.; CAMPOS, C.B.; CAMPOS, L.C.; CASSALI, G.D. Avaliação da integridade mioepitelial e membrana basal nos carcinomas em tumores mistos mamários caninos: modelo de progressão tumoral. In: Congresso Brasileiro de Patologia, Maceió/AL, Patología Revista Latinoamericana, v. 49, n. 3, p. 289-290, 2011.

NÃO RELACIONADA COM A DISSERTAÇÃO:

a) Artigos publicados:

ESTRELA-LIMA, A.; ARAUJO, M.S.S.; COSTA-NETO, J.M.C.; ROCHA, L.G.R.; DAMASCENO, K.A.; D'ASSIS, M.J.M.H.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; SERAKIDES, R., CASSALI, G.D. Understanding of the immunological heterogeneity of canine mammary carcinomas to provide immunophenotypic features of circulating leukocytes as clinically relevant prognostic biomarkers. Breast Cancer Research and Treatment, p. 1 - 13, 2011.

GAMBA,C.O.; DAMASCENO, K.A.; CAMPOS, C.B.; FERREIRA, E.; CASSALI, G.D. Cystadenocarcinoma simulating hemangiosarcoma of the salivary gland in dog: case report. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 63, n. 3, p.574-578, 2011.

CASSALI, G.D.; LAVALLE, G.E.; DE NARDI, A.B.; FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A.C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, C.A.; DALECK, C.R.; SALGADO, B.S.; FERNANDES, C.G.; SOBRAL, R.A.; AMORIM, R. L.; GAMBA, C.O.; DAMASCENO, K.A.; AULER, P.A.; MAGALHAES, G.M.; SILVA, J.O.; RAPOSO, J.B.; FERREIRA, A.M.R.; OLIVEIRA, L.O.; MALM, C.; ZUCCARI, D.A.P.C.; TANAKA, N.M.; RIBEIRO, L. R.; CAMPOS, L.C.; SOUZA, C.M.; LEITE, J.S.; SOARES, L.M.C.; CAVALCANTI, M.F.; FONTELES, Z. G.C.; SCHUCH, I.D.; PANIAGO, J.; OLIVEIRA, T.S.; TERRA, E.M.; CASTANHEIRA, T.L.L.; FELIX, A.O.C.; CARVALHO, G.D.; GUIM, T.N.; GARRIDO, E.;

FERNANDES, S.C.; MAIA, F.C.L.; DAGLI, M.L. Z.; ROCHA, N.S.; FUKUMASU, H.; GRANDI, F.; MACHADO, J.P.; SILVA, S.M.M.S.; BEZERRIL, J.E.; FREHSE, M.S.; ALMEIDA, E.C.P.; CAMPOS, C.B. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumours. *Brazilian Journal Veterinary Pathology*, v. 4, p. 153-180, 2011.

SOUZA, C.M.; DAMASCENO, K.A.; GAMBA, C.O.; CAMPOS, L.C.; CAMPOS, C.B.; CASSALI, G.D. Canine sweat gland mixed tumor - case report. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 39, n. 4, p. 1-4, 2011.

GAMBA, C.O.; DAMASCENO, K.A.; FERREIRA, E.; MALTA M.C.; CASSALI, G.D. Tubulopapillary carcinoma of the mammary gland in a maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*): histopathological and immunophenotypical analysis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Online)*, 2012.

b) Artigos submetidos:

DAMASCENO, K.A.; RABELO, B.S.; GAMBA, C.O.; SOUZA, C.M.; CAMPOS, L.C.; CAMPOS, C.B.; FERREIRA, E.; CASSALI, G.D. Análise histoquímica e imunofenotípica de adenocarcinoma retal mucinoso em cão: relato de caso. *Brazilian Journal Veterinary Pathology*, 2012.

CAMPOS, L.C.; SOUZA, C.M.; CAMPOS, C.B.; GAMBA, C.O.; DAMASCENO, K.A.; ARAUJO, M.R.; ARAUJO, M.R.; LAVALLE, G.E.; CASSALI, G.D. Abordagem histomorfologica e imunofenotípica de adenocarcinoma papilar de seio nasal: relato de caso. *Clínica Veterinária*, 2012.

b) Resumos publicados em anais/periódicos de eventos

DAMASCENO, K.A.; BERTAGNOLLI, A.C.; DIAS, E.J.; FERREIRA, E.; CASSALI, G.D. Tumores Mamários Mistos Da Cadela: Análise Da Progressão Tumoral. VI ONCOVET, 2010, Águas de Lindóia. Anais do VI Oncovet & III Simpósio de Oncologia Veterinária, p. 41, 2010.

DAMASCENO, K.A.; ESTRELA-LIMA, A.; ARAUJO, M.S.S.; COSTA-NETO, J.M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; BARROUIN-MELO, S.M.; CARDOSO, S.V.; MARTINS-FILHO, O.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. In: VI ONCOVET, 2010, Águas de Lindóia. Anais do VI Oncovet & III Simpósio de Oncologia Veterinária, p. 38-38, 2010.

DAMASCENO, K.A.; RABELO, B.S.; GAMBA, C.O.; SOUZA, C.M.; CAMPOS, L.C.; CAMPOS, C.B.; FERREIRA, E.; CASSALI, G.D. Análise histoquímica e imunofenotípica de adenocarcinoma retal mucinoso em cão: relato de caso. In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Goiânia/GO, 2011.

