



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA**

**TATIANY LUIZA SILVEIRA**

**SENSIBILIDADE DA CITOINCLUSÃO (PAAF) PARA  
DETECÇÃO DE CK5, RE E RP NO CARCINOMA  
PRIMÁRIO DE MAMA NA CADELA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha

**Botucatu  
2015**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

**SENSIBILIDADE DA CITOINCLUSÃO (PAAF) PARA  
DETECÇÃO DE CK5, RE E RP NO CARCINOMA  
PRIMÁRIO DE MAMA NA CADELA**

TATIANY LUIZA SILVEIRA

Botucatu – SP  
Fevereiro / 2015

Tatiany Luiza Silveira

**SENSIBILIDADE DA CITOINCLUSÃO (PAAF)  
PARA DETECÇÃO DE CK5, RE E RP NO  
CARCINOMA PRIMÁRIO DE MAMA NA CADELA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha

Botucatu  
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Silveira, Tatiany Luiza.

Sensibilidade da citoinclusão (PAAF) para detecção de CK5, RE e RP no carcinoma primário de mama na cadela / Tatiany Luiza Silveira. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Noeme Sousa Rocha

Capes: 40105008

1. Cão - Doenças. 2. Câncer em cão. 3. Estrógenos - Receptores. 4. Progesterona - Receptores. 5. Imuno-histoquímica.

Palavras-chave: Citoinclusão; Citoqueratina 5; Imunoistoquímica; Receptor de estrógeno e progesterona; Tumor mamário em cadelas.

Nome do Autor: Tatiany Luiza Silveira

Título: SENSIBILIDADE DA CITOINCLUSÃO (PAAF) PARA DETECÇÃO DE CK5, RE E RP NO CARCINOMA PRIMÁRIO DE MAMA NA CADELA.

COMISSÃO EXAMINADORA

---

**Profa. Dra.: Noeme Sousa Rocha**

Presidente e Orientadora

Departamento: Patologia

Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp – Botucatu/SP

---

**Profa. Dra.: Maria Cecília Rui Luvizotto**

Membro Titular

Departamento: Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal.

Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – Unesp – Araçatuba/SP

---

**Dr.: Cleverson Teixeira**

Membro Titular

Instituto Lauro de Souza Lima

Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia – Bauru/SP

*A minha família, em especial a minha mãe, Iza, e irmãos, Telma e  
Theles, pelo carinho e incentivo que nunca faltaram.*

*A Nina e Lana, minhas fiéis companheiras e fonte de inspiração.*

**Dedico.**

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

**À Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha, pelo carinho, compreensão, incentivos, conselhos e orientação durante este trabalho.**

**Ao M.V. Diogo Zanoni por toda paciência e ajuda prestada no desenvolvimento deste projeto.**

**À M.V. Luciana Moura Campos Pardini pela parceria e amizade gerada na luta para conseguirmos realizarmos nossos trabalhos.**

**Aos funcionários do Departamento de Patologia da FMB José Carlos Pedroso de Lima e Renata Falaguera Villas Boas pela atenção e prestatividade no auxílio deste projeto.**

## AGRADECIMENTOS

A toda **minha família**, que mesmo muitas vezes não entendendo os motivos da minha ausência sempre me apoiou, em especial a minha **avó Nair e meus sobrinhos Miguel e Heitor**.

Aos professores e funcionários do **Departamento de Patologia da FMB** por todo apoio e carinho que recebi.

Ao **Prof. Dr. Hélio Amante Miot** por toda atenção e auxílio prestado no projeto, além do exemplo profissional e pessoal que é.

Aos professores, funcionários, residentes e colegas de pós-graduação do **Serviço de Patologia da FMVZ** pelos bons momentos vividos aqui, em especial a Tália Missen Tremori que realmente se tornou uma *sís*.

A Amanda Duarte, Juliana Montibeller, Mirelle Queiroz e Yohana Andrade por toda paciência, risadas, chacotas, almoços nesses dois anos, vocês fizeram os meus dias mais felizes nessa **casa**.

A Larissa Demoner, Lívia Ramos e Talita Batista por fazerem todos os dias essa cidade mais **Alegre**.

Ao **Rugby Botucatu** por fazer minhas terças e quintas mais leves e trazer com elas Laura Gualter, Rita de Cassia Fofa e Selene Babboni.

A **todos os animais** por me possibilitar aprender com vocês, fazendo com que eu sempre queira ser melhor e fazer o melhor, para vocês.

*“And the dreams that you dare to dream, really do come true...”*

*(E.Y. HARBURG)*

## SUMÁRIO

Índice de abreviaturas.....	IX
1. Resumo.....	X
2. Abstract.....	XI
3. Revisão de Literatura.....	01
4. Referências.....	09
5. Objetivos.....	13
6. Manuscrito.....	14
7. Conclusões.....	41
8. Perspectiva.....	42
9. Anexos .....	43

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABC – Estreptoavidina-biotina-peroxidase

CB – *Cell Block*

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CK5 – Citoqueratina 5

DAB – Diaminobenzidina

EGFR – Receptor de Fator de Crescimento Epitelial

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária de Zootecnia

HE – Hematoxilina-Eosina

IQ – Imunoistoquímica

PAAF – Punção Aspirativa por Agulha Fina

RE – Receptor de Estrógeno

RP – Receptor de Progesterona

TNM – Tumor Linfonodo Metástase

UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

VPN – Valor Preditivo Negativo

VPP – Valor Preditivo Positivo

## 1. RESUMO

O carcinoma mamário é uma doença relativamente frequente entre as cadelas na faixa etária de 10 anos e apresenta morbidade importante, com expectativa de sobrevida média de 5 anos. A citoinclusão é usada rotineiramente na Medicina como método de escolha na investigação, pela rapidez que fornece subsídios para prever a resposta terapêutica. Entretanto, para a cadela se desconhece a aplicação da tal técnica, portanto, o estudo objetivou correlacionar os padrões morfológicos dos tumores mamários caninos encontrados na técnica de citoinclusão e na análise histológica da peça cirúrgica e comparar a marcação de RE, RP e CK5 nos os dois métodos em 25 amostras de carcinoma mamário. A citoinclusão e espécime cirúrgico foram submetidos ao processamento histológico, confecção das lâminas para coloração de hematoxilina-eosina (HE) e posterior reação imunoistoquímica (IQ) para receptores de estrógeno  $\alpha$  (RE), progesterona (RP) e citoqueratina 5 (CK5). Foram consideradas positivas as marcações das células neoplásicas acima de 1% para RE e RP, e acima de 10% para CK5. Pela coloração de HE houve 100% de concordância no diagnóstico das neoplasias entre técnica de citoinclusão e análise histopatológica. A imunoistoquímica apresentou sensibilidade de 85,71%, 95,45% e 100% e índice Kappa de Cohen de 0,78, 0,84, e 0,95 para o RE, RP e CK5 respectivamente, e 100% de especificidade e  $p < 0,01$  para os três marcadores. Portanto, a citoinclusão trata-se de um método acessível, rápido e de baixo custo, que oferece alta sensibilidade no diagnóstico citomorfológico e imunoistoquímico de carcinoma mamário em cadelas.

Palavras-chave: Citoinclusão, Tumor mamário em cadelas, imunoistoquímica, receptor de estrógeno e progesterona, citoqueratina 5.

## 2. ABSTRACT

Breast carcinoma in a dog is a disease relatively frequent in bitches of 10 years old, displays important morbidity and evolve to death. The cell block for the diagnosis of injury in women is the method of choice in the investigation, because it provides subsidies to provide for response to therapy. However, for the dog is unknown the application of this technique, therefore, this study aimed to correlate the morphological patterns of canine mammary tumors between cell block technique and surgical specimen and compare the immunohistochemical marking of ER, PR and CK5 between the two methods in 25 samples. The cell block and surgical specimens were submitted to histological processing, preparation of slides for HE and subsequent immunohistochemistry (IQ) for estrogen receptor  $\alpha$  (ER), progesterone (PR) and cytokeratin 5 (CK5). Were considered positive for ER and PR cases where there was marking on more than 1% of neoplastic cells and for CK5 the cases where there was marking on more than 10% of neoplastic cells. The level of agreement between the cell block and the surgical specimen was 86.9% for CK5 and 82.6% for the RE. For the HE staining was 100% agreement for the diagnosis of cancer between the techniques. Immunohistochemistry showed a sensitivity of 85.71%, 95.45% and 100% and Cohen's Kappa index of 0.78, 0.84, and 0.95 for ER, PR and CK5 respectively, and 100% specificity and  $p < 0.01$  for all three markers. Therefore the citoinclusão it is an affordable method, fast and low cost, which offers high sensitivity in immunohistochemical marker and in cytomorphological diagnosis of mammary carcinoma in female dogs.

Keywords: cell block, mammary tumor in dogs, immunohistochemistry, estrogen and progesterone receptors, cytokeratin 5.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### Anatomia e histofisiologia da glândula mamária

A mama é um tipo modificado e altamente especializado de glândula sudorípara. Nos seres humanos desenvolvem-se aproximadamente durante a sexta semana de vida intra uterina, como invaginações compactas da epiderme no mesênquima subjacente. Os brotos desenvolvem-se como cristas mamárias espessadas, em ambos os sexos, estendendo-se das regiões axilares até as inguinais. Persistindo apenas na área peitoral, onde se desenvolvem as mamas (SORENMO, 2011).

No cão, semelhante à espécie humana, derivam do ectoderma a partir de espessamentos lineares paramedianos que se estendem da região axilar até a inguinal, geralmente em pares, formando as cristas mamárias e são visualizadas no trigésimo dia de vida. São classificadas como glândulas túbulo-alveolares compostas, que consistem de unidades secretoras formadas por túbulos separados por septos de tecido conjuntivo (Dyce *et al*, 2004).

