

**ARIANA RADAR CHAFIROVITCH**

**IMUNOEXPRESSÃO DE ALFA-ACTINA DO  
MÚSCULO LISO E DE DESMINA, CONTRIBUIÇÃO  
PARA A CARACTERIZAÇÃO DO ESTROMA DOS  
ADENOCARCINOMAS DO ENDOMÉTRIO DA GATA**

**Orientadora:** Maria dos Anjos Clemente Pires

**Co-orientador:** Rui Pedro Brás Martins Faísca

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa**

**2016**

**ARIANA RADAR CHAFIROVITCH**

**IMUNOEXPRESSÃO DE ALFA-ACTINA DO  
MÚSCULO LISO E DE DESMINA, CONTRIBUIÇÃO  
PARA A CARATERIZAÇÃO DO ESTROMA DOS  
ADENOCARCINOMAS DO ENDOMÉTRIO DA GATA**

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 21 de Novembro de 2016 perante o júri nomeado pelo Despacho Reitoral 413/2016 com a seguinte composição:

**Constituição do Júri:**

Presidente: Professora Doutora Sofia Varela van Harten

Arguente: Professor Doutor Daniel de Mouta Murta

Orientadora: Professora Doutora com agregação Maria dos Anjos Clemente Pires

Co-orientador: Professor Doutor Rui Pedro Brás Martins Faísca

**Univerisdade Lusófona De Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade De Medicina Veterinária**

**Lisboa**

**2016**

Para os meus irmãos Lourenço e Vicente,  
Para as três-Marias

## Agradecimentos

À Faculdade e professores de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, que proporcionaram a minha formação enquanto futura Médica Veterinária. À Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, por possibilitar a realização desta tese.

À Professora Laurentina Pedroso, Diretora do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Ao Centro de Estudos de Ciência Animal e Veterinária da UTAD (CECAV), em especial à sua Diretora, Professora Rita Payan Carreira, pela oportunidade de desenvolvimento do presente estudo.

A todos os docentes da equipe do Laboratório de Histologia e de Anatomia Patológica da UTAD (LHAP), pela oportunidade de aprendizagem, de realização de um trabalho de investigação, e por toda a simpatia com a qual me acolheram.

À orientadora, Professora Maria dos Anjos Pires, por me ter aceitado como orientanda e pela oportunidade de participar nesta aventura da investigação veterinária. Agradeço por todos os conhecimentos transmitidos, pela constante disponibilidade, pela ajuda imprescindível no decorrer das atividades laboratoriais e ao longo da realização desta tese. Agradeço também pelos vários projetos desenvolvidos em paralelo, pela simpatia, paciência, conselhos e amizade.

Ao Coorientador, Professor Pedro Faísca, pela disponibilidade demonstrada ao longo deste estudo, pelos conhecimentos transmitidos, por ter despertado o fascínio pela patologia, por ter possibilitado o desenvolvimento de outros projetos e pelos seus conselhos ao longo do curso.

Às Professoras Fernanda Seixas Travassos e Adelina Gama Quaresma, pela ajuda nos momentos de crise de prática laboratorial, pela simpatia e ensinamentos, essencialmente no que se refere ao programa de *software* de análise estatística. À professora Rita Payan Carreira, pela ajuda demonstrada sobretudo no domínio da pesquisa bibliográfica.

À Lígia Lourenço pelo trabalho técnico exemplar na preparação das lâminas, pelo acompanhamento e ensinamentos ao longo de todo o trabalho laboratorial. À D. Ana Palácio e à D. Glória Milagre pela hospitalidade a constante assistência e boa disposição.

À Maria, a “minha” técnica e companheira de bancada, pelas dicas e assistência na execução da técnica de imunohistoquímica que contribuíram para a qualidade deste estudo, e principalmente pela amizade.

Aos bioquímicos e *lab partners* Ângela e Jorge, por toda a ajuda, pelo desenho de projetos paralelos, ao Jorge por ouvir e partilhar as ideias sobre ciência, à Ângela por me ter acompanhado no início do trabalho laboratorial. Também aos parceiros de laboratório Sílvia, Renato, Fátima e Daniela.

O Dr. Miguel Tavares-Pereira pelos ensinamentos conselhos e simpatia. À Dra. Ana Faustino por esclarecer dúvidas relativamente à técnica de imunohistoquímica.

À Dra. Susana, Dra. Cláudia à Patrícia e à Dra. Clara pela amizade e partilha de conhecimentos.

A todos os que estiveram envolvidos no projeto da Ilha de Faro, especialmente ao Nuno França pelo transporte de amostras.

