

AValiação da imunomarcção da proteína C-KIT (CD-117) em tumores mamários caninos

(Evaluation of c-kit protein (CD-117) immunostaining in canine mammary tumors)

André Rebelo PANTOJA^{1*}; Marina Mariana de Sousa BASTOS²;
Carolina Franchi JOÃO³; Mário José Costa CARNEIRO³; Pedro Silva BEZERRA³

¹Universidade da Amazônia (UNAMA), Rua Rosa Vermelha, 335. Aeroporto Velho, Santarém, PA.
CEP: 68.010-200. ²Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA).

³Universidade Federal do Pará (UFPA), Instituto de Medicina Veterinária.

*E-mail: pantoja.ar@gmail.com

RESUMO

As neoplasias mamárias em cadelas têm uma significativa relevância na rotina clínica veterinária e a busca de novos fatores associados na sua etiopatogenia e terapêutica faz-se necessária para possibilitar o estudo de novas terapias mais eficazes. Objetivou-se com o presente estudo avaliar a imunomarcção do c-kit em tumores amários caninos benignos e malignos pela técnica de imunohistoquímica. As amostras foram avaliadas quanto a sua intensidade de marcação e porcentagem de células marcadas para obtenção do escore final. Como controle positivo foi utilizada uma amostra de mastocitoma. Foram avaliadas 32 amostras previamente diagnosticadas de carcinomas mamários e cinco amostras de tumores mamários benignos. Todos os tumores apresentaram imunomarcção pelo c-kit com padrão citoplasmático. Dezesesseis carcinomas apresentaram escore baixo de imunomarcção e 16 apresentaram escore alto. Em relação aos tumores mamários benignos, todos apresentaram escore de imunomarcção alto. A imunomarcção pelo c-kit foi maior nos tumores benignos quando comparados aos tumores malignos. Os carcinomas anaplásicos apresentaram escore final alto e grau III, sugerindo uma maior expressão neste tipo tumoral.

Palavras-chave: Neoplasia mamária; proto-oncogene; imunoistoquímica; cadelas.

ABSTRACT

Mammary neoplasms in dogs have a significant relevance in the veterinary clinical routine and the search for new associated factors in its etiopathogenesis and therapy is necessary to enable the study of new more effective therapies. This study aimed to evaluate the behavior of c-kit expression in benign and malignant canine mammary tumors by immunohistochemistry. The samples were evaluated for intensity staining, percentage of labeled cells, to obtain the final score. For the positive control was used a positive mastocytoma sample for c-kit expression. 32 samples of breast carcinomas and five samples of benign breast tumors were used. All tumors express c-kit, with cytoplasmic pattern. Sixteen carcinomas showed a low score of immunostaining and 16 had high scores. All benign breast tumors had high immunostaining score. Expression of c-kit was greater in tumors compared to benign malignant tumors. The anaplastic carcinomas showed high final score and grade III. suggesting greater expression in this tumor type.

Key words: Mammary tumor; CD117; immunohistochemistry; female dogs.

*Endereço para correspondência:
pantoja.ar@gmail.com

INTRODUÇÃO

Os tumores de mama são considerados um dos mais prevalentes em cadelas (CASSALI *et al.*, 2014) e mulheres (INCA, 2013), contudo, em cadelas, observa-se uma incidência duas a três vezes maior do que em mulheres (CASSALI *et al.*, 2014). Outro dado relevante, é que entre os tumores mamários diagnosticados, a incidência de tumores malignos chega a 50 %. (AL-DISSE *et al.*, 2012).

Assim como as demais neoplasias, os tumores mamários apresentam mutações específicas em genes. As neoplasias mamárias podem apresentar uma codificação de proteínas quinases e são, provavelmente, responsáveis por eventos cancerígenos primários. As tirosinas quinases pertencem à família de proteínas que tem papel no processo de sinalização e controle do crescimento celular. A mutação nos proto-oncogenes que codificam os receptores de tirosina quinase ou a superexpressão desses acarretam um descontrole no envio de sinais para proliferação celular que é fundamental para o desenvolvimento neoplásico (LONDON, 2009). A supressão do c-kit também é descrita ocorrendo numa fase precoce da transformação maligna do epitélio do tecido mamário em humanos o que indicaria uma alteração no sinal de transdução quando relacionado à transformação maligna no câncer de mama (MUNDIM e LOGULLO, 2009).