DAMASCENO, K.A.; GAMBA, C.O.; RIBEIRO, L.G.R.; ESTRELA-LIMA, A.; FERREIRA, E.; CASSALI, G.D. Análise histomorfológica e imunofenotípica de hiperplasia de células colunares associado a carcinoma cribriforme na glândula mamária felina: estudo de caso. In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Goiânia/GO, 2011.

BERTAGNOLLI, A.C.; ROCHA, R.M.; DAMASCENO, K.A.; GAMBA, C.O.; DIAS, E.J.; PRIMO, J.; CASSALI, G.D. Progressão maligna dos tumores mistos benignos mamários da cadela: um estudo imuno-histoquímico empregando a tecnologia dos *arrays* de tecidos. In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Goiânia/GO, 2011.

AULER, P.A.; GAMBA, C.O.; DAMASCENO, K.A.; LAVALLE, G.E.; CASSALI, G.D. Carcinoma de células escamosas em prepúcio de cão apresentando metástase em linfonodo inguinal: relato de caso. In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Goiânia/GO, 2011.

CAMPOS, L.C.; SOUZA, C.M.; CAMPOS, C.B.; GAMBA, C.O.; DAMASCENO, K.A.; ARAUJO, M.R.; ARAUJO, M.R.; LAVALLE, G.E.; CASSALI, G.D. Abordagem histomorfologica e imunofenotípica de adenocarcinoma papilar de seio nasal: relato de caso. In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Goiânia/GO, 2011.

CAMPOS, C.B.; DAMASCENO, K.A.; GAMBA, C.O.; SOUZA, C.M.; CAMPOS, L.C.; ESTRELA-LIMA, A.; FERREIRA, A.; CASSALI, G.D. Estudo imuno-histoquímico da expressão de e-caderina e sua relação com sobrevida global em tumores mamários caninos. In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Goiânia/GO, 2011.

SOUZA, C.M.; GAMBA, C.O.; DAMASCENO, K.A.; SILVA, A.C.A.; LOPES, M.T.P., FERREIRA, M.A.N., CASSALI, G.D. Caracterização morfológica do carcinoma mamário murino 4t1. In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Goiânia/GO, 2011.

GAMBA, C.O.; SILVA, J.O.; CAMPOS, L.C.; BERNARDES, V.F.; DAMASCENO, K.A.; SOUZA, C. M.; CASSALI, G.D. Tumor estromal gastrointestinal canino: relato de caso com ênfase em diagnóstico diferencial. In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Goiânia/GO, 2011.

VIEIRA, A.L.S.; COSTA, A.M.; DAMASCENO, K.A.; GAMBA, C.O.; CASSALI, G.D.; CASSALI, G.D.; SANTOS R.L.; PAIXAO, T.A. Carcinoma papilar ovariano em onça (*PANTHERA ONCA*). In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Goiânia/GO, 2011.

OLIVEIRA, N.M.; SILVA, I.L.D.; DAMASCENO, K.A.; BEZERRA JUNIOR, P.S.; CASSALI, G. D.; FERREIRA, E. Utilização da dupla marcação imuno-histoquímica na identificação de em carcinomas *in situ* da mama canina. In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Goiânia/GO, 2011.

VIMEIRO, T.R.; DAMASCENO, K.A.; ARAUJO, M.R.; SILVA, J.O.; ORLANDO, D.R.; SEIXAS, J. N.; CASSALI, G.D.; FERREIRA, E. Risco de progressão neoplásica na mama canina: carcinoma ductal *in situ* surgindo em uma atipia epitelial plana. In: V Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Goiânia/GO, 2011.

SOUZA, C. M.; VIERA, T. S.; DAMASCENO, K. A.; GAMBA, C. O.; CAMPOS, L.C.; CAMPOS, C. B.; AULER, P.A.; CASSALI, G. D. Tumor misto de glândula sudorípara em cão- relato de caso In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Goiânia/GO, 2011.

SOUZA, C.M.; DAMASCENO, K.A.; REIS, D.C.; ARAUJO, M.R.; CAMPOS, L.C.; SILVA, A.C. A.; LOPES, M.; RUSSO, R.C.; FERREIRA, M.; CASSALI, G. D. Avaliação da resposta inflamatória linfocítica no carcinoma mamário murino 4T1. In: XXVII Congresso

Brasileiro de Patologia, Maceió/AL, 2011.

RABELO, B.S.; DAMASCENO, K.A.; GAMBA, C.O.; CAMPOS, C.B.; CASSALI, G. D. Carcinoma ductal/lobular misto: modelo animal. In: 13º Simpósio Mineiro de Oncologia, BeloHorizonte/MG, 2011.

PRÊMIO:

III Prêmio José Luiz Guerra em Oncologia Veterinária - Primeiro Lugar – Melhor Trabalho, Associação Brasileira de Oncologia Veterinária - VI ONCOVET.

DAMASCENO, K.A.; ESTRELA-LIMA, A.; ARAUJO, M.S.S.; COSTA-NETO, J.M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; BARROUIN-MELO, S.M.; CARDOSO, S.V.; MARTINS-FILHO, O.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. In: VI ONCOVET, 2010, Águas de Lindóia.