A todos os responsáveis pela recolha de amostras incluindo Cláudia Mendes, Sarah Ottavi, Joana Ripado e ao Pedro Morais.

Novamente ao Pedro Morais e à Kita pela ajuda na formatação

À madrinha Dra. Lorena Panarisi, pela assistência e amizade.

Aos queridos amigos de curso.

Aos amigos de infância e de sempre.

E sobretudo agradeço à minha mãe, ao meu pai, aos meus avós, ao Nuno, e aos meus irmãos, por acreditarem sempre nos meus sonhos.

## Resumo

Os adenocarcinomas do endométrio da gata (AEG's) são considerados raros, porém estudos recentes sugerem que os AEG's possam ser mais frequentes do que o descrito pela literatura. O estroma modela o microambiente dos AEG's desempenhando um papel essencial no seu comportamento e agressividade.

Recorrendo à imunohistoquímica avaliamos a expressão de antígenos protéicos presentes no citoesqueleto, a desmina pertencente aos filamentos intermédios e alfa-actina pertencente aos microfilamentos, em AEG's papilares serosos (n=34), e foram utilizados como grupos controlo úteros de gatas sem doença (n=24) nas fases folicular e lútea. Avaliaram-se os diferentes epitélios, estroma, miométrio e os vasos do estroma e do estrato vascular.

A invasão do miométrio poderá ser considerado um indicador importante de prognóstico destas lesões, sendo a desmina o anticorpo mais fiável para avaliar distintamente esta invasão, com aplicação vantajosa no diagnóstico.

Os úteros durante o ciclo não apresentaram, em relação a estes dois marcadores, variações relevantes entre si. Encontraram-se diferenças significativas no estroma neoplásico com maior expressão da alfa-actina do músculo liso comparando-as com as fases normais, sugerindo fortemente a presença de miofibroblastos. Os vasos apresentaram maior marcação para a alfa-actina do músculo liso comparativamente com a desmina.

A desmina apresentou imunoexpressão em células epiteliais neoplásicas, resultado significativo quando comparado com os grupos controlo. Estes resultados sugerem a existência de transição epitélio-mesenquima nos AEG's.

Palavras Chave: Adenocarcinomas do endométrio em gatas; Alfa-actina do músculo liso; Desmina; Estroma;Útero.

## Abstract

Feline endometrial adenocarcinomas (FEA) are considered rare, nevertheless recent studies suggest that they might be more common than literature describes. Microenvironment and stroma of FEA are critical features of neoplasms that play a major role in his aggressiveness and behavior.

We evaluated the expression of protein antigens present in the cytoskeleton, desmin belongs intermediate filaments and alpha-actin belongs to microfilaments, by immunohistochemistry, in FEA papillary serous type, (n=34), and in normal uterus used as control groupe (n=24) in follicular phase and luteal phase.

The distinctive structures as epithelial, stromal, myometrial, stroma vessels and stratum vascular vessels within the uterus were evaluated.

The myometrial invasion could be considered as an important prognosis feature in the prognosis in this neoplasia, and the desmin is the most reliable antibody and clear marker to evaluated this invasion with useful a lication in the pathological diagnosis.

With this two markers, the normal oestrus cycle uterus did not showed relevant variations among them.

Significant differences were found in FEA stroma compared to the control group, with higher intensity for alpha actin that suggests the presence of myofibroblasts.

In general vessels show a higher expression for alpha actin when compared to desmin.

Neoplastic epithelial cells reveal higher immunexpression to desmin, results that are significant when compared to control group. Those results strongly suggested evidence of epithelial mesenchymal transition in FEA.