Em estudo realizado com ratos que apresentavam deleção do gene W (gene que codifica o c-kit), observou-se que 80% destes desenvolveram tumor de mama quando induzidos por um carcinógeno (N-nitrosometilureia), já os animais do grupo sem deleção do gene W não desenvolveram o tumor, demonstrando que a falta de expressão do c-kit nestes animais permitiu o desenvolvimento de tumores de mama (MAFFINI, 2008).

Em tumores mamários primários em mulheres, foi observada a diminuição da expressão de c-kit em carcinomas da mama invasivo e não invasivo em comparação com o epitélio mamário normal (POLAT, 2007). Deste modo, objetivou-se com o presente estudo avaliar a imunomarcagem do c-kit em tumores mamários caninos benignos e malignos, pela técnica de imunistoquímica.

MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal do Pará - UFPA, sob o número 1760150316. Foram selecionadas 32 amostras procedentes de caninos, com diagnóstico de carcinoma mamário e cinco amostras de tumores mamários benignos, emblocadas em parafina, provenientes do Laboratório de Patologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária, UFPA- Castanhal. A classificação dos tumores foi realizada de acordo com a Organização Mundial da Saúde, modificado por Misdorp *et al.* (1999).

Os graus histológicos foram estabelecidos da seguinte forma: cada amostra recebeu escore entre 1 e 3 para cada parâmetro avaliado (formação tubular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico). Os escores foram somados e o grau histológico foi expresso da seguinte forma: baixo ou I (3-5 pontos), intermediário ou II (6-7 pontos), e alto ou III (8-9 pontos) (KARAYANNOPOULOU *et al.*, 2005).

*Endereço para correspondência:
pantoja.ar@gmail.com

As amostras de carcinomas mamários e de tumores mamários benignos foram submetidas à reação de imunistoquímica para avaliação da imunomarcação da proteína c-kit proto-oncog nica. Os cortes de 5 micrometros foram desparafinizados, reidratados em bateria de álcoois e xil is, e lavados com soluço PBS (pH 7,2). Para a recupera o antig nica foi utilizada soluço de citrato 2mM, pH 6,0, em microondas por 15 minutos em potência máxima. Posteriormente, as amostras foram tratadas com soluço de peróxido de hidrog nio 0,1% por 10 minutos para bloqueio da peroxidase endógena.

Os anticorpos inespecíficos foram bloqueados com leite em p  1% por 15 minutos no agitador. Em seguimento a técnica, as amostras foram incubadas com anticorpo primário anti-c-kit (anti-CD117, Dako, Cod. A4502) na dilui o de 1:150, overnight a 4  C. Foi utilizado para a detec o o kit Envision Dual link (Dako, c d. K4065) por uma hora a temperatura ambiente, posteriormente as rea o es foram reveladas pelo substrato cromog nico 3,3 diaminobenzidina (Cód. SK-4100 - DAB Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) e as lâminas contracoradas pela hematoxilina Harris.

Os resultados foram estabelecidos de acordo com o local da marca o, sendo classificada como M (membranoso), quando a marca o for uniforme ao longo das bordas celulares e como C (citoplasmático), quando distribuída uniformemente pelo citoplasma. Além disso, foi avaliada a intensidade de colora o das rea o es, classificadas como marca o, intensa (3), moderada (2), fraca (1) e ausente (0) e a extensão da imunomarca o, por meio de escore: 0 – nenhuma célula marcada, 1 - até 25% das células positivas; 2 – 26 a 50% das células positivas; 3 – 51 a 75% das células positivas e 4 - >75% das células positivas. O valor do escore variou de 1 a 12 e o resultado final foi obtido pela multiplica o do valor da distribu o pelo da intensidade de acordo com Salvador, (2014). Em seguida as amostras foram divididas em grupos de baixo (0-5) e alto (6-12) escore final de extensão da imunomarca o (LAVALLE *et al.*, 2009).

Como controle negativo da rea o, em uma lâmina substitui-se o anticorpo primário por PBS, e em outra, por imunoglobulina de coelho, na mesma dilui o do anticorpo primário. Para o controle positivo foram usados cortes de mastocitomas caninos.

O teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar a imunomarca o do c-kit. O programa SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA) foi usado para avaliar o grau de malignidade entre os tumores mamários malignos e benignos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras apresentaram padrões de imunomarca o citoplasmática para o c-kit (Fig. 01). Dos 32 carcinomas mamários avaliados 16 (50%) apresentaram escore final alto e 16 (50%) apresentaram escore final baixo. Todos os tumores benignos apresentaram escore final alto (Tab. 01). Entre os tumores malignos avaliados com o escore final alto na imunomarca o, sete (43,7%) tiveram GI, sete (43,7%) GII e apenas dois (12,5%) GIII. J  os que foram classificados com escore final baixo, sete (43,7%) tiveram GI, cinco (31,2%) GII e quatro (25%) GIII.

*Endereço para correspondência:
pantoja.ar@gmail.com

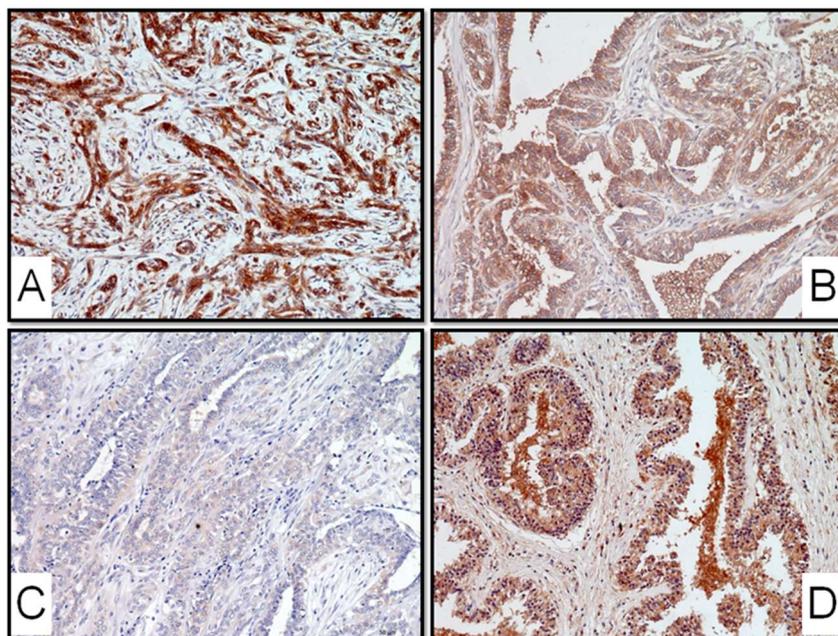


Figura 01: Fotomicrografia de imunomarcção citoplasmática da proteína c-kit.

A. Carcinoma em tumor misto escore 3 e intensidade 3. B. Carcinoma complexo: escore 3 e intensidade 2. C. Carcinoma em tumor misto: escore 2 e intensidade 1. D. Adenoma papilar-cístico: escore 4 e intensidade 3 (objetiva 20).

Quando analisamos a partir do grau histológico, dos 14 (43,75%) carcinomas que foram classificados como GI, 16 (50%) tiveram escore de imunomarcção alto e 16 (50%) baixo, dos 12 (37,5%) classificados como GII, sete tiveram escore alto e cinco, baixo, e dos seis (18,7%) classificados como GIII, dois tiveram escore alto e quatro baixos.

Entre os tumores benignos, todos foram classificados como escore alto, entre eles quatro (80%) foram classificados em GI e apenas um (20%) em GII. Dos tumores benignos 80% apresentaram intensidade de marcação forte diferindo dos carcinomas, os quais apenas 21,8% apresentaram marcação forte ($p=0,0151$). Também houve diferença ($p=0,0078$) entre na porcentagem de células marcadas entre os tumores benignos e malignos, 100% dos tumores benignos e apenas 56,25% dos tumores malignos apresentaram mais de 50% das células marcadas. Todos os tumores benignos (100%) apresentaram escore final de imunomarcção alto, diferindo dos carcinomas, nos quais apenas 50% tiveram essa classificação ($p=0,0078$).

Gráus de malignidade I e II foram identificados em 100% dos tumores benignos e 81,5% dos tumores malignos. Grau III foi observado em 18,5% dos carcinomas e em nenhum dos tumores benignos ($p=0,0037$). Não foi significativa a diferença quando se comparou o grau de malignidade entre os carcinomas com escore alto e baixo ($p=0,0678$).