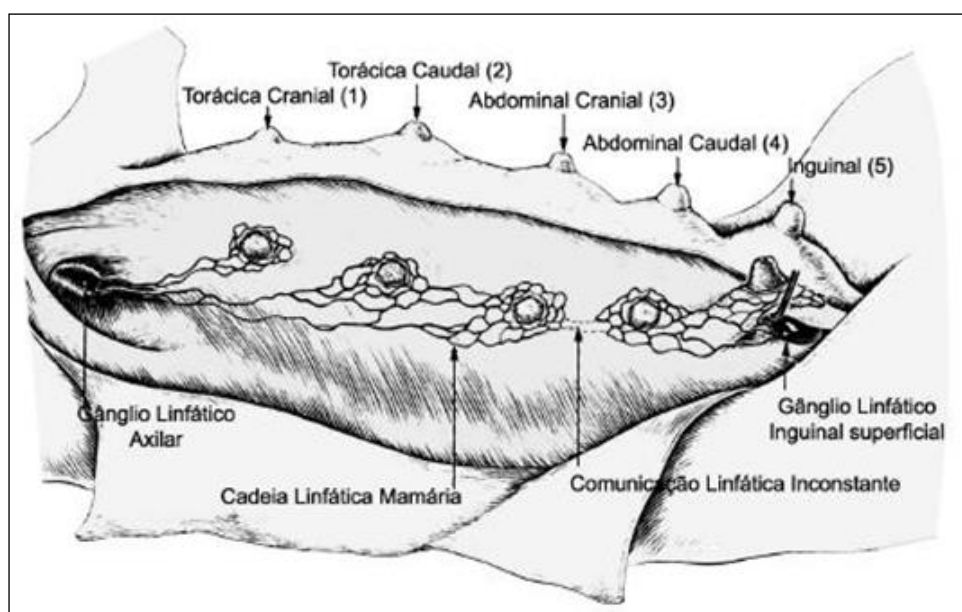


Figura 1 Cadeia mamária e respectiva drenagem linfática (Queiroga, 2011).

A drenagem linfática básica das glândulas mamárias ocorre através dos linfonodos regionais, tendo sido demonstrado que podem existir comunicações linfáticas entre a cadeia mamária direita e esquerda e entre glândulas adjacentes de uma mesma cadeia. As glândulas 1 e 2 são drenadas pelo gânglio linfático axilar, as glândulas 4 e 5 drenadas pelo gânglio linfático inguinal superficial. A glândula mamária 3 (abdominal cranial) é drenada pelo gânglio axilar mas é frequente ser drenada em simultâneo pelo gânglio inguinal superficial (QUEIROGA, 2011).

O grande aporte vascular confere aos tumores mamários um alto poder de metástase, principalmente para pulmão por via hematogena e linfonodos regionais por via linfática (SORENMO et al 2011).

### **Incidência, fatores predisponentes e etiologia dos carcinomas mamários em cadelas.**

Na regra geral, a incidência de neoplasia maligna mamária em cadelas e nas mulheres vem aumentando exponencialmente ao redor do mundo. Os tumores mamários apresentam a maior incidência dentre as neoplasias em cadelas, chegando a 50% de todos os casos, sendo que a malignidade é encontrada em 45% a 50%. O tumor de mama na mulher representa 25% dos casos de neoplasias no ser humano e a causa mais frequente de morte por câncer em mulheres (MISDORP, 2002; CASSALI, 2011; SIEGEL, 2012; TERRA, 2012).

Uma das teorias do aumento da incidência de tumor mamário na cadela

pode ser explicada pelas melhorias na qualidade de vida desses animais, que levaram a uma maior longevidade (FILGUEIRAS, 2003; JUBB, 2007; CARVALHO, 2009; SANCHES, 2010).

Para a ocorrência de neoplasia mamária destacam-se a idade e o uso de contraceptivos. Cadelas apresentam maior incidência aos dez anos de idade, e raramente acomete animais com menos de quatro anos de idade. O uso de contraceptivos orais ou injetáveis a base de progesterona e estrógenos por tempo prolongado, ou em altas doses, pode levar ao desenvolvimento de nódulos mamários tanto benignos quanto malignos (FIGUEROA, 2012; OLIVEIRA FILHO, 2010; TERRA, 2012).

A etiologia das neoplasias mamárias ainda não é bem definida, mas um dos principais fatores predisponentes é o hormonal. Estudos mostram que cadelas não castradas tornam-se mais sujeitas a ação dos hormônios esteróides ovarianos, que são os responsáveis pela proliferação do epitélio mamário. Com o passar dos ciclos estrais ao longo da vida da cadela e da ação hormonal sobre as células mamárias, aumentam as chances de erros na replicação das células em clones mutagênicos oncogênicos (CASSALI, 2003; FIGUEROA, 2012; OLIVEIRA FILHO, 2010).

A relação entre a castração precoce e a diminuição da incidência de câncer de mama é uma forte evidência da ligação entre a ação hormonal e as neoplasias mamárias. Estudos mostram que a castração em cadelas antes do primeiro cio reduz o risco da incidência da neoplasia para 0,5%, se a ovariectomia (OSH) for realizada após o primeiro cio aumenta para 8% o risco, elevando-se para 26% se for realizada após o segundo cio (FONSECA, 2000;

CARVALHO 2009). A castração após o terceiro cio, ou aos dois anos e meio, perde seu efeito protetor, mas ajuda a prevenir enfermidades reprodutivas como a piometrite e prenhez indesejada. Além de ser adjuvante no tratamento de tumor de mama, devido à supressão hormonal ovariana, nos casos onde é realizada juntamente com a mastectomia (OLIVEIRA FILHO, 2010).

As neoplasias podem se manifestar ainda geneticamente de maneira esporádica, familiar ou hereditária. A maneira esporádica ocorre mutação cromossômica nos genes BRCA-1 e BRCA-2, que são responsáveis pela supressão tumoral, em indivíduos sem pré-disposição. A neoplasia familiar é aquela onde dois ou mais indivíduos de primeiro ou segundo grau possuem a doença. E a forma hereditária possui um padrão de transmissão autossômico dominante, levando o paciente a um alto risco e necessitando de um diagnóstico precoce (TORÍBIO, 2008).

Devido à grande semelhança epidemiológica, clínica e patológica dos tumores em mulheres e cadelas, pesquisadores os tem utilizado como modelos comparativos para estudos, trazendo grandes benefícios para Medicina Veterinária devido à grande diversidade morfológicas das neoplasias (TORÍBIO, 2008; CARVALHO, 2009).

## **Métodos de diagnósticos**

A elevada frequência das neoplasias mamárias justifica a busca por métodos diagnósticos de custo reduzido, baixa invasividade e resultado mais rápido, viabilizando a abordagem cirúrgica e terapêutica. Com base no conceito

de citologia esfoliativa de George N. Papanicolau, em 1853 James Paget foi o primeiro a usar a amostras citológicas aspiradas de tumores mamários para exame microscópico, que foi notável pela sua acurácia (OLSZEWSKI, 1984).

A Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF) pode ser indicada como meio de diagnóstico diferencial, implicando um procedimento rápido, barato e seguro que induz injúria tecidual mínima, não havendo necessidade de se proceder à anestesia do animal, e permite a obtenção de resultados confiáveis na maioria dos casos (ZUCCARI, 2001; FERREIRA, 2013).

Em regra, a citopunção é um método de diagnóstico bem aceito por ser minimamente invasivo, para avaliar lesões superficiais e profundas. A sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo supostamente são os mais elevados para avaliar carcinomas primários e metastáticos e melanomas (HANLEY, 2009).

Embora a citologia cumpra essa função, persistem restrições relativas à sensibilidade do método (MASSERDOTTI, 2006; SANCHEZ e SELVAGGI, 2006; CASSALI et al., 2011). Estas se devem a limitações, como a perda das relações arquiteturais e o número restrito de lâminas a partir de uma colheita.

Uma abordagem diagnóstica ainda pouco explorada em Medicina Veterinária vincula-se à realização do cell block de agarose (CBA), método originariamente proposto no processamento de amostras para microscopia eletrônica (MULDER et al., 1997; SANCHEZ e SELVAGGI, 2006). Esse método otimiza potencialmente a amostra citológica por permitir a emblocagem em parafina, com posterior processamento, à semelhança do que é realizado com amostras histológica (MASSERDOTTI, 2006; ZANONI, 2012).

A citoinclusão foi introduzida pela primeira vez no final dos anos 1960 e início dos anos 1970 oferecendo várias vantagens, incluindo organização arquitetônica equivalente ao exame histopatológico (CONSTANTIAN, 1973). As células de interesse podem ser correlacionadas, de nível para nível e o conteúdo da amostra do tumor pode ser avaliado, de modo a determinar se a amostra é adequada para o teste molecular (CRAPANZANO, 2014).

As citoinclusões obtidas na PAAF são ferramentas úteis no diagnóstico pré-terapêutico e no monitoramento da progressão de neoplasias mamárias. Tais amostras fornecem material de alta celularidade, representativo da lesão que permite a realização de estudos complementares, como a técnica de imunohistoquímica (FIORAVANTI, 2012; PAIVA, 2012; JAIN, 2014).

O método histológico/morfológico descritivo e parcialmente baseado no prognóstico dos carcinomas mamários correlaciona diferenças comportamentais entre as neoplasmas e os tipos histológicos. Essa classificação, adotada pela OMS - *Armed Forces Institute of Pathology* (AFIP), possibilitou uma nova classificação dos carcinomas mamários em ordem crescente de malignidade (MEUTEN, 2002). A graduação de um carcinoma baseia-se no grau de diferenciação das células tumorais e no número de mitoses presentes dentro do tumor como supostos correlatos da agressividade da neoplasia. Assim, os carcinomas, são classificados em graus I a IV com anaplasia crescente (CASSALI et al, 2011).

Devido aos diferentes graus de malignidade dos tumores, foi desenvolvido na França, por Pierre Denoix, o Sistema Tumor-Linfonodo-Metástase (TNM), entre os anos de 1943 a 1952. Esse método permite o estadiamento dos tumores

malignos, com o propósito de auxiliar o prognóstico e o melhor tratamento a ser realizado (BRASIL, 2004).

