

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
Tese será disponibilizado
somente a partir de 25/06/2023.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA, CELULAR E IMUNO-HISTOQUÍMICA DO
CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONAIS DA BEXIGA DE CÃES**

VERÔNICA MOLLICA GOVONI

BOTUCATU-SP
2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA, CELULAR E IMUNO-HISTOQUÍMICA DO
CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONAIS DA BEXIGA DE CÃES**

VERÔNICA MOLLICA GOVONI

Tese apresentada ao Programa de
Biotecnologia Animal da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Estadual Paulista Julio de
Mesquita Filho – Campus de Botucatu, para a
obtenção do título de Doutora

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca
Alves

Co-orientadora (Brasil): Prof. Dra. Juliany
Gomes Quitzan

Co- orientadora (Itália): Prof. Dra. Valeria
Grieco

BOTUCATU-SP
2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Govoni, Verônica Mollica.

Avaliação morfológica, celular e imuno-histoquímica do carcinoma de células transicionais da bexiga de cães / Verônica Mollica Govoni. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Carlos Eduardo Fonseca Alves

Coorientador: Juliany Gomes Quitzan

Coorientador: Valeria Grieco

Capes: 50501070

1. Cães - Doenças. 2. Bexiga - Câncer. 3. Trato urinário. 4. Neoplasias urológicas. 5. Oncologia.

Palavras-chave: Cão; Carcinoma urotelial; Oncologia; Trato urinário.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.: Carlos Eduardo Fonseca Alves (**orientador**)

Instituição: Universidade Paulista (UNIP) – Bauru, orientador pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Botucatu

Profa. Dra.: Priscila Emiko Kobayashi

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlia de Mesquita Filho (UNESP) – Botucatu e FAEF - Garça

Profa. Dra.: Renee Laufer Amorim

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) - Botucatu

Profa. Dra.: Maria Lucia Zaidan Dagli

Instituição: Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo

Profa. Dra.: Cristina de Oliveira Massoco Salles

Instituição: Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese de doutorado à minha querida avó Suzana Maria de Tolosa Mollica, minha torcedora árdua e presente nas minhas mais doces lembranças (*in memoriam*).

EPIÍFRAGE

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for.
O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem
qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves, por me ter aceitado de braços abertos como sua orientada, me ajudando desde o início do meu projeto não apenas em sua execução como na gestão de novas ideias e na resolução de problemas, sempre de maneira muito solícita e paciente. Além disso, me permitiu o contato com a professora Valeria Grieco, possibilitando meu doutorado sanduíche.

À Prof. Dra. Juliany Gomes Quitzan, por ter sido minha primeira orientadora, me incluindo em seu grupo de pesquisa e trabalho e permitindo minha inserção na rotina do Hospital Veterinário, execução de projetos paralelos e organização de cursos, além de muito ter me ensinado sobre cirurgias do trato urinário e procedimentos diagnósticos.

À Prof. Dra. Renee Laufer Amorim, por ter nos auxiliado sempre com suas ideias, conselhos e direcionamentos, além da ajuda prática na leitura de lâminas histológicas. Desde a graduação é uma professora que muito contribuiu para minha formação, em minha “segunda área preferida”, e de fundamental importância para o tema com o qual venho trabalhando, que é a patologia.

À Prof. Dra. Valeria Grieco, por ter me recebido na Università degli Studi di Milano (UniMi), Itália de forma tão acolhedora como sua orientada; pelos ensinamentos em patologia e todo acompanhamento teórico e prático dos meus experimentos, tanto presencialmente como à distância. Foi uma oportunidade e uma experiência incrível, tanto pessoal quanto profissional.

Aos professores de cirurgia da UniMi, Damiano Stefanello e Stefano Romussi, que permitiram que eu os acompanhasse durante as cirurgias nos meus intervalos de experimento, me agregando muito conhecimento.

À minha mãe Maria de Lourdes T. Mollica Govoni, que sempre me apoiou em todos os aspectos, sendo a maior incentivadora da construção da minha carreira e também minha maior educadora desde a infância, além de minha melhor amiga. Veio dela a valorização pelo estudo, minha admiração pela medicina veterinária e o fascínio pelos animais. Se cheguei até aqui, foi graças a força que me transmite diariamente.