Os resultados obtidos permitem inferir que houve expressão do c-kit em todos os tumores mamários caninos, independente do caráter benigno ou maligno. Nosso estudo obteve padrões de imunomarcção citoplasmático em todas as amostras. A imunomarcção de c-kit é variável em tumores mamários benignos quando comparada com sua expressão em carcinomas mamários malignos que se de mostrou fraca, o que foi observado em cadelas

*Endereço para correspondência:
pantoja.ar@gmail.com

no presente trabalho e também por Polat (2007) em mulheres, demonstrando um potencial uso de terapias alvos futuramente.

Tabela 1. Expressão da proteína c-kit e grau histológico de cada variante histológica de tumores mamários malignos e benignos de cadelas (CASTANHALL, 2016).

Tipo histológico	IM	% CM	EF	GH
CARCINOMA COMPLEXO	3	3	9\ ALTO	GII
	3	3	9\ ALTO	GII
	2	3	6\ ALTO	GI
	2	3	6\ ALTO	GI
	2	1	2\ BAIXO	GIII
	1	2	2\ BAIXO	GI
	2	3	6\ ALTO	GI
CARCINOMA SÓLIDO	1	1	2\ BAIXO	GI
	2	2	4\ BAIXO	GIII
	2	1	2\ BAIXO	GIII
	2	1	2\ BAIXO	GII
CARC. TUBULAR SIMPLES	2	3	6\ ALTO	GI
	2	2	4\ BAIXO	GI
CARC. EM TUMOR MISTO	3	4	12\ ALTO	GI
	3	3	9\ ALTO	GII
	3	3	9\ ALTO	GI
	1	3	3\ BAIXO	GI
	2	3	6\ ALTO	GII
	1	2	2\ BAIXO	GI
	2	2	4\ BAIXO	GI
	3	3	9\ ALTO	GII
CARC. TUBULO-PAPILAR	2	2	4\ BAIXO	GII
	2	2	4\ BAIXO	GIII
	3	3	9\ALTO	GI
	2	3	6\ ALTO	GII
	1	2	2\ BAIXO	GII
	1	3	3\ BAIXO	GII
	2	2	4\ BAIXO	GII
	2	3	6\ ALTO	GII
	2	3	6\ ALTO	GIII
	2	3	6\ ALTO	GIII
CARCINOMA MUCINOSO	2	2	4\ BAIXO	GI
TUMOR MISTO BENIGNO	2	3	6\ALTO	GI
	3	3	9\ALTO	GI
	3	3	9\ALTO	GII
ADENOMA PAPILAR-CISTICO	3	4	12\ALTO	GI
	3	4	12\ALTO	GI

IM = Intensidade de marcação: 0 – ausente; 1 - fraca; 2 - moderada; 3 – forte; **% CM** = porcentagem de células marcadas: 0-nenhuma; 1 - até 25%; 2 - 26 a 50%; 3 – 51 a 75%; 4 – 76 a 100%; **EF** – Escore final – obtido pela multiplicação: **IM x %CM. (0 a 5) \ Baixo; (6 a 12) \ Alto.**

Não há uma concordância entre autores em relação ao comportamento da expressão de c-kit em tumores mamários em mulheres. Em um estudo recente de Martini et al. (2014), os tumores de mama em mulheres com maior expressão de c-kit foram associados com pior prognóstico para as pacientes. Já outro estudo mostra a expressão reduzida de c-kit em

*Endereço para correspondência:
pantoja.ar@gmail.com

tumores malignos quando comparados com a expressão em tumores benignos (POLAT, 2007), resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho. Demonstrando uma certa correlação na expressão do c-kit com um prognóstico desfavorável.

Os resultados da expressão do c-kit em tumores mamários apresentaram um comportamento diferente ao observado em mastocitomas, onde há maior expressão do c-kit em mastocitomas de graus mais avançados e menos diferenciados (REGUERA *et al.*, 2000). Nos mastocitomas, apesar do caráter maligno da neoplasia, não há dificuldade de detecção da proteína pelo anticorpo, como proposto nas neoplasias mamárias. Podendo-se sugerir potencial para uma ampla utilização de terapias alvos em diferentes graus de malignidade nos tumores mamários após novos estudos da expressão da proteína c-kit.