O sistema TNM é uma classificação proposta pela OMS apenas para carcinomas mamários, devendo haver a confirmação histopatológica da neoplasia. Esse método de classificação baseia-se no tamanho da lesão primária (T), na extensão de sua disseminação para linfonodos regionais (N) e na presença ou ausência de metástase (M) e auxilia clínicos na escolha do melhor tratamento, estabelecimento do prognóstico e acompanhamento dos resultados obtidos durante o tratamento (BRASIL, 2004; TORÍBIO, 2008; CASSALI, 2011).

Com a finalidade de auxiliar o prognóstico, as alterações genéticas da carcinogênese podem ser identificadas através da expressão de proteínas por meio de marcação imunoistoquímica. Os marcadores reagem especificamente com receptores hormonais (estrógeno e progesterona) e proteínas produzidas nas células tumorais, como a CK5 (FIGUEIROA, 2012; TERRA, 2012).

Las Mulas et al (2004), demonstram que, tanto na mulher quanto na cadela, que a expressão de RE e RP está relacionada ao um melhor prognóstico devido a responsividade do câncer de mama à terapia hormonal. Nas cadelas, a expressão de RE é maior em tumores benignos do que em malignos, além de ser maior em tumores complexos e mistos do que nos aos subtipos simples.

A expressão do RP é mediada pelo RE e sua positividade é considerada como um marcador de funcionamento dos receptores de estrogênio. Aproximadamente 50% dos tumores positivos para RE são positivos para o RP e destes, cerca de 75% são sensíveis à terapia hormonal. Tumores positivos para RE e negativos para RP são menos sensíveis à hormonioterapia, sugerindo uma

possível contribuição do RP em uma resposta positiva à esse tratamento. Os tumores que são negativos para RE e positivos para RP demonstram uma resposta intermediária à hormonioterapia (YAMASHITA, 2006; ZUCCARI, 2008).

A CK5 é expressa em células basais, presentes na camada basal e parabasal, e também em células progenitoras da mama, que tem capacidade de se diferenciarem em células glandulares e mioepiteliais. A expressão do gene CK5 está relacionada a um pior prognóstico tanto nos pacientes caninos quanto nas mulheres, sendo nestas relacionada ao fenótipo basal, que tem o pior prognóstico (MATOS et al, 2005; FIGUEROA, 2012).

O painel imunoistoquímico para caracterização dos tumores de mama na mulher já está bem estabelecido e é utilizado na rotina dos laboratórios de Patologia Humana para orientar o tratamento clínico das pacientes. Em Medicina Veterinária ainda há carência de estudos correlacionando os principais marcadores que permitam definir um painel eficiente no estabelecimento do prognóstico, além de sugerir possíveis alvos terapêuticos (FIGUEROA, 2012).

## 4. REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. TNM: classificação de tumores malignos / traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6. ed. - Rio de Janeiro: INCA, 2004.

CARVALHO, M. I. S. Estudo imunohistoquímico do infiltrado de linfócitos T e da proliferação tumoral nos tumores de mama da cadela: implicações clínicas. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-Os-Montes e Alto Douro, Vila Real. 77f, 2009.

CASSALI, G. D. Patologia da glândula mamária. In: NASCIMENTO, E. F.; SANTOS R. L. Patologia da reprodução dos animais domésticos. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap 12, p. 119-133, 2003

CASSALI, G. D. et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. Brazilian Journal of Veterinary Pathology, Belo Horizonte, v.4, n.2, p.153-180, 2011.

CONSTANTIAN HM, DE GIROLAMI E. Urothelial tumors detected by cytology: New cell block technique. J Urol;109:304-7, 1973.

CRAPANZANO JP, HEYMANN JJ, MONACO S, NASSAR A, SAQI A. The state of cell block variation and satisfaction in the era of molecular diagnostics and personalized medicine. CytoJournal;11:7, 2014.

DE LAS MULAS, J.M.; ORDÁS, J.; MILLÁN, M.Y.; CHACÓN, F.; De LARA, M.; De LOS MONTEROS, A.E., et al., A. Immunohistochemical expression of estrogen receptor  $\beta$  in normal and tumoral canine mammary glands. Vet Pathol; 41: 269-272, 2004.

DYCE, K. M.; WENSING, C. J. G.; SACK, W. O. Tratado de Anatomia Veterinária. Elsevier Brasil, 2004.

FERREIRA, I. et al. Quantitative analysis of photodynamic therapy effects in rat mammary tumor vascular density using Image-Pro Plus Software. Open Journal of Veterinary Medicine, 3, 259-262, 2013.

---

<sup>1</sup> Referências elaboradas de acordo com o *International Committee of Medical Journal Editors*. Ann Inter Med. 1997;16:36-47

FIGUEIROA, F. C. et al. Immunoexpression of cathepsin D and S100A4 protein and their molecular subtypes in canine mammary carcinomas. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 2, 163-169, 2012.

FILGUEIRAS, K. D. Características anatomopatológicas de neoplasias mamárias em cadelas criadas no município de Fortaleza-CE, 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2003.

FIORAVANTI, H. et al. Avaliação dos métodos de citologia e “cell block” de linfonodo nas linfadenopatias em cães. *Vet e Zootec*. 2011.

FONSECA, C. S.; DALECK, C. R. Neoplasias mamárias em cadelas: Influência hormonal e efeito da ovariectomia como terapia adjuvante. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, n.4, p.731-735. 2000

HANLEY KZ, WEISS SW, LOGANI S. Melanoma with cartilaginous differentiation: Diagnostic challenge on fine-needle aspiration with emphasis on differential diagnosis. *Diagn Cytopathol*;37:51-5, 2009.

JAIN, D.; MATHUR, S. R.; IYER, V. K. Cell blocks in cytopathology: a review of preparative methods, utility in diagnosis and role in ancillary studies. *Cytopathology*, 11 aug 2014. DOI: 10.1111/cyt.12174

JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PAULMER'S N. *Pathology of Domestic Animals*. Vol. 1. 5. ed. Toronto: Editora Saunders Elsevier. cap.5, p777-779, 2007.

MASSERDOTTI, C. Architectural patterns in cytology: correlation with histology. *Veterinary Clinical Pathology*, v.35, p.388-396, 2006.

MATOS. I.; DUFLOTH, R.; ALVARENGA, M.; ZEFERINO, L.C.; SCHMITT, F. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Archiv*, Volume 447, Issue 4, pp 688-694, 2005.

MEUTEN, D. J. *Tumors in Domestic Animals*. Iowa: Editora Iowa State Press, 4<sup>o</sup> ed., p. 575-606, 2002.

MISDORP, W. et al. *Histological classification of the mammary tumours of the dog and the cat*. Washington, D.C: Armed Forces Institute of Pathology, 59 p. WHO international histological classification of tumours of domestic animals; 2nd series, v. 7, 2002.

- MULDER, A.B. et al. A simple procedure for in situ immunolabeling embedding and sectioning of layers of cultured endothelial and smooth muscle cells for both light and electron microscopy. *Biotechnic&Histochemistry*, v.72, p.45-48, 1997.
- OLIVEIRA FILHO, J. C. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias – Área de concentração em Patologia Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2010.
- PAIVA, M. B. et al. Utilização de marcador orgânico na técnica de cito inclusão com gel de agarose. *Vet e Zootec*. 2012.
- QUEIROGA, F.; RAPOSO, T.; CARVALHO, M.I.; PRADA, J.; PIRES. I. Canine Mammary Tumours as a Model to Study. *Human Breast Cancer: Most Recent Finding.*, v.25, p.455-466, 2011.
- SANCHEZ, N.; SELVAGGI, S.M. Utility of cell blocks in the diagnosis of thyroid aspirates diagnostic. *Cytopathology*, v.34, n.2, p.89-92, 2006.
- SANCHES, O. C. Quantificação dos mastócitos nas neoplasias mamárias malignas de cadelas: análise histopatológica, histoquímica e imunoistoquímica., 206f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.
- SIEGEL, R., NAISHADHAM, D. AND JEMAL, A. Cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 62: 10–29, 2012. doi: 10.3322/caac.20138
- SORENMO, K.U.; RASOTOO, R.; ZAPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M.H. Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland neoplasms. *Veterinary Pathology*, v.48, n.1, p.85-97, 2011.
- TERRA, E. M. et al. Immunohistochemical expression of p53 and p63 in adenomas and carcinomas of canine mammary glands. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 2, 21-24, 2012.
- TORÍBIO, J. M. M. L. Caracterização clínica, classificação histopatológica e georreferenciamento das neoplasias mamárias em cadelas no município de Salvador, BA. 121f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) – Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Salvador, 2008.
- YAMASHITA H, YANDO Y, NISHIO M, ZHANG Z, HAMAGUCHI M, MITA K, et al. Immunohistochemical evaluation of hormone receptor status for predicting

response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Breast Cancer*. 13 (1): 74-83, 2006.

ZANONI, D. S.; GRANDI, F.; ROCHA, N. S. Use of the agarose cell block technique in veterinary diagnostic cytopathology: an “old and forgotten” method. *Vet Clin Pathol* 41/3, 307–310, 2012.

ZUCCARI, D.A.P.C; BERTON, C.R.; TERZIAN, A.C.B.; RUIZ, C.M. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias – importância dos marcadores imuno-histoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo. *Arq Ciênc Saúde* 2008 out/dez;15(4):189-98

ZUCCARI, D. A. P. C. et al. Avaliação imuno-histoquímica do gene P53 nas neoplasias mamárias caninas. *ARS VETERINARIA*, Jaboticabal, SP, v. 21, n.3, p. 344-350. 2005.

ZUCCARI, D. A. P. C. et al. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários em cadelas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 38-1, 2001.

## **5. OBJETIVOS**

2.1. Correlacionar o padrão citomorfológico do material obtido através técnica de citoinclusão com o padrão morfológico obtido na análise histopatológica da peça cirúrgica, nos carcinomas mamários em cadelas.

2.2. Comparar a marcação imunoistoquímica do receptor de estrógeno, receptor de progesterona e citoqueratina 5 entre as duas técnicas.

## 6. MANUSCRITO

Artigo de investigação em português no formato Veterinary Pathology.

Título: Sensibilidade da citoinclusão (PAAF) para detecção de CK5, RE e RP no carcinoma primário de mama na cadela.