**Key words:** Feline-adenocarcinoma; Smooth-muscle-actin; Desmin; Stroma; Uterus

## Abreviaturas, siglas e símbolos:

AEG's- Adenocarcinomas do endométrio da gata

AEG - Adenocarcinoma do endométrio da gata

$\alpha$ -ML – Alfa-actina do músculo liso

DES - Desmina

IF- Filamentos intermédios

TEM – Transição epitelio-mesenquima

OVH – Ovariohisterectomia

nm – Nanómetros

DAB - 3,3'-Diaminobenzidina

TAM – Macrófagos associados ao tumor

FIGO-Federação Internacional de Ginecologia e Obstetria

PBS – Tampão fosfato salino

CAF's – Fibroblastos associados à neoplasia

COX-2 - Ciclo-oxigenase 2

PGE-2 - Prostaglandina E2

VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial

TGF- $\beta$ 1- Factor de transformação de crescimento beta1

TNF - Factor necrose tumoral

Lh - Hormona luteinizante

FSH- Hormona estimulante dos folículos

n - Número

MEC – Matriz extra celular

RX - Raio-x

MMP- Metaloproteinases

Fig – Figura

Obj – Objetiva

## Índice Geral

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Resumo.....                                                                        | 5  |
| Abreviaturas siglas e símbolos.....                                                | 7  |
| Introdução.....                                                                    | 12 |
| 1.1 Nota introdutória.....                                                         | 12 |
| 1.2 Fisiologia reprodutiva e ciclo éstrico da gata.....                            | 12 |
| 1.2.1 Considerações gerais.....                                                    | 12 |
| 1.2.2 Ciclo éstrico da gata.....                                                   | 14 |
| 1.3 Anatomia e histologia do sistema reprodutor feminino da gata.....              | 15 |
| 1.4.1 Citoesqueleto, filamentos intermédios e desmina.....                         | 18 |
| 1.4.2 Actina e alfa-actina do músculo liso.....                                    | 20 |
| 1.5 Adenocarcinomas do endométrio.....                                             | 21 |
| 1.5.1 Epidemiologia.....                                                           | 22 |
| 1.5.2 Aspeto morfológico dos AEG's.....                                            | 23 |
| 1.5.3 Sinais clínicos dos AEG's .....                                              | 25 |
| 1.5.4 Diagnóstico e exames complementares.....                                     | 25 |
| 1.5.5 Tratamento dos AEG's.....                                                    | 26 |
| 1.6.1 Microambiente, invasão e metastização.....                                   | 26 |
| 1.6.2 Transição epitelial-mesênquima (TEM).....                                    | 29 |
| 1.7 Imunohistoquímica.....                                                         | 31 |
| 1.8 Objetivos.....                                                                 | 33 |
| 2 Materiais e métodos.....                                                         | 34 |
| 2.1 Imunohistoquímica.....                                                         | 35 |
| 2.2.1 Protocolo utilizado.....                                                     | 36 |
| 2.2.2 Avaliação da imunoexpressão.....                                             | 37 |
| 2.3 Análise estatística.....                                                       | 38 |
| 3 Resultados.....                                                                  | 38 |
| 3.1 Imunoexpressão de alfa-actina do músculo liso .....                            | 38 |
| 3.2 Imunoexpressão de desmina.....                                                 | 43 |
| 3.3 Imunoexpressão de desmina e alfa-actina do músculo liso em úteros normais..... | 47 |

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4 Comparação da imunoexpressão da desmina e alfa-actina nos adenocarcinomas do endométrio..... | 50 |
| 3.5 Invasão do miométrio .....                                                                   | 53 |
| 4 Discussão.....                                                                                 | 55 |
| 5 Conclusão.....                                                                                 | 68 |
| 6 Referências Bibliográficas.....                                                                | 70 |
| Anexos.....                                                                                      | I  |

## Índice de tabelas

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 Anticorpos desmina e alfa-actina do músculo liso.....                                                              | 35 |
| Tabela 2 Avaliação da intensidade.....                                                                                      | 38 |
| Tabela 3 Imunoexpressão de alfa-actina do músculo liso.....                                                                 | 40 |
| Tabela 4 Imunoexpressão de desmina em fases normais.....                                                                    | 44 |
| Tabela 5 Imunoexpressão de alfa-actina do músculo liso em fases normais.....                                                | 47 |
| Tabela 6 Imunoexpressão de desmina em fases normais.....                                                                    | 48 |
| Tabela 7 Comparação da imunoexpressão de desmina e alfa-actina do músculo liso em adenocarcinomas do endométrio felino..... | 51 |
| Tabela 8 Invasão do miométrio recorrendo ao marcador desmina.....                                                           | 55 |
| Tabela 9 Invasão do miométrio recorrendo ao marcador alfa-actina do músculo liso.....                                       | 55 |
| Tabela 10 Moléculas extracelulares envolvidas na invasão neoplásica e no processo de metastização.....                      | I  |