Apesar dos tumores mamários benignos terem apresentado maior expressão que os malignos de maneira geral, vale ressaltar que as duas amostras de carcinoma anaplásico estudadas apresentaram escore final de imunomarcção alto e classificação histológica de malignidade grau III. Essa é uma variante histológica ligada a um prognóstico ruim, com comportamento agressivo, aparecimento de recidivas e metástases (CASSALI *et al.*, 2014). O que pode ser explicado pela variação de expressão da proteína c-kit em todas as formas histológicas de tumores mamários de cadelas, ou infere-se que haja uma maior expressão na fase inicial do processo neoplásico dos tumores de mama.

CONCLUSÃO

Foi observado expressão citoplasmática do c-kit fo em todas as amostras de neoplasias mamárias, malignas e benignas, sendo que os tumores mamários benignos apresentam maior expressão do c-kit quando comparados aos carcinomas mamários, entre os quais, os carcinomas anaplásicos avaliados apresentaram grau de malignidade alto e escore de imunomarcção alto sugerindo uma maior expressão neste tipo tumoral, porém novos estudos devem ser elaborados.

REFERÊNCIAS

AL-DISSI, A.N.; HAINES, D.M.; SINGH, B.; KIDNEY, B.A. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 in canine simple mammary gland adenocarcinomas. *The Canadian Veterinary Journal*, v.5, n.10, 2010.

CASSALI, G.D.; LAVALLE, G.E.; DE NARDI, A.B.; FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A.C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, A.C.; DALECK, C.R.; SALGADO, B.S.; FERNANDES, C.G.; SOBRAL, R.A.; AMORIM, R.L.; GAMBA, C.O.; DAMASCENO, K.A.; AULER, P.A.; MAGALHÃES, G.M.; SILVA, J.O.; RAPOSO, J.J.; 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.; GUIM,

*Endereço para correspondência:
pantoja.ar@gmail.com

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.; BEZERRI, J.E.; FREHSE, M.S.; PAES DE ALMEIDA, E.C.; CAMPUS, C.B. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v.4, p.153-180, 2014.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). Tipos de câncer: mama. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2013. Acesso em 19 de maio de 2015. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>. Acesso em 13 de abril de 2016.

KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.D.A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary Carcinomas: application of a human grading method. *Journal of Comparative Pathology*, v.133, p.246-252, 2005.

LAVALLE, G.E.; BERTAGNOLLI, A.C.; TAVARES, W.L.F.; CASSALI, G.D. COX-2 Expression in Canine Mammary Carcinomas: Correlation with Angiogenesis and Overall Survival. *Veterinary Pathology*, v.46, p.1275-1280, 2009.

LONDON, C.A. Tyrosine kinase inhibitors in veterinary medicine. *Topic in Companion Animal Medicine*, v.24, p.106-112, 2009.

MARTINI, A.R.A.F.; DAMIANO, R.F.; TOLEDO, M.T.; SANTOS, N.B.; RODRIGUEIRO, D.A. Expressão de c-kit como fator prognóstico para pacientes com câncer de mama triplo-negativos. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*, v.16, 2014.

MAFFINI, M.V.; SOTO A.M.; SONNENSCHN, C.; PAPADOPOULOS, N.; THEOHARIDES, T.C. Lack of c-kit receptor promotes mammary tumors in N-nitrosomethylurea-treated Ws/Ws rats. *Cancer Cell International*, v.8, p.5, 2008.

MISDORP W.; ELSE R.W.H. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. 2^a ed., Washington: Armed Forces Institute of Pathology, v.7, n.59, p.18-27, 1999.

MUNDIM, F.G.L.; LOGULLO, A.F. Role of the expression of the tyrosine kinase receptor KIT in invasive ductal carcinomas of the breast. *Applied Cancer Research*, v.29, n.2, p.50-57, 2009.

POLAT, A. C-kit expression in columnar cell lesions of the breast accompanied by benign and malignant breast diseases. *Pathology, Research and Practice*, v.203, p.765-9, 2007.

REGUERA, M.J.; RABANAL, R.M.; PUIGDEMONT, A.; FERRER, L. Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. *American Journal of Dermatopathology*, v.22, p.49-54, 2000.

SALVADOR, R.C.L. Expressão gênica e proteica da cox-2 e c-kit em neoplasias mamárias de cadelas. 79p. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, 2014.

*Endereço para correspondência:
pantoja.ar@gmail.com