Title: Cell Block (FNA) sensitivity for detection of CK5, ER and PR in primary breast carcinoma in dogs.

Autores:

Tatiany Luiza Silveira

Médica Veterinária, Mestranda em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

Luciana Moura Campos Pardini

Médica Veterinária, Mestranda em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

José Joaquim Tilton Ranzani

Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

Hélio Amado Miott

Professor Adjunto do Programa de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

Noeme Sousa Rocha

Professora Adjunta do Programa de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

Local de desenvolvimento do trabalho:

Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Botucatu – Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

Conflito de interesse: Nenhum

Financiamento: CNPq e FAPESP

Bolsista CNPq: No. 132004/2013-5

FAPESP Proc. No.: 10/51596-2R

## RESUMO

O carcinoma mamário é uma doença relativamente frequente entre as cadelas na faixa etária de 10 anos e apresenta morbidade importante, com expectativa de sobrevida média de 5 anos. A citoinclusão é usada rotineiramente na Medicina como método de escolha na investigação, pela rapidez que fornece subsídios para prever a resposta terapêutica. Entretanto, para a cadela se desconhece a aplicação da tal técnica, portanto, o estudo objetivou correlacionar os padrões morfológicos dos tumores mamários caninos encontrados na técnica de citoinclusão e na análise histológica da peça cirúrgica e comparar a marcação de RE, RP e CK5 nos os dois métodos em 25 amostras de carcinoma mamário. A citoinclusão e espécime cirúrgico foram submetidos ao processamento histológico, confecção das lâminas para coloração de hematoxilina-eosina (HE) e posterior reação imunoistoquímica (IQ) para receptores de estrógeno  $\alpha$  (RE), progesterona (RP) e citoqueratina 5 (CK5). Foram consideradas positivas as marcações das células neoplásicas acima de 1% para RE e RP, e acima de 10% para CK5. Pela coloração de HE houve 100% de concordância no diagnóstico das neoplasias entre técnica de citoinclusão e análise histopatológica. A imunoistoquímica apresentou sensibilidade de 85,71%, 95,45% e 100% e índice Kappa de Cohen de 0,78, 0,84, e 0,95 para o RE, RP e CK5 respectivamente, e 100% de especificidade e  $p < 0,01$  para os três marcadores. Portanto, a citoinclusão trata-se de um método acessível, rápido e de baixo custo, que oferece alta sensibilidade no diagnóstico citomorfológico e imunoistoquímico de carcinoma mamário em cadelas.

Palavras-chave: Citoinclusão, tumor mamário em cadelas, imunoistoquímica, receptor de estrógeno e progesterona, citoqueratina 5.

## ABSTRACT

Breast carcinoma in a dog is a disease relatively frequent in bitches of 10 years old, displays important morbidity and evolve to death. The cell block for the diagnosis of injury in women is the method of choice in the investigation, because it provides subsidies to provide for response to therapy. However, for the dog is unknown the application of this technique, therefore, this study aimed to correlate the morphological patterns of canine mammary tumors between cell block technique and surgical specimen and compare the immunohistochemical marking of ER, PR and CK5 between the two methods in 25 samples. The cell block and surgical specimens were submitted to histological processing, preparation of slides for HE and subsequent immunohistochemistry (IQ) for estrogen receptor  $\alpha$  (ER), progesterone (PR) and cytokeratin 5 (CK5). Were considered positive for ER and PR cases where there was marking on more than 1% of neoplastic cells and for CK5 the cases where there was marking on more than 10% of neoplastic cells. The level of agreement between the cell block and the surgical specimen was 86.9% for CK5 and 82.6% for the RE. For the HE staining was 100% agreement for the diagnosis of cancer between the techniques. Immunohistochemistry showed a sensitivity of 85.71%, 95.45% and 100% and Cohen's Kappa index of 0.78, 0.84, and 0.95 for ER, PR and CK5 respectively, and 100% specificity and  $p < 0.01$  for all three markers. Therefore the citoinclusão it is an affordable method, fast and low cost, which offers high sensitivity in immunohistochemical marker and in cytomorphological diagnosis of mammary carcinoma in female dogs.

Keywords: cell block, mammary tumor in dogs, immunohistochemistry, estrogen and progesterone receptors, cytokeratin 5.

## INTRODUÇÃO

A incidência de neoplasia mamária na cadela e na mulher vem aumentando exponencialmente ao redor do mundo, representando cerca de 20% dos novos casos. O câncer de mama na mulher representa 25% das neoplasias acometidas no ser humano enquanto os tumores mamários apresentam a maior incidência dentre as neoplasias em cadelas, chegando a 50% de todos os casos neoplásicos, sendo que desses 45% a 50% são malignos (MISDORP, 2002; CASSALI, 2011; SIEGEL, 2012; TERRA, 2012; INCA, 2014).

A elevada frequência das neoplasias mamárias justifica a busca por métodos diagnósticos de custo reduzido, baixa invasividade e resultado mais rápido, viabilizando a abordagem cirúrgica e terapêutica. A Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF) pode ser indicada como método diagnóstico diferencial, implicando um procedimento rápido, barato, seguro e que induz injúria tecidual mínima, não havendo necessidade de se proceder à anestesia do animal, permitindo a acurácia diagnóstica na maioria dos casos (ZUCCARI, 2001; FERREIRA, 2013).

Estudos mostram que a PAAF fornece subsídios não apenas citomorfológicos, podendo-se utilizar o material para estudo imunocitoquímico, citometria de fluxo ou técnicas de biologia molecular, auxiliando, assim, no diagnóstico de lesões benignas e malignas, nos mais diversos órgãos (ZUCCARI, 2001; BUENO, 2013; FERREIRA, 2013).

Uma abordagem bem difundida na Medicina humana e ainda pouco explorada na Medicina Veterinária vincula-se à realização da citoinclusão, ou *cell block* (CB), sem a utilização da agarose (BUENO et al, 2013). Esse método

originariamente proposto no processamento de amostras para microscopia eletrônica (YUAN e GULYAS, 1981; MULDER et al., 1997; SANCHEZ e SELVAGGI, 2006), que potencialmente otimiza a amostra citológica por permitir a emblocagem da amostra em parafina, com posterior processamento, à semelhança de uma amostra histológica (MASSERDOTTI, 2006; ZANONI, 2012).

A citoinclusão foi introduzida pela primeira vez no final dos anos 1960 e início dos anos 1970 oferecendo várias vantagens, incluindo organização arquitetônica equivalente ao exame histopatológico (CONSTANTIAN, 1973). As células de interesse podem ser correlacionadas, de nível para nível e o conteúdo da amostra do tumor pode ser avaliado, de modo a determinar se a amostra é adequada para o teste molecular (CRAPANZANO, 2014).

O emprego da técnica de CB elimina a restrição no número de lâminas a partir de uma única coleta se tornando uma ferramenta útil no diagnóstico pré-terapêutico e no monitoramento da progressão de neoplasias mamárias. Tais amostras fornecem material de alta celularidade representativo da lesão que permite a utilização de estudos complementares, como a técnica de imunistoquímica (FIORAVANTI, 2011; PAIVA, 2012; JAIN, 2014), tais como a expressão de receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP) e citoqueratina 5 (CK5) possibilitando uma melhor abordagem terapêutica (HORTA, 2012; ZANONI, 2012; BUENO, 2013). Visto que a expressão aumentada de receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP) está relacionada ao melhor prognóstico, enquanto a positividade para CK5 está relacionada a um pior prognóstico, tanto dos pacientes caninos como dos seres humanos com carcinomas mamários (FIGUEIROA, 2012; HORTA, 2012; TERRA, 2012).

Las Mulas et al (2004) demonstram, tanto na mulher quanto na cadela, que a expressão de RE e RP está relacionado ao melhor prognóstico devido a responsividade do câncer de mama à terapia hormonal. Nas cadelas, a expressão de RE é maior em tumores benignos do que em malignos, além de ser maior em tumores complexos e mistos do que quando comparado aos subtipos simples.

A expressão do RP é mediada pelo RE, e sua positividade é considerada como um marcador de funcionamento dos receptores de estrogênio. Aproximadamente 50% dos tumores positivos para o RE são positivos para o RP e destes, cerca de 75% são sensíveis à terapia hormonal. Tumores positivos para RE e negativos para RP são menos sensíveis à hormonioterapia, sugerindo uma possível contribuição do RP em uma resposta positiva à esse tratamento. Os tumores que são negativos para RE e positivos para RP demonstram uma resposta intermediária à hormonioterapia (YAMASHITA, 2006; ZUCCARI, 2008).

A CK5 é expressa em células basais, presentes na camada basal e parabasal, e também em células progenitoras da mama, que tem capacidade de se diferenciarem em células glandulares e mioepiteliais. A expressão do gene CK5 está relacionada a um pior prognóstico tanto nos pacientes caninos quanto nas mulheres, sendo nessas está relacionado ao fenótipo basal que tem o pior prognóstico (MATOS et al, 2005; FIGUEROA, 2012).

O presente trabalho objetivou fazer a correlação entre os padrões histológicos da citoinclusão e da peça cirúrgica, assim como comparar a marcação imunohistoquímica de RE, RP e CK5 de carcinomas mamários em cadelas entre as duas técnicas, a fim de testar a confiança do método.

## **MÉTODOS**

### **Delineamento experimental**

O estudo foi executado em três estágios consecutivos envolvendo 25 cadelas:

No primeiro estágio, os nódulos mamários foram submetidos à PAAF a fim de diagnosticar os carcinomas mamários, para exclusão de lesões não neoplásicas.

No segundo estágio foi aplicado o sistema TNM nas fêmeas estudadas e coletado o material para o CB da peça já no leito cirúrgico, logo depois da excisão, de forma a parrear diagnóstico obtido no exame citológico e na técnica de *cell block*, para posterior confronto com o tradicional histopatológico.

No terceiro estágio foi realizada a técnica de imunistoquímica no material obtido na técnica de CB e na peça cirúrgica, proveniente dos animais com carcinoma mamário comprovado pelo exame histopatológico.