## Índice de Figuras:

|                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 Variação das diferentes hormonas no sangue da gata ao longo do seu ciclo<br>éstrico.....                                             | 14 |
| Figura 2 Aspeto histológico de um útero de gata.....                                                                                          | 18 |
| Figura 3 Representação esquemática da desmina e alfa-actina do músculo liso.....                                                              | 20 |
| Figura 4 Aspeto macroscópico e microscopico de AEG's.....                                                                                     | 24 |
| Figura 5 Fases de formação de um adenocarcinoma.....                                                                                          | 28 |
| Figura 6 Representação esquemática da transição epitélio-mesênquima.....                                                                      | 30 |
| Figura 7 Representação do método indireto de imunohistoquímica.....                                                                           | 32 |
| Figura 8 Gráfico representando a intensidade de expressão da alfa-actina do músculo<br>liso.....                                              | 41 |
| Figura 9 Imunoexpressão da alfa-actina do músculo liso.....                                                                                   | 41 |
| Figura 10 Gráfico representando a intensidade de expressão desmina.....                                                                       | 45 |
| Figura 11 Imunoexpressão de desmina.....                                                                                                      | 46 |
| Figura 12 Imunoexpressão da alfa-actina do músculo liso em todas as estruturas estudadas<br>em caos normais.....                              | 49 |
| Figura 13 Imunoexpressão de desmina em todas as todas as estruturas estudadas em casos<br>normais.....                                        | 49 |
| Figura 14 Representação da intensidade de imunoexpressão de alfa-actina do músculo liso e<br>da desmina em adenocarcinomas do endométrio..... | 52 |
| Figura 15 Invasão do miométrio recorrendo ao marcador desmina.....                                                                            | 53 |
| Figura 16 Invasão do miométrio recorrendo ao marcador alfa-actina do músculo liso.....                                                        | 53 |

# 1 Introdução

## 1.1 Nota introdutória

O estudo de doenças neoplásicas malignas do trato genital dos animais de companhia é de elevado interesse, quer do ponto de vista clínico-patológico quer na perspetiva da fertilidade e preservação das espécies (Foster, 2007; Saraiva *et al.*, 2015).

O gato doméstico (*Felis catus*) pode ser utilizado como modelo de estudo para gatos selvagens bem como de toda a família *felidea*, sendo que o aumento de conhecimento acerca de doenças do trato reprodutivo, pode contribuir para a preservação destas espécies selvagens, algumas das quais em perigo de extinção. O conceito de conservação é importante uma vez que trinta e seis espécies felinas estão classificadas como vulneráveis, ameaçadas ou em perigo de extinção (Goodrowe *et al.*, 1991; Pope, 2000).

## 1.2 Fisiologia reprodutiva e ciclo éstrico da gata

### 1.2.1 Considerações gerais

Nenhum outro sistema ou conjunto de tecidos do organismo apresenta e sofre uma variedade tão grande de alterações fisiológicas, como o sistema reprodutor feminino. A sua complexidade fisiológica exige um vasto leque de conhecimentos, englobando várias áreas de conhecimento (embriologia, anatomia, endocrinologia, fisiologia, histologia). Neste sistema encontram-se muitas diferenças dependendo da espécie em estudo que poderão não ter ainda a total compreensão de todos os fenómenos e variações interespecíficas, mecanismos etiológicos e ações biopatológicas associadas, tornando esta área muito interessante, desafiante e atual (Schlafer & Foster, 2015).

As gatas necessitam de ter um peso mínimo de cerca de 2,3 a 2,5 kg para atingir a puberdade, que surge entre os 4 e 12 meses de idade, com média aos 9 meses, variando consoante o período do ano em que nascem, e podem ter uma longa vida reprodutiva, superior a 14 anos (Tsutsui *et al.*, 2004; Risso *et al.*, 2012).

A fisiologia reprodutiva da gata apresenta algumas particularidades, sendo um animal sazonal, poliétrico com ovulação induzida pelo coito ou por outros estímulos. A regulação do ciclo éstrico da gata está também associada a alterações do fotoperíodo sendo, assim como as ovelhas, éguas e cabras, sensível à sazonalidade (Hurni, 1981; Malpaux *et al.*, 1996; Nagy *et al.*, 2000; Johnston *et al.*, 2001; Fatet *et al.*, 2011). A ciclicidade cessa em dias decrescentes (nos meses de Outubro, Novembro) e inicia-se nos dias de horas de luz crescentes. Porém, em Portugal continental este efeito só pode ser observado na região centro-norte do país, dado que, nas restantes zonas as gatas apresentam-se constantemente em ciclo (Petersen, 2015; Saraiva, 2015).

A gata é considerada uma espécie poliétrica porque ocorrem ovulações sucessivas durante a mesma época reprodutiva. Os ciclos são contínuos quando não ocorre ovulação, apresentando assim ciclos anovulatórios, designando-se ciclos ovulatórios quando há ovulação (Petersen, 2015).