Ao meu irmão Enrico Mollica Govoni, por ser o irmão e amigo fonte de força em tantos momentos que precisei, nem sempre fáceis para nós. Mesmo sendo irmão mais novo, é ele meu exemplo de planejamento, responsabilidade e organização que muito me ensinaram durante meu doutorado. E por sempre me acompanhar em cada passo, vibrando por minhas conquistas. São ele e minha mãe, o meu alicerce.

Ao meu namorado Claudio Pigoli, presente do meu doutorado sanduíche na Itália, por ser meu parceiro, seja perto ou a muitos km de distância, sendo uma fonte de alegria e calma. Contribuiu no auxílio da análise das amostras e na execução das imuno-histoquímicas, além de me acolher em sua casa em plena pandemia, me dando todo suporte, e me presenteando com uma segunda família.

Aos meus sogros Paola Tomasoni e Daniele Pigoli, aos meus cunhados Elena Pigoli e Daniele Gazzoli, e suas duas filhas Marta e Elisa, por terem sido e se tornado uma segunda família, me dando amparo na situação mais inesperada. Minha quarentena longe de casa foi feliz e leve graças as pessoas maravilhosas que me ajudaram, e foi o que me permitiu finalizar a minha empreitada.

Aos colegas do nosso grupo de pesquisa da Patologia de Botucatu, e aos de Milão, que de alguma forma contribuíram para a execução do projeto.

Aos veterinários que nos forneceram amostras coletadas durante o transoperatório e/ou blocos parafinados de carcinoma urotelial de cão: Dr. Felipe Sueiro, Dr. Rodrigo Ubukata, Dra. Karen Abrantes Assunção. Ao Hospital Veterinário

da UNESP de Botucatu, pelas amostras utilizadas da rotina, e à UniMi pela amostragem italiana de casos.

Aos amigos, sejam eles de Guaratinguetá, Botucatu, Itália, ou outro, que fizeram parte de alguma forma desta trajetória, e àqueles que se mantiveram até aqui. Em especial, agradeço à amiga Priscila Emiko Kobayashi (Sarna), pelo apoio, conversas sobre patologia e sobre a vida, e pelos conselhos.

Ao programa de Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP.

À CAPES - O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma colaboraram, participaram ou torceram por mim e pelo trabalho.

LISTA FIGURAS

ARTIGO 1

Figura 1. A. TCC papillary and infiltrating (case 31). HE, 5x magnification. B. The same tumor at 10x magnification, focusing on tumor infiltration.....	38
Figura 2. A. TCC with histological grade II (case 1), HE, 40x magnification. B. TCC with histological grade III (case 3), HE, 40x magnification. Bigger nucleus size, anisocariosis and amount of nucleoli evident in grade III can be observed.....	39
Figura 3. A. TCC with muscular infiltration (case 1), HE, 20x magnification. B. TCC with lymphatic infiltration (case 11), HE, 40x magnification.....	39
Figura 4. Survival curves (Kaplan-Meier) A. Survival curve considering types of treatment. B. Survival curve considering histological type. C. Survival curve considering muscle invasion. D. Survival curve considering lymphatic invasion.....	42

ARTIGO 2

Figura 1. Immunostaining panel. A. UC papillary and infiltrating with mild Caveolin-1 (case 6), 400x magnification. B. UC papillary and infiltrating with intermediate Caveolin-1 (case 30), 400x magnification. C. UC papillary and infiltrating with high Caveolin-1 (case 7), 400x magnification. D. UC papillary and infiltrating with mild GATA-3 (case 2), 200x magnification. E. UC non papillary and infiltrating with intermediate GATA-3 (case 22), 200x magnification. F. UC papillary and infiltrating with high GATA-3 (case 30), 200x magnification. G. UC papillary and infiltrating with mild ki67 (case 15), 200x magnification. H. UC papillary and infiltrating with intermediate Ki67 (case 26), 200x magnification. I. UC non papillary and infiltrating with high Ki67 (case 14), 200x magnification.....	58
Figura 2. Spearman's graph of multiple correlations with the respective correlation coefficients.....	59