### **Animais**

Foram utilizadas amostras de 25 cadelas, sem predileção de raça, com idade igual ou superior a cinco anos, com diagnóstico citológico definitivo de carcinoma mamário, cujos proprietários procuraram tratamento no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, *campus* Botucatu.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo nº 119/2014 - CEUA) e todos os proprietários dos animais envolvidos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, autorizando a colheita de materiais e utilização dos dados em publicações. (Anexos 1)

## **Amostras**

Os exames citológicos, histopatológicos e imunoistoquímicos foram realizados no serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP campus Botucatu com a colaboração do Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

## **Técnica por Aspiração e processamento**

A PAAF foi realizada com auxílio do citoaspirador de Valleri, e a depender do tamanho da lesão, com agulhas de 26 a 22 *gauge*, acopladas a seringas de 10mL. Os esfregaços foram secos a temperatura ambiente, por volta de 5 minutos. Em seguida fixados em metanol a 100%, para posterior submissão, a coloração de Diffi Quick e depois pelo Giemsa, ambas pertencentes ao gênero Romanovisk (RASKIN, 2010).

Visando não prejudicar o procedimento cirúrgico, técnica foi realizada na peça fresca, logo após a sua excisão cirúrgica, não havendo diferença entre a coleta do material no animal antes ou após a cirurgia, tampouco na qualidade do material obtido, conforme piloto realizado.

## **Leitura e interpretação citomorfológica para o diagnóstico**

As lâminas coradas pelo Diffi Quick e Giemsa foram analisadas em microscópio de luz (Zeiss Axio Lab.A1), a princípio no menor aumento aplicava-se o controle de qualidade, a adequabilidade da amostra, isto é, população celular e as condições técnicas, logo depois se iniciava a leitura.

Os critérios de malignidade considerados para o diagnóstico dos carcinomas mamários simples caracterizam o esfregaço pela perda de coesão celular, pleomorfismo nuclear e citoplasmático, alteração da proporção núcleo/citoplasma, vacúolos citoplasmáticos, anisocariose, nucléolos múltiplos e figuras de mitoses atípicas. Associado a estes critérios, nos carcinomas compostos, a caracterização do componente mesenquimal se dá pela presença da matriz óssea no esfregaço, representando o mucopolissacarídeo secretado pelas células mioepiteliais para formação de tecido ósseo e/ou cartilaginoso.

### **Técnica de *Cell Block* e seu processamento**

Confirmado o diagnóstico de carcinoma mamário pela PAAF, o animal foi encaminhado ao Centro Cirúrgico do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia para ser submetido à mastectomia radical unilateral e OSH (anexo 2).

Logo depois da excisão cirúrgica, a peça foi puncionada com agulha de 22 gauge acoplada em uma seringa de 10 mL, associadas ao citoaspirador de Valleri, até ser obtida a quantidade mínima 0,1 mL por animal. O material presente no bulbo da agulha e seringa foi fixado primeiramente em álcool a 95% por 30 segundos, para coesão do material, seguido imediatamente pela aspiração de 8,0 mL de solução formalina 7,4%, tamponada (Fig. 1).

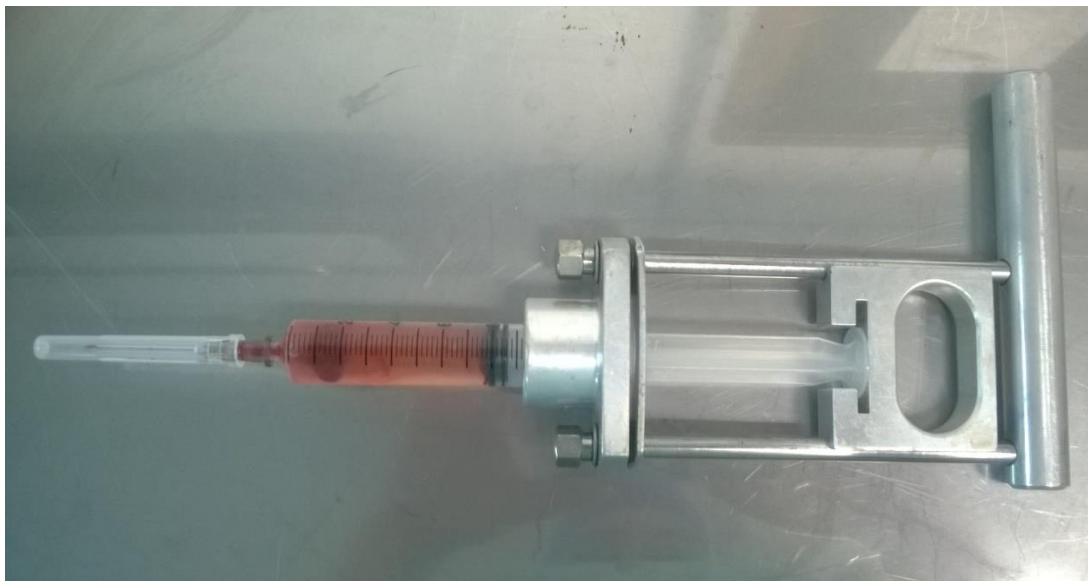


Figura 1 Citoaspirador de Valleri associado à seringa de 10ml e agulha 25x7 (22G1) contendo coágulo formado pelo material obtido por PAAF.

A amostra permaneceu por um período de 24h no interior da seringa para fixação. Seguindo-se à retirada do material, com auxílio de uma pinça anatômica, permanecendo 30 minutos em álcool-eosina e posterior processamento pela técnica tradicional para Hematoxilina-Eosina (HE), isto é, inclusão em cassete com parafina, microtomia de 4  $\mu$ m e bateria de coloração (Fig. 2).

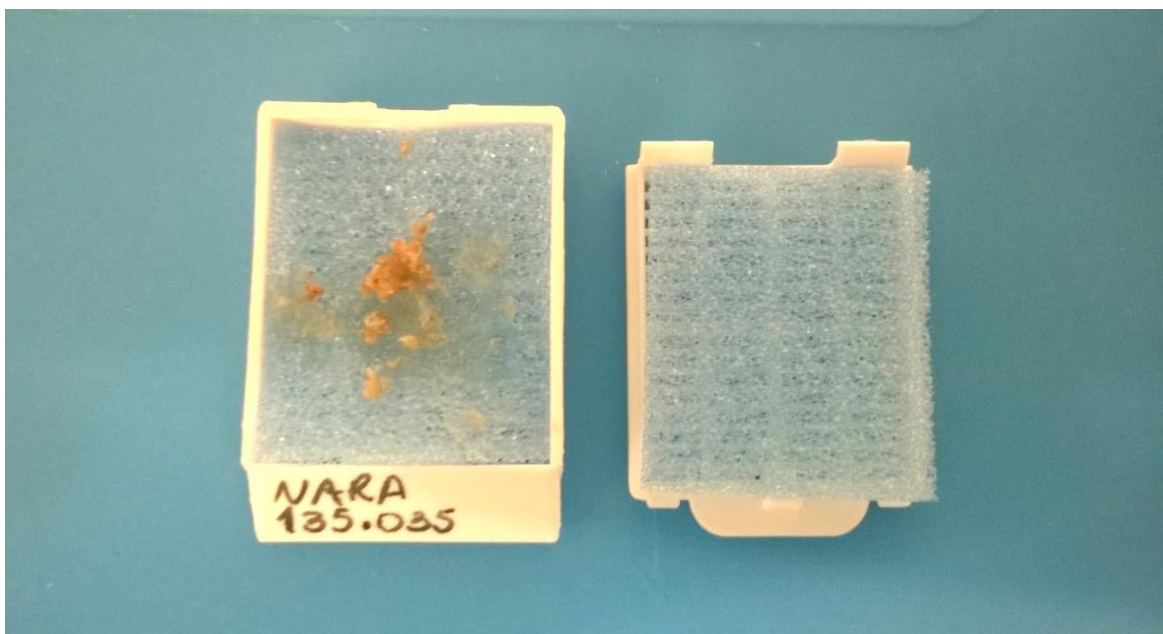


Figura 2 Material retirado da seringa de 10 mL, obtido pela PAAF, após 24 horas de fixação em álcool 95% e formalina tamponada.

### **Análise citomorfológica das amostras de *Cell Block* para o diagnóstico**

A análise citomorfológica pela coloração de HE foi realizada por dois patologistas através de microscópio de luz (Zeiss Axio Lab.A1). Para cada lâmina foi realizada a leitura de 10 campos em aumento de 400x. As neoplasias foram classificadas segundo os critérios de Misdorp et al., (1999) de acordo com a composição celular.

As lâminas dos esfregaços, citoinclusão e peça cirúrgica foram analisadas separadamente, de forma que os patologistas não identificassem as lâminas correspondentes.

### **Exame Histopatológico**

Após fixação em formalina tamponada por 48 horas e inclusão das amostras em parafina, foram obtidos cortes de 4 µm de espessura e corados pela HE para classificação da neoplasia, feita por dois patologistas segundo Misdorp et al., (1999), de acordo com a composição celular.

### **Técnica e processamento de imunoistoquímica**

As lâminas silanizadas contendo cortes de 4 µm de espessura foram desparafinizadas em estufa a 60° por 12 horas, em seguida foram processadas para a imunomarcção, de acordo com a metodologia ABC (estreptoavidina-biotina-peroxidase), utilizando os anticorpos isolados em lâminas separadas.

As reações de recuperação antigênica foram feitas com citrato pH 6,0 em panela de pressão tipo pascal (Dako, USA), para os marcadores RE, RP e CK5,

seguido pelo bloqueio da peroxidase e da proteína endógena a temperatura ambiente. As amostras foram então recobertas pelos anticorpos primários RE, RP e CK5 com o tempo de incubação *over night* em temperatura 8°C (Tabela 1). Foi utilizado como anticorpo secundário o Novo Link (Leica), de acordo com as instruções do fabricante.

A revelação colorimétrica foi realizada com diaminobenzidina (DAB) diluído em substrato (Dako, USA), de acordo com as especificações do fabricante. A contra coloração foi feita com Hematoxilina de Mayer (Merck) em todas as imunomarcações.