A ovulação surge quando existe ruptura do folículo maduro e libertação do ovócito, captado pela trompa uterina; este acontecimento é precedido por níveis séricos aumentados de LH (hormona luteinizante) (Wildt *et al.*, 1980). Para que a ovulação aconteça é necessário uma prévia estimulação mecânica a nível do cérvix da gata através de cópula (ou outro estímulo mecânico que o mimetize) (Robinson & Sawyer, 1987). No entanto também estão descritos fenómenos de ovulações espontâneas (Kutzler, 2007).

O tecido resultante do folículo maduro, situado no córtex superficial do ovário sofre alterações e passa a ser designado de corpo lúteo, é composto por células que se desenvolvem a partir das células da granulosa, responsáveis pela secreção de progesterona (Samuelson, 2007; Petersen, 2015).

O corpo lúteo surge passados dois dias após a ovulação, apresentando uma duração média de 40 dias em casos de pseudogestação, e com um período de cerca de 60 dias nos casos em que se desenvolve uma gestação (Paape *et al.*, 1975; Petersen, 2015).

Quando os níveis de progesterona voltam para valores basais, nos casos em que a gata não está gestante, surge novamente um novo ciclo (Petersen, 2015). A libertação de FSH (hormona estimulante dos folículos) permite o desenvolvimento e crescimento de vários folículos ováricos,

que segregam estrogénios até ao momento de ovulação (Feldman & Nelson, 2004; Malandain *et al.*, 2006).

Desta forma a regulação do ciclo éstrico é controlada tanto pelo sistema reprodutor como pelo sistema neuroendócrino do eixo hipotálamo-hipófise, através de níveis hormonais geradores de *feed back* negativos e positivos (Figura 1), (Samuelson, 2007).

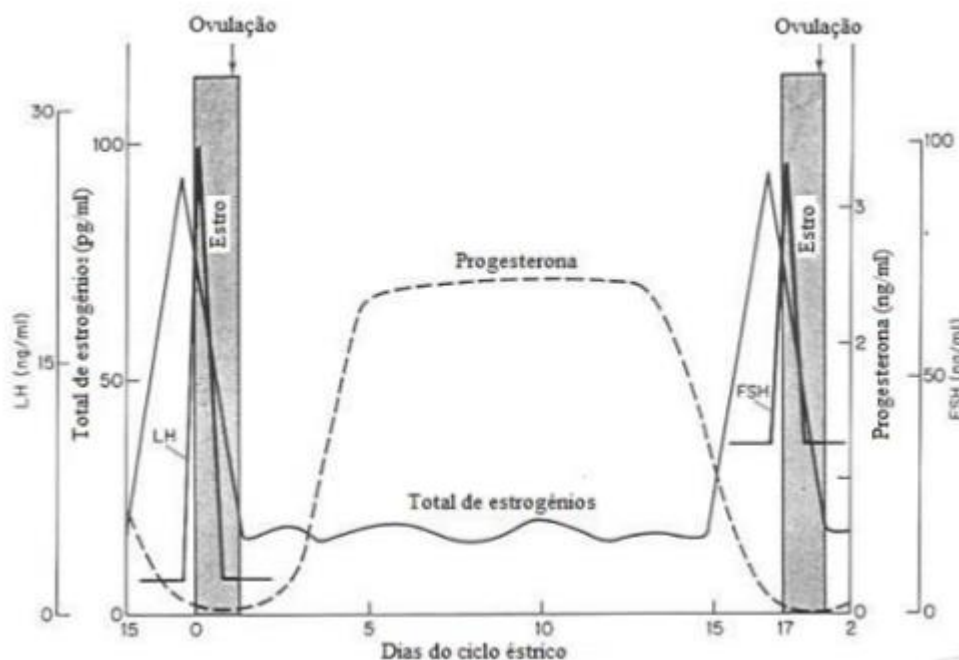


Figura 1: Variação de diferentes hormonas no sangue da gata ao longo do seu ciclo éstrico. Adaptado de <http://www.mcguido.com.br/cicloestral.htm>. Acedido em 10/07/2016.

### 1.2.2 Ciclo éstrico da gata

As fases do ciclo estrico das gatas são descritas de formas diferentes conforme os autores. Há autores que consideram a existência de cinco fases: proestro, estro, interestro, diestro e anestro (Peternsen, 2015). Outros consideram apenas quatro fases: proestro, estro, diestro e anestro. Neste caso o interestro e o anestro estão juntos na mesma fase em que se observam níveis basais de progesterona e estrogénio (Peternsen, 2015).

O anestro é caracterizado pelos valores basais da progesterona e estradiol. Nesta altura as gatas não expressam qualquer tipo de comportamento sexual (Brown, 2011; Petersen, 2015).