SUMÁRIO

Capítulo 1.....	15
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 O carcinoma de células de transição (CCT)	18
2.2 Epidemiologia do CCT da bexiga.....	22
2.3 Tratamento clínico convencional e prognóstico	24
2.4 Terapias emergentes	25
2.5 Marcadores imuno-histoquímicos.....	27
3. OBJETIVO GERAL	18
3.1 Objetivos específicos	28
REFERÊNCIAS.....	29
Capítulo 2 - TRABALHO CIENTÍFICO 1	38
1.Introduction.....	40
2. Materials and Methods.....	41
2.1 <i>Study design</i>	41
2.2 <i>Histological analysis</i>	42
2.3 <i>Statistical analysis</i>	42
2.4 <i>Ethics statement</i>	43
3. Results.....	43
4. Discussion.....	49
References.....	54
Capítulo 3 - TRABALHO CIENTÍFICO 2	59
1.Introduction.....	60
2. Materials and Methods.....	61
2.1 <i>Ethic statement</i>	61
2.2 <i>Study design</i>	61
2.3 <i>Histological analysis</i>	61
2.4 <i>Immunohistochemical analysis</i>	61
2.4.1 <i>ki67</i>	61
2.4.2 <i>GATA-3 and Caveolin-1</i>	62
2.5 <i>Statistical analysis</i>	62

3. Results.....	62
3.1 <i>Clinicopathological and immunohistochemical data</i>	62
3.2 <i>Associations between all pathological and immunohistochemical variables</i>	65
4. Discussion.....	67
5. Conclusions.....	68
References.....	69

RESUMO

GOVONI, V. M. **Avaliação morfológica, celular e imuno-histoquímica do carcinoma de células transicionais da bexiga de cães** [Morphological, cellular and immunohistochemical evaluation of transitional cell carcinoma of the bladder of dogs] 2021. 71 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) - Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2021.

O carcinoma de células transicionais canino (CCT) é considerado o tumor maligno mais comum do trato urinário em cães. Devido à sua localização anatômica e progressão da doença no momento do diagnóstico, o tratamento desse câncer representa um desafio para a medicina veterinária, sendo o cão um modelo natural para a doença em humanos. O conhecimento sobre o CCT canino é limitado, portanto, o objetivo do presente estudo é realizar uma caracterização clínica, morfológica e imuno-histoquímica deste tumor. Dados clínicos de um total de 32 amostras da Universidade Estadual Paulista, do Laboratório VetPat e da Universidade de Milão (Itália) obtidas entre janeiro de 2000 e junho de 2020 foram utilizados para as avaliações clínico-patológica e imunohistoquímica dos marcadores Ki67, GATA-3 e Caveolina-1. Os fatores clínico-patológicos que apresentaram valor prognóstico no primeiro trabalho científico foram o tipo de tratamento e a invasão linfática. E o segundo trabalho científico demonstrou que os biomarcadores GATA-3 e Caveolina-1 assim como as variáveis invasão linfática, tipo e grau histológico são potenciais fatores preditores do comportamento do CCT canino.

Palavras-chave: carcinoma urotelial, cão, oncologia, trato urinário

ABSTRACT

GOVONI, V. M. **Morphological, cellular and immunohistochemical evaluation of transitional cell carcinoma of the bladder of dogs** [Avaliação morfológica, celular e imuno-histoquímica do carcinoma de células transicionais da bexiga de cães] 2020. 71 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) - Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2021.

Canine transitional cell carcinoma (TCC) is considered the most common malignant tumor of the urinary tract in dogs. Due to its anatomical location and disease progression at the time of diagnosis, the treatment of this cancer represents a challenge for veterinary medicine, with the dog being a natural model for the disease in humans. The knowledge about canine TCC is limited, therefore, the aim of the present study is to perform a clinical, morphological and immunohistochemical characterization of this tumor. Clinical data from a total of 32 samples from the Universidade Estadual Paulista, VetPat Laboratory and University of Milan (Italy) obtained between January 2000 and June 2020 were used for the clinicopathological and immunohistochemical evaluations of Ki67, GATA-3 markers and Caveolin-1. The clinicopathological factors that showed prognostic value in the first scientific work were the type of treatment and lymphatic invasion. And the second scientific work demonstrated that the biomarkers GATA-e and Caveolin-1, as well as the variables lymphatic invasion, histological type and histological grade are potential predictors of canine TCC behavior.