Tabela 1 Anticorpos (Ac) utilizados nas marcações imunoistoquímicas

<b>Marcadores</b>	<b>Clone</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Recuperação</b>
RE	LH2	1:50	Novocastra, UK	Citrato pH 6,0
RP	SP2	1:50	Neomarkers, USA	Citrato pH 6,0
CK5	XM26	1:50	Neomarkers, USA	Citrato ph 6,0

### **Análise imunoistoquímica**

Foi realizada análise comparativa da marcação do RE e CK5 na citoinclusão e na peça cirúrgica. Foram considerados negativos os casos em que RE e RP não apresentavam marcação nuclear acima de 1% (HAMMOND, 2010) e quando a marcação da CK5 apresentava menos de 10% dos citoplasmas das células neoplásicas marcadas (RAMALHO, 2006). (Fig. 3 e 4).

Para a CK5 foi adotado positivo duas cruces (+ +) quando até 50% das células neoplásicas apresentavam marcação e positivo três cruces (+ + +) quando mais de 50% das células neoplásicas apresentavam marcação (RAMALHO et al., 2006).

Foram utilizados controles internos e externos positivos e negativos como parâmetros das reações, sendo o controle interno representado pelas glândulas mamárias não tumorais presente nas peças cirúrgicas.

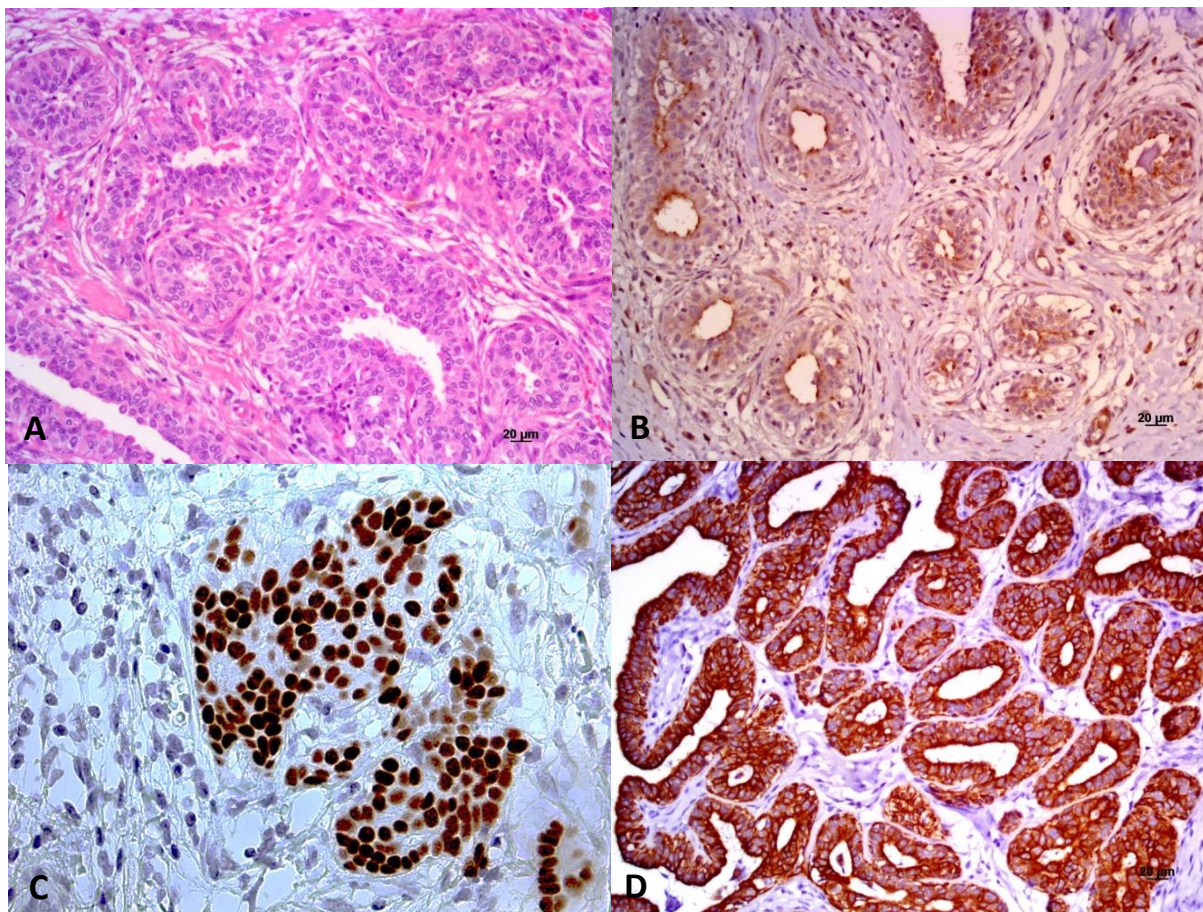


Figura 3 Amostra oriunda da peça cirúrgica do animal 3 corada por HE (A), marcação positiva para RE (B), marcação positiva para RP(C) e marcação positiva (+++) para CK5 (D). Obj. 20X.

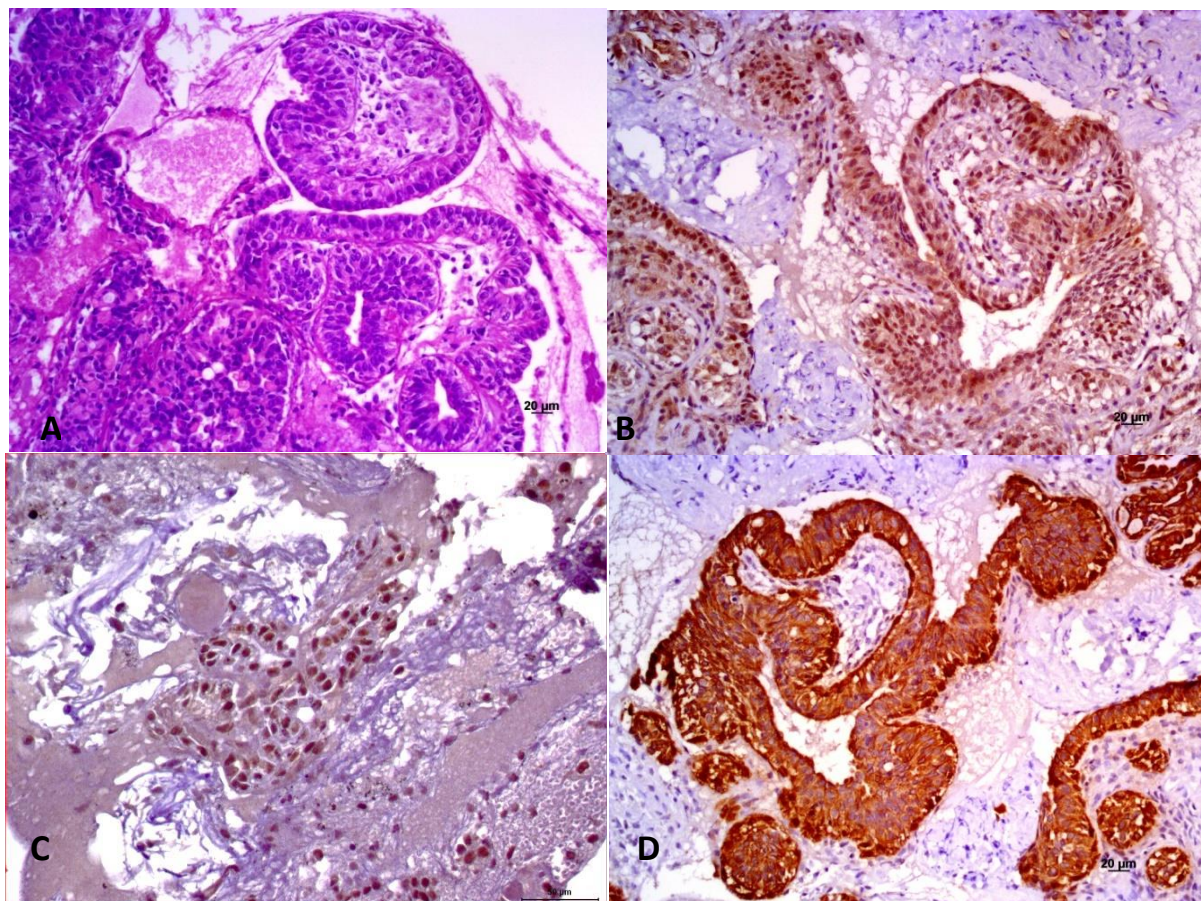


Figura 4 Amostra oriunda da técnica de citoinclusão do animal 3 corada por HE (A), , marcação positiva para RE (B), marcação positiva para RP (C), marcação positiva (+++) para CK5 (D). Marcação negativa para RE na citoinclusão do animal 23. Obj. 20x.

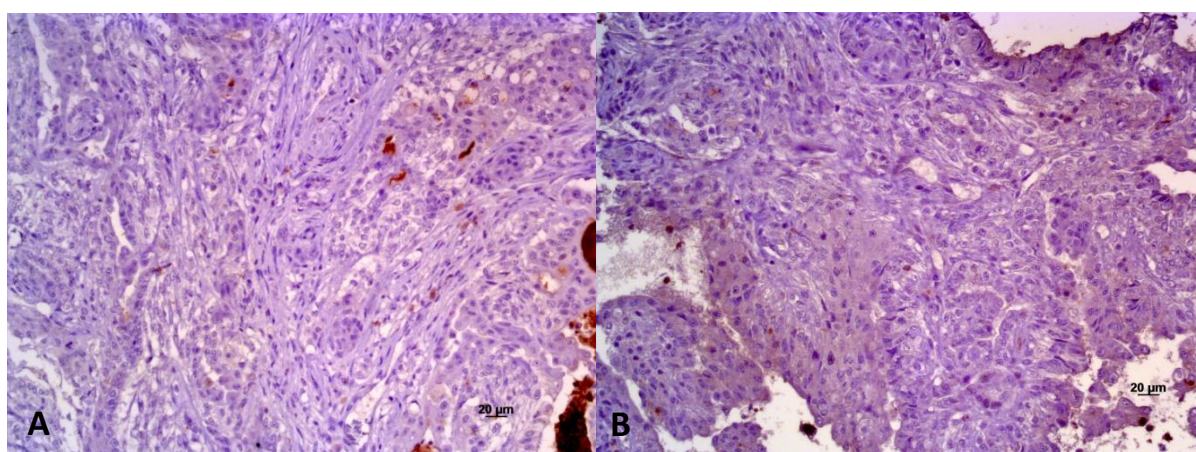


Figura 2 Marcação negativa para RE na amostra oriunda da peça cirúrgica (A) e da citoinclusão (B) do animal 23. Obj. 20x.