A fase de proestro tem a duração média de 1-2 dias, e antecede a fase de estro 24 a 48 horas (Fontbonne & Garnier, 1998). É a fase em que os folículos se desenvolvem, e os estrogénios são produzidos pelas células da granulosa. Esta fase é de difícil percepção sob o ponto de vista comportamental (Shille *et al.*, 1983).

A duração da fase de estro varia de 2 a 19 dias, com uma média de 7,2 dias (Shille *et al.*, 1979). Os níveis de estradiol sanguíneos continuam a aumentar até ao 3º ou 4º dias, e declinam rapidamente após o pico de LH; depois a progesterona passa a dominar (Banks & Stabenfeldt, 1982; Johnston *et al.*, 2001). Nesta altura são notadas alterações comportamentais características de receptividade ao macho. Se ocorrer ovulação a gata pode ficar gestante ou pseudogestante (Feldman & Nelson, 2004; Petersen, 2015; Johnston *et al.*, 2001).

Depois da fase de estro a gata passa à fase de interestro caso não tenha ocorrido ovulação (Johnston *et al.*, 2001; Feldman & Nelson, 2004; Petersen, 2015). O Interestro é uma fase característica da espécie felina (Feldman & Nelson, 2004), apresentando uma média de 9 dias, com os níveis de estrogénio e progesterona a apresentarem-se bastante baixos (Feldman & Nelson, 2004).

A fase de diestro é caracterizada pela predominância da progesterona, em gatas que ocorreu ovulação. Este período dura aproximadamente 60 dias na gata gestante e 40 dias em situações de pseudogestação. Esta fase termina com a luteólise (Johnston *et al.*, 2001; Petersen, 2015).

### 1.3 Anatomia e histologia do sistema reprodutor feminino da gata

O sistema reprodutor da gata é constituído por 2 ovários, 2 trompas uterinas ou de falópio, 2 cornos uterinos e 1 corpo uterino, vagina e vulva. O útero é subdividido em três estruturas comunicantes: dois cornos uterinos em Y que se unem no corpo uterino e pelo colo uterino também denominado por cérvix (Sisson, 1986; Foster, 2007; Samuelson, 2007).

Os dois ovários apresentam uma localização caudo-lateral relativamente à extremidade caudal dos rins. Estes órgãos têm função primária de oogénese (Samuelson, 2007; Saraiva, 2015). Caudalmente e contornando os ovários observam-se as trompas uterinas. É na trompa uterina que

ocorre a fecundação (Sisson, 1986; Samuelson, 2007). Os cornos uterinos apresentam uma localização abdominal dorso-caudal, situado no espaço reto-peritoneal, entre a pélvis e os rins. Ventralmente está em contacto com as vísceras abdominais e dorsalmente posicionam-se contra a musculatura sublombar (Sisson, 1986; Samuelson, 2007; Petersen, 2012). Os cornos uterinos comunicam cranialmente com a trompa uterina e caudalmente com o corpo uterino em continuidade com o cérvix.

Histologicamente a parede uterina é formada por três camadas, constituídas por ordem da camada mais interna para a mais externa: endométrio, miométrio e perimétrio/ serosa (Figura 2). O endométrio é a mucosa uterina, constituído por um epitélio de superfície mais pavimentoso, cúbico ou colunar, dependendo da fase do ciclo éstrico, que está diretamente em contato com o lume; pelas glândulas superficiais e pelas glândulas profundas cujos epitélios conforme a influência hormonal se encontram mais cúbicos ou colunares, com maior ou menor enrolamento e desenvolvimento. A submucosa ou lâmina própria do endométrio, também designado por estroma, assenta sob fibras reticulares e a nutrição é assegurada por artérias espirais (Samuelson, 2007). É no seio do estroma que se encontram as glândulas uterinas e é formado por tecido conjuntivo laxo muito rico em matriz extra-celular. É ainda composto por fibrocitos e miofibroblastos e também se encontram células inflamatórias variáveis conforme a fase do ciclo éstrico (Samuelson, 2007; Pereira, 2013; Pires & Payan-Carreira, 2015).