Key- words: urothelial carcinoma, dog, oncology, urinary tract

References

1. Knapp DW, Dhawan D, Ramos-Vara JA, Ratliff TL, Cresswell GM, Utturkar S, et al. Naturally-Occurring Invasive Urothelial Carcinoma in Dogs, a Unique Model to Drive Advances in Managing Muscle Invasive Bladder Cancer in Humans. *Front Oncol.* 2019;9:1493.
2. Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *Eur Urol.* 2017;71(1):96-108.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019;69(1):7-34.
4. Knapp DW, Ramos-Vara JA, Moore GE, Dhawan D, Bonney PL, Young KE. Urinary bladder cancer in dogs, a naturally occurring model for cancer biology and drug development. *ILAR J.* 2014;55(1):100-18.
5. Ro JY, Staerkel GA, Ayala AG. Cytologic and histologic features of superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am.* 1992;19(3):435-53.
6. He Y, Wang N, Zhou X, Wang J, Ding Z, Chen X, et al. Prognostic value of ki67 in BCG-treated non-muscle invasive bladder cancer: a meta-analysis and systematic review. *BMJ Open.* 2018;8(4):e019635.
7. Gambim VV, Laufer-Amorim R, Fonseca-Alves RH, Grieco V, Fonseca-Alves CE. A Comparative Meta-Analysis and in silico Analysis of Differentially Expressed Genes and Proteins in Canine and Human Bladder Cancer. *Frontiers in Veterinary Science.* 2020;7.
8. Dhawan D, Hahn NM, Ramos-Vara JA, Knapp DW. Naturally-occurring canine invasive urothelial carcinoma harbors luminal and basal transcriptional subtypes found in human muscle invasive bladder cancer. *PLoS Genet.* 2018;14(8):e1007571.
9. Fong A, Garcia E, Gwynn L, Lisanti MP, Fazzari MJ, Li M. Expression of caveolin-1 and caveolin-2 in urothelial carcinoma of the urinary bladder correlates with tumor grade and squamous differentiation. *Am J Clin Pathol.* 2003;120(1):93-100.
10. D'Andrea D, Moschini M, Foerster B, Abufaraj M, Margulis V, Karam J, et al. Caveolin-1 Expression in Upper Tract Urothelial Carcinoma. *Eur Urol Focus.* 2019;5(1):97-103.
11. Williams TM, Lisanti MP. The caveolin proteins. *Genome Biol.* 2004;5(3):214.

12. Deb M, Sengupta D, Kar S, Rath SK, Parbin S, Shilpi A, et al. Elucidation of caveolin 1 both as a tumor suppressor and metastasis promoter in light of epigenetic modulators. *Tumour Biol.* 2014;35(12):12031-47.
13. Miettinen M, McCue PA, Sarlomo-Rikala M, Rys J, Czapiewski P, Wazny K, et al. GATA3: a multispecific but potentially useful marker in surgical pathology: a systematic analysis of 2500 epithelial and nonepithelial tumors. *Am J Surg Pathol.* 2014;38(1):13-22.
14. Patient RK, McGhee JD. The GATA family (vertebrates and invertebrates). *Curr Opin Genet Dev.* 2002;12(4):416-22.
15. Miyamoto H, Izumi K, Yao JL, Li Y, Yang Q, McMahon LA, et al. GATA binding protein 3 is down-regulated in bladder cancer yet strong expression is an independent predictor of poor prognosis in invasive tumor. *Hum Pathol.* 2012;43(11):2033-40.
16. Naik M, Rao BV, Fonseca D, Murthy SS, Giridhar A, Sharma R, et al. GATA-3 Expression in all Grades and Different Variants of Primary and Metastatic Urothelial Carcinoma. *Indian J Surg Oncol.* 2021;12(Suppl 1):72-8.
17. Liang Y, Heitzman J, Kamat AM, Dinney CP, Czerniak B, Guo CC. Differential expression of GATA-3 in urothelial carcinoma variants. *Hum Pathol.* 2014;45(7):1466-72.
18. Fonseca-Alves CE, Bento DD, Torres-Neto R, Werner J, Kitchell B, Laufer-Amorim R. Ki67/KIT double immunohistochemical staining in cutaneous mast cell tumors from Boxer dogs. *Res Vet Sci.* 2015;102:122-6.
19. Abadie JJ, Amardeilh MA, Delverdier ME. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. *American Veterinary Medical Association.* 1999;215(11):1629-34.
20. Sierra Matiz OR, Santilli J, Anai LA, Da Silva MCL, Sueiro FA, Sequeira JL, et al. Prognostic significance of Ki67 and its correlation with mitotic index in dogs with diffuse large B-cell lymphoma treated with 19-week CHOP-based protocol. *J Vet Diagn Invest.* 2018;30(2):263-7.
21. Bergin IL, Smedley RC, Esplin DG, Spangler WL, Kiupel M. Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. *Veterinary Pathology.* 2011;48(1):41-53.
22. Kaszak I, Ruszczak A, Kanafa S, Kacprzak K, Król M, Jurka P. Current biomarkers of canine mammary tumors. *Acta Vet Scand.* 2018;60(1):66.
23. Gönül II, Akyürek N, Dursun A, Küpeli B. Relationship of Ki67, TP53, MDM-2 and BCL-2 expressions with WHO 1973 and WHO/ISUP grades, tumor category and overall patient survival in urothelial tumors of the bladder. *Pathol Res Pract.* 2008;204(10):707-17.
24. Chirife AM, Villasante N, Rojas Bilbao É, Casas G. Individual patient risk of progression of urinary bladder papillary tumors estimated from biomarkers at initial transurethral resection of bladder tumor. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2019;145(7):1709-18.
25. Geelvink M, Babmorad A, Maurer A, Stöhr R, Grimm T, Bach C, et al. Diagnostic and Prognostic Implications of FGFR3. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9).
26. Wang L, Feng C, Ding G, Ding Q, Zhou Z, Jiang H, et al. Ki67 and TP53 expressions predict recurrence of non-muscle-invasive bladder cancer. *Tumour Biol.* 2014;35(4):2989-95.
27. Thakur B, Kishore S, Dutta K, Kaushik S, Bhardwaj A. Role of p53 and Ki-67 immunomarkers in carcinoma of urinary bladder. *Indian J Pathol Microbiol.* 2017;60(4):505-9.
28. Hanazono K, Nishimori T, Fukumoto S, Kawamura Y, Endo Y, Kadosawa T, et al. Immunohistochemical expression of p63, Ki67 and β -catenin in canine transitional cell carcinoma and polypoid cystitis of the urinary bladder. *Vet Comp Oncol.* 2016;14(3):263-9.
29. DJ M, J E, W I, RM J, M P, KG T. *Histological Classification of Tumors of the Urinary System o Domestic Animals.* Washington D.C.: World Health Organization; 2004.