## RESULTADOS

Todos os 25 casos estudados apresentaram-se dentro dos critérios de seleção, tendo sido os animais examinados e submetidos à mastectomia radical unilateral e linfadenectomia mamária.

A idade das cadelas variou de 05 a 15 anos, com média de 9,92 anos, com desvio padrão de 2,23. As cadelas de pequeno, médio e grande porte representaram 48%, 32% e 20% dos casos, respectivamente, com mediana de 10kg (6,50 - 23).

Dentre as cadelas, 52% apresentavam pseudociese e 12% eram castradas, entretanto todas haviam sido castradas após os 05 anos de idade. O tempo médio de desenvolvimento dos tumores foi de 11,32 meses, com desvio padrão de 7,28.

A cadeia mamária direita foi acometida em 52,2%, a esquerda 30,4% e bilateralmente 17,4%. A presença de nódulo nas mamas abdominais e inguinal foi de 30,4% para cada, na região torácica 26,1%, em 8,7% havia nódulo em mama abdominal e inguinal e 4,3% a mama torácica e abdominal foram acometidas.

Os carcinomas foram classificados de acordo com Misdorp et al. (1999) pela coloração de HE em 48% em carcinoma em tumor misto, 28% em carcinoma ubulopapilífero e 24% em carcinoma complexo, com concordância de 100% no diagnóstico histopatológico a técnica de citoinclusão.

A validade do CB pela marcação imunoistoquímica foi determinada mediante avaliação dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN), sendo considerados positivos para RE e RP os

casos onde houve marcação em mais de 1% das células neoplásicas e para CK5 acima de 10%, conforme tabela 2 e quadro 1.

Dentre as 25 amostras, em um caso (amostra 08) a marcação foi positiva para RE na citoinclusão e negativa na peça cirúrgica. Na amostra 25 a marcação foi considerada negativa tanto para o RE quanto para o RP na citoinclusão. E em dois casos, amostras 10 e 21, a CK5 foi graduada com +++ na citoinclusão e ++ na peça cirúrgica (quadro 1).

A marcação do CB para RE apresentou sensibilidade de 85,71%, especificidade de 100%, VPP de 100% e VPN 94,74%. A acurácia foi de 96% com índice Kappa igual a 0,78 e  $p < 0,01$ .

O RP obteve 95,45% de sensibilidade, especificidade de 100%, VPP e VPN de 100% e 75% respectivamente. A acurácia foi de 96% com índice Kappa de 0,84 e  $p < 0,01$ .

A análise da CK5 observa-se 100% de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia, índice Kappa de 0,95 e  $p < 0,01$ .

**Tabela 2** Amostras consideradas positivas na marcação imunoistoquímica em células neoplásicas acima 1% para RE e RP e 10% para CK5.

	<b>Citoinclusão</b>	<b>Peça cirúrgica</b>
<b>RE</b>	24%	24%
<b>RP</b>	84%	88%
<b>CK5</b>	92%	92%
	++40%	++48%
	+++52%	+++44%

\*++: quando até 50% das células neoplásicas apresentavam marcação; +++: quando mais de 50% das células neoplásicas apresentavam marcação.

Quadro 1: Pannel imunistoquímico da expressão de RE, RP e CK5 entre citoinclusão e peça cirúrgica.

			PEÇA CIRÚRGICA								
			Ck5-				Ck5+				
			RE-	RE-	RE+	RE+	RE-	RE-	RE+	RE+	
			RP-	RP+	RP-	RP+	RP-	RP+	RP-	RP+	
CITOINCLUSÃO	Ck5-	RE-	RP-	1	0	0	0	0	0	0	0
		RE-	RP+	0	0	0	0	0	0	0	0
		RE+	RP-	0	0	0	0	0	0	0	0
		RE+	RP+	0	0	0	1	0	0	0	0
	Ck5+	RE-	RP-	0	0	0	0	2	1	0	0
		RE-	RP+	0	0	0	0	14	0	1	0
		RE+	RP-	0	0	0	0	0	0	0	0
		RE+	RP+	0	0	0	0	0	1	0	4

\*Vermelho: Marcações divergentes entre a citoinclusão e a peça cirúrgica.

## DISCUSSÃO

No presente estudo, a PAAF proporcionou material suficiente para a realização dos esfregaços e da citoinclusão, permitindo o diagnóstico da neoplasia e a pesquisa do receptor de estrógeno, progesterona e citoqueratina 5, o que confirma a facilidade e agilidade na obtenção de material.

Como encontrado por Cassali (2011), Goldschmidt (2011) e Sanches (2010), a idade média das cadelas acometidas pela neoplasia foi de 10 anos. Assim como a distribuição dos nódulos, sendo as mamas abdominais e inguinais as mais acometidas.

Jubb (2007), Daleck e De Nardi (2012) correlacionam essa maior prevalência de neoplasia nas mamas abdominais e inguinais com uma exposição possivelmente maior à ação hormonal, devido ao parênquima mamário mais desenvolvido.

A prevalência de 73,9% dos tumores encontrados neste trabalho ser do tipo composto é semelhante à encontrada por Figueroa (2012) e Beserra (2014), o que pode ser atribuído ao seu comportamento biológico apresentar um melhor prognóstico.

A alta incidência de tumores em cadelas não castradas e que apresentam pseudociese, encontrada neste trabalho, está de acordo com diversos estudos que relacionam esses fatores ao desenvolvimento da neoplasia (CARVALHO, 2009; OLIVEIRA FILHO, 2010; TERRA, 2012).

Há poucos trabalhos na medicina veterinária relacionados à citoinclusão. Zaroni (2012) em estudo comparativo entre a técnica de *cell block* em agarose e

os esfregaços dos tumores mamários caninos encontrou um percentual de concordância diagnóstica amostras de 13,7% e 5,9%, respectivamente, quando comparado a peça cirúrgica, demonstrando uma maior representatividade da técnica de CB.

Paiva (2011) comparou o exame citológico e citoinclusão de 12 neoplasias, encontrando concordância em 58,3% dos casos, em todos os casos a imunohistoquímica para o citoqueratina e vimentina confirmou a origem histológica.

Neste trabalho a alta correlação entre o espécime cirúrgico e a citoinclusão está de acordo com o encontrado por Bueno (2013), onde as amostras obtidas pela citoinclusão fornecem material de alta celularidade, representativo da lesão que permite a correlação entre as técnicas.

Um recente consenso publicado pelo *College of American Pathologists*, *International Association for the Study of Lung Cancer* e *Association for Molecular Pathology* orienta o uso da técnica de citoinclusão para a realização de teste imunohistoquímico de EGFR para câncer de pulmão (LINDEMAN, 2013).

A realização da IQ na citoinclusão mostra resultados superiores, quando comparada aos esfregaços, apresentando menor quantidade de artefatos, de casos falso-positivos e boa correlação com os achados do espécime cirúrgico (BUENO, 2013).

A presença de necrose na amostra citológica interfere tanto no diagnóstico da neoplasia quanto na realização de exames imunohistoquímicos (PAIVA, 2011), como observado em um caso de falso negativo do marcador RE e RP, ressaltando-se a importância do conhecimento da técnica na hora da coleta do material.

Neste estudo a análise da acurácia entre a citoinclusão e a peça cirúrgica foi de 96% para o RE e RP, que são semelhantes ao encontrado por Bueno (2013), e 100% para a CK5.

Assim como na mulher, a verificação da positividade para marcadores imunoistoquímicos possibilita a realização de quimioterapia neoadjuvante com escolha adequada dos agentes quimioterápicos, facilitando, posteriormente o procedimento cirúrgico, diminuindo seus custos e melhorando o prognóstico (ABADIE, 2011).

Há mais de 50 anos a citoinclusão é utilizada na medicina humana (CONSTANTIAN, 1973), ganhando mais força no final da década de 90 e início dos anos 2000 pela simplificação da técnica, não sendo mais necessário o uso da agarose (BUENO, 2013), o método é confiável e pode ser utilizado para triagem de pacientes, avaliação dos fatores preditivos e prognósticos relacionados a estes marcadores, além de demandar recursos financeiros reduzidos devido a menor necessidade na utilização de materiais.

A alta correlação entre a morfologia da peça cirúrgica e a citomorfologia da citoinclusão, associado à positividade encontrada nas citoinclusões do nosso estudo para o receptor de estrógeno, progesterona e para a citoqueratina 5 está de acordo com as porcentagens encontradas em peça cirúrgica na literatura para tumores mamários (FIGUEROA, 2013). Os resultados também são similares aos encontrados por Bueno (2013) em seu estudo comparativo entre citoinclusão e espécime cirúrgico de tumores mamários na mulher, o que corrobora para a implementação da técnica na rotina da Medicina Veterinária.

## CONCLUSÃO

A alta sensibilidade encontrada para marcação imunoistoquímica de RE, RP e CK5, associada à alta correlação entre o diagnóstico citomorfológico da citoinclusão e o morfológico do espécime cirúrgico, torna-se possível dizer que a técnica de citoinclusão é tão eficaz na medicina veterinária quanto na humana, o que torna o método seguro para pesquisa de marcadores prognósticos com custo financeiro reduzido.

## REFERÊNCIAS

Abadie, J. et al. Spontaneous canine mammary carcinomas as a model of human triple-negative breast cancer. *Cancer Research*: April 15, 2011; Volume 71, Issue 8, Supplement 1. doi: 10.1158/1538-7445.AM2011-LB-46

Beserra, H. E. O. Metástases de carcinoma de mama em cadelas: Avaliação da técnica de linfonodo sentinela. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu, 2014.