A matriz extra-celular (MEC) é formada por substância fundamental e por um conjunto de fibras; nela se encontram várias macromoléculas proteicas proporcionando apoio estrutural a células vizinhas e permite ainda comunicação e permutas de sinalização entre células estromais e glandulares do endométrio. A MEC intervém na proliferação celular, diferenciação e apoptose (Selam *et al.*, 2002). O colagénio tipo IV é um dos principais constituintes da MEC. Para a correta funcionalidade e equilíbrio celular estão também presentes outras moléculas sinalizadoras, como proteínas que incluem as lamininas, os proteoglicanos, as fibronectinas e as integrinas de entre outras (Frisch & Francis, 1994; Selam, 2002; Samuelson, 2007; Kim *et al.*, 2011). Existem no estroma do endométrio miofibroblastos, células semelhantes aos fibroblastos, que apresentam quantidades significativas de actina (Kishaba *et al.*, 2010), permitindo atividade contráctil desta estrutura.

O miométrio é a túnica muscular do útero, constituído por duas camadas de células musculares lisas, a interna circular e a externa longitudinal. Estas duas camadas, que apresentam uma orientação perpendicular entre si, são separadas por uma camada fina de tecido conjuntivo, denominado estrato vascular, onde se encontram nervos e vasos sanguíneos (Figura 2). Na camada circular, interna, o tecido muscular é mais denso relativamente à camada longitudinal, externa (Junqueira & Carneiro, 2004; Samuelson, 2007).

As células musculares lisas são dotadas de capacidade contráctil devido à presença de um sistema de filamentos intermédios, onde se destacam as proteínas vimenina e desmina. Esta capacidade contráctil é reforçada graças aos micro-filamentos de alfa-actina (Bond & Somlyo, 1982). As células musculares lisas do endométrio, à semelhança de todas as estruturas uterinas, estão dependentes de flutuações hormonais (Rehman, 2003). Estas células sofrem hiperplasia, quando os níveis séricos de estrogénios são elevados (Rehman *et al.*, 2003). Esta é uma resposta mediada pela presença de recetores de estrogénio nos miócitos (Rehman *et al.*, 2003).

A serosa ou perimétrio é a última camada do útero e é constituída por tecido conjuntivo, que envolve e reveste este órgão (Figura 2), delimitando-o assim das restantes vísceras abdominais (Samuelson, 2007).

A histologia e morfologia uterina e do ovário, sofrem alterações consoante a predominância de concentrações hormonais de estrogénio ou de progesterona (Junqueira & Carneiro, 2004; Liman *et al.*, 2013). Neste trabalho, para efeitos de simplificação e porque as variações hormonais e morfológicas são mais facilmente perceptíveis e agrupáveis desta forma, apenas consideramos nos animais controlo duas fases: a fase Estrogénica ou Proliferativa (inclui o proestro e o estro) e a fase Progestagénica, Secretora ou Lútea (Figura 2)

Na fase proliferativa e associada a níveis séricos aumentados de estrogénio, a atividade contráctil uterina aumenta, observando-se a presença de edema e uma maior vascularização. A espessura do endométrio é basal, e as glândulas endometriais aparentam um aspeto pouco desenvolvido e atrófico distribuindo-se paralelamente alinhadas e radialmente à superfície (Figura 2A). O epitélio de superfície e das glândulas é pavimentoso a cúbico. No ovário observam-se folículos em diferentes fases de desenvolvimento (Junqueira & Carneiro, 2004; Liman *et al.*, 2013).

Na fase secretora, associada ao predomínio de progesterona, a atividade mio-elétrica do útero e a sua capacidade de contração diminuem. No endométrio o edema também diminui, e observa-se um aumento do enovelamento/enrolamento das glândulas do endométrio associado ao aumento progressivo das células do epitélio de superfície e das glândulas, que se tornam colunares (Figura 2B). Nesta fase, as glândulas atingem a sua máxima expressão. Estas modificações são também acompanhadas por uma maior quantidade de secreção glandular. No ovário regista-se a presença de corpos lúteos ativos (Junqueira & Carneiro, 2004; Liman *et al.*, 2013).