-
30. Valli VE, Norris A, Jacobs RM, Laing E, Withrow S, Macy D, et al. Pathology of canine bladder and urethral cancer and correlation with tumour progression and survival. *J Comp Pathol.* 1995;113(2):113-30.
 31. Romansik EM, Reilly CM, Kass PH, Moore PF, London CA. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol.* 2007;44(3):335-41.
 32. Pett MA, Lackey NR, Sullivan JJ. Making sense of factor analysis: The use of factor analysis for instrument development in health care research 2003.
 33. Douglass JP, Berry CR, James S. Ultrasonographic adrenal gland measurements in dogs without evidence of adrenal disease. *Vet Radiol Ultrasound.* 1997;38(2):124-30.
 34. Ressel L, Else RW, Poli A, Argyle DJ. Aberrant subcellular immunolocalization of NOTCH-1 activated intracellular domain in feline mammary tumours. *J Comp Pathol.* 2014;150(4):366-72.
 35. Leivo MZ, Elson PJ, Tacha DE, Delahunt B, Hansel DE. A combination of p40, GATA-3 and uroplakin II shows utility in the diagnosis and prognosis of muscle-invasive urothelial carcinoma. *Pathology.* 2016;48(6):543-9.
 36. Zaleski M, Gogoj A, Walter V, Raman JD, Kaag M, Merrill SB, et al. Mitotic activity in noninvasive papillary urothelial carcinoma: its value in predicting tumor recurrence and comparison with the contemporary 2-tier grading system. *Hum Pathol.* 2019;84:275-82.
 37. Brunocilla E, Perneti R, Martorana G. The prognostic role of lymphovascular invasion in urothelial-cell carcinoma of upper and lower urinary tract. *Anticancer Res.* 2011;31(10):3503-6.
 38. Danzig MR, Mallin K, McKiernan JM, Stadler WM, Sridhar SS, Morgan TM, et al. Prognostic importance of lymphovascular invasion in urothelial carcinoma of the renal pelvis. *Cancer.* 2018;124(12):2507-14.
 39. Mathieu R, Lucca I, Rouprêt M, Briganti A, Shariat SF. The prognostic role of lymphovascular invasion in urothelial carcinoma of the bladder. *Nat Rev Urol.* 2016;13(8):471-9.