Bueno Angela, S. P., Viero, R. M. and Soares, C. T. Fine needle aspirate cell blocks are reliable for detection of hormone receptors and HER-2 by immunohistochemistry in breast carcinoma. *Cytopathology*, 24: 26–32, 2013. doi: 10.1111/j.1365-2303.2011.00934.x

Carvalho, M. I. S. Estudo imunohistoquímico do infiltrado de linfócitos T e da proliferação tumoral nos tumores de mama da cadela: implicações clínicas. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-

graduação em Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-Os-Montes e Alto Douro, Vila Real. 77f, 2009.

Cassali, G. D. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v.4, p. 153-180, 2011.

Constantian HM, De Girolami E. Urothelial tumors detected by cytology: New cell block technique. *J Urol* 1973;109:304-7.

Crapanzano JP, Heymann JJ, Monaco S, Nassar A, Saqi A. The state of cell block variation and satisfaction in the era of molecular diagnostics and personalized medicine. *CytoJournal* 2014;11:7.

Daleck, C.R.; De Nardi, A.B.; Rodasky, S. *Oncologia em cães e gatos*. Ed. 1, Editora Roca, 2012.

De Las Mulas, J.M.; Ordás, J.; Millán, M.Y.; Chacón, F.; De Lara, M.; De Los Monteros, A.E., et al., A. Immunohistochemical expression of estrogen receptor  $\beta$  in normal and tumoral canine mammary glands. *Vet Pathol*; 41: 269-272, 2004.

Ferreira, I. et al. Quantitative analysis of photodynamic therapy effects in rat mammary tumor vascular density using Image-Pro Plus Software. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 2013, 3, 259-262.

Figueiroa, F. C. et al. Immunoexpression of cathepsin D and S100A4 protein and their molecular subtypes in canine mammary carcinomas. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 2012, 2, 163-169.

Fioravanti, H. et al. Avaliação dos métodos de citologia e “cell block” de linfonodo nas linfadenopatias em cães. *Vet e Zootec.* 2011.

Goldschmidt, M. et al. Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. *Veterinary Pathology* v.48, n. 1, p. 117-131, 2011.

Horta, R.S.; Costa, M.P.; Lavallo, G.E.; Araújo, R.B.; Cassali, G.D. Fatores prognósticos e preditivos dos tumores caninos definidos com o auxílio da imunohistoquímica. *Ciência Rural*, v.42, n.6, p.1033-1039, Santa Maria, 2012.

INCA-Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, 2014.

Jain, D.; Mathur, S. R.; Iyer, V. K. Cell blocks in cytopathology: a review of preparative methods, utility in diagnosis and role in ancillary studies. *Cytopathology*, 11 aug 2014. DOI: 10.1111/cyt.12174.

Jubb, K. V. F.; Kennedy, P. C.; Paulmer's N. *Pathology of Domestic Animals*. Vol. 1. 5. ed. Toronto: Editora Saunders Elsevier. cap.5, p777-779, 2007.

Lindeman, N.I. et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2013 Jun;137(6):828-60. doi: 10.5858/arpa.2012-0720-OA.

Masserdotti, C. Architectural patterns in citology: correlation with histology. *Veterinary Clinical Pathology*, v.35, p.388-396, 2006.

Matos. I.; Duflath, R.; Alvarenga, M.; Zeferino, L.C.; Schmitt, F. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Archiv*, Volume 447, Issue 4, pp 688-694, 2005.

Misdorp, W. et al. *Histological classification of the mammary tumours of the dog and the cat*. Washington, D.C: Armed Forces Institute of Pathology, 2002. 59 p. WHO international histological classification of tumours of domestic animals; 2nd series, v. 7.

Mulder, A.B. et al. A simple procedure for in situ immunolabeling embedding and sectioning of layers of cultured endothelial and smooth muscle cells for both light and electron microscopy. *Biotechnic&Histochemistry*, v.72, p.45-48, 1997.

Oliveira Filho, J. C. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias – Área de concentração em Patologia Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2010.

Paiva, M. B. et al. Use of cellblock method for neoplastic diagnosis in veterinary medicine. In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 2011, Goiânia. *Anais do XV ENAPAVE*, 2011.

Paiva, M. B. et al. Utilização de marcador orgânico na técnica de cito inclusão com gel de agarose. *Vet e Zootec*. 2012.

Ramalho, L. N. Z., Ribeiro-Silva, A., Cassali, G. D., Zucoloto, S. The Expression of p63 and Cytokeratin 5 in Mixed Tumors of the Canine Mammary Gland Provides New Insights into the Histogenesis of These Neoplasms. *Vet Pathol*, 2006 43:424–429.

Raskin, R. E.; Meyer, D. J. Atlas de Citologia de Cães e Gatos. 1ª Ed., São Paulo: Editora Rocca, 2010.

Sanchez, N.; Selvaggi, S.M. Utility of cell blocks in the diagnosis of thyroid aspirates diagnostic. *Cytopathology*, v.34, n.2, p.89-92, 2006.

Sanches, O. C. Quantificação dos mastócitos nas neoplasias mamárias malignas de cadelas: análise histopatológica, histoquímica e imunoistoquímica., 206f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

Siegel, R., Naishadham, D. and Jemal, A. (2012), Cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 62: 10–29. doi: 10.3322/caac.20138

Terra, E. M. et al. Immunohistochemical expression of p53 and p63 in adenomas and carcinomas of canine mammary glands. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 2012, 2, 21-24.

Yuan, L.C. and Gulyas, B.J. An improved method for processing single cells for electron microscopy utilizing agarose. *Anat. Rec.* 1981; 201: 273–287

Yamashita H, Yando Y, Nishio M, Zhang Z, Hamaguchi M, Mita K, et al. Immunohistochemical evaluation of hormone receptor status for predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Breast Cancer*. 2006; 13 (1): 74-83.

Zanoni, D. S.; Grandi, F.; Rocha, N. S. Use of the agarose cell block technique in veterinary diagnostic cytopathology: an “old and forgotten” method. *Vet Clin Pathol* 41/3, 307–310, 2012.

Zuccari D.A.P.C.; Santana A.E.; Rocha N.S. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 38:38-41, 2001.

Zuccari, D.A.P.C; Berton, C.R.; Terzian, A.C.B.; Ruiz, C.M. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias – importância dos marcadores imuno-histoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo. Arq Ciênc Saúde 2008 out/dez;15(4):189-98

## 7. CONCLUSÕES

Este estudo revelou alta correlação entre o diagnóstico citomorfológico da citoinclusão e o morfológico do espécime cirúrgico.

Os valores encontrados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia, foram por vezes superiores aos descritos na medicina humana, indicando tratar-se a citoinclusão de um método seguro para a pesquisa de marcadores prognósticos.

A citoinclusão mostrou alta sensibilidade e especificidade imunoistoquímica nos carcinomas mamários em cadelas para receptor de estrógeno, progesterona e citoqueratina 5, podendo extrapolar a mesma expectativa para outros marcadores.

O diagnóstico precoce e o perfil molecular da neoplasia contribui para tratamentos mais específicos e portanto, mais eficazes.

## **8. PERSPECTIVAS**

A citoinclusão parece ter um futuro promissor na oncologia veterinária, ao exemplo da medicina humana, onde essa técnica tem-se mostrado efetiva na avaliação de marcadores imunoistoquímicos.

Mediante a identificação das limitações e conhecimento da técnica, que requer treinamento profissional para a maneira correta de puncionar a lesão e processar o material, resta-nos tirar vantagem do método que apresenta novas perspectivas diagnósticas e prognósticas, com maior rapidez de diagnóstico e custo financeiro reduzido.

## 10. ANEXOS


### 1) APROVAÇÃO PROJETO CEUA



## A T E S T A D O

Atesto para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa "**Carcinoma primário de mama na cadela: expressão de receptores hormonais e CK5 em citoinclusão comparativo a peça cirúrgica**" Protocolo nº 119/2014-CEUA, da Professora Noeme Sousa Rocha, a ser conduzido por **Tatiany Luiza Silveira** desta Faculdade, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 08 de agosto de 2014.

  
**Profª. Ass. Drª. Maria Lúcia Gomes Lourenço**

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

## ATESTADO

Atesto para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa **"Sensibilidade da citoinclusão (PAAF) para detecção de CK5, RE e RP no carcinoma primário de mama na cadela"** Protocolo nº 119/2014-CEUA, da Professora Noeme Sousa Rocha, a ser conduzido por **Tatiany Luiza Silveira** desta Faculdade, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 17 de novembro de 2014.



**Profª. Ass. Drª. Maria Lúcia Gomes Lourenço**

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

## 2) PROTOCOLO ANESTÉSICO

Medicação pré-anestésica: Morfina 0,5mg/kg IM.

Indução: Propofol 5mg/kg dose efeito.

Manutenção: Isoflurano diluído em oxigênio a 100%.

Peridural: Morfina 0,1mg/kg e Lidocaína 2% com vasoconstritor dose 5mg/kg.

Pós-cirúrgico: Meloxicam 0,2mg/kg SC e Ceftriaxona 30mg/kg IV.

Técnica cirúrgica:

A seleção da técnica (Mastectomia unilateral, bilateral ou em L) depende do tamanho do tumor, número de glândulas mamárias afetadas, local, fixação entre os tecidos anexos e estado clínico do paciente, devendo sempre haver ressecção dos linfonodos sentinelas (Fossum, 2007; Orsini, 2014).

Em regra geral faz-se uma incisão elíptica ao redor das glândulas mamárias (1ª à 5ª) a no mínimo 1cm do tumor. Continua-se a incisão através do tecido subcutâneo até a fáscia da parede abdominal externa. Controlar hemorragias superficiais com eletrocoagulação, pinças hemostáticas e/ou ligaduras. Realizar uma excisão em bloco elevando uma das extremidades da incisão e dissecando o tecido subcutâneo da fáscia peitoral até o reto abdominal. Usar tração sobre a pele elevada para facilitar a dissecação (Fossum, 2007).