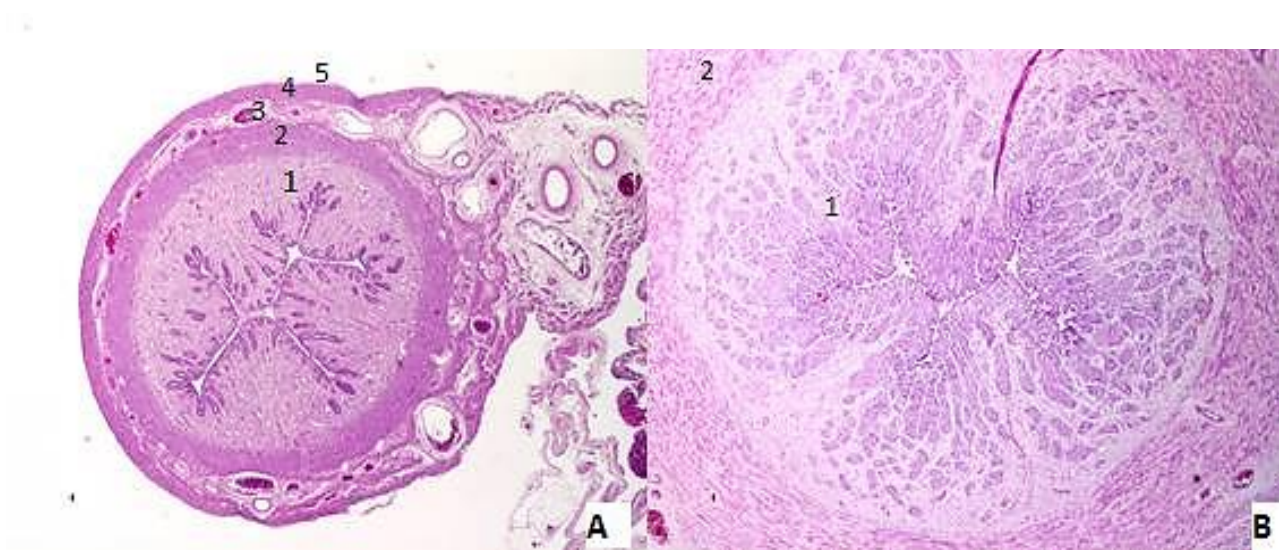


Figura 2: Aspeto histológico de um útero de gata; A) na fase estrogénica, com as diferentes camadas. B) na fase progestagénica. Note-se a diferença da morfologia das glândulas do endométrio entre a figura A e B. 1 – endométrio, 2 - miométrio camada interna circular, 3 - estrato vascular do miométrio, 4 - miométrio camada exterior longitudinal, 5 serosa ou perimétrio; H-E, obj. 4x.

#### 1.4 Citoesqueleto, filamentos intermédios e desmina

O citoesqueleto é um componente vital das células eucarióticas; é formado por uma vasta teia de filamentos proteicos interligados de três tipos diferentes: microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermédios (Houseweart & Cleveland, 1998; Kim & Coulombe, 2007; Geisler & Leube, 2016).

A família dos filamentos intermédios (FI) é um dos principais componentes e constituintes do citoesqueleto (Cooper, 2000). Esta vasta família engloba diferentes proteínas.

Existem cinco classes distintas de microfilamentos (Lazarides, 1980; Moll *et al.*, 1982), que partilham uma estrutura: um dímero composto por duas cadeias em alfa-hélice, orientadas paralelamente entre si, e entrelaçadas numa haste em espiral. Diferentes tecidos contêm diferentes tipos de filamentos intermédios, como por exemplo as citoqueratinas que existem nas células epiteliais, e os filamentos de desmina específicos de células musculares (Moll *et al.*, 1982; Debus *et al.*, 1983). A diferença entre microfilamentos, filamentos grossos e filamentos intermédios reside na distribuição citoplasmática, dimensão e também no seu peso molecular (Parry & Steinert, 1999; Margiotta & Bucci, 2016).

Os microfilamentos medem cerca de 5 nm de diâmetro, já os filamentos grossos medem mais de 16nm; a desmina situa-se entre estas duas classes de filamentos, possuindo cerca de 8 a 10 nm de diâmetro e pertence à família dos FI (Geisler & Weber 1981; Fuchs & Weber, 1994; Costa *et al.*, 2004; Kiss *et al.*, 2011; Margiotta & Bucci, 2016).

Graças a estudos realizados nas últimas décadas, hoje sabe-se que os FI não são estruturas que servem apenas de suporte para manter a integridade celular, como se julgou ao longo de vários anos mas, para além destas funções mecânicas que mantêm uma organizada estrutura física também desempenham um papel importante na dinâmica celular, nomeadamente em fenómenos de contração de células musculares lisas (Costa *et al.*, 2004; Helfand *et al.*, 2004; Tang, 2008).

A desmina é uma proteína que pertence à família dos filamentos intermédios, assim como a vimentina, a nestina e as citoqueratinas (Paulin & Li, 2004). A desmina tem cerca de 10 nm de diâmetro (Ishikawa *et al.*, 1968; Geisler, 1982). Esta proteína foi purificada pela primeira vez em 1977 e caracterizada bioquimicamente em 1989 (O'Shea *et al.*, 1981; Li, 1989) (Figura 3). A desmina é considerada a principal proteína de tipo III dos filamentos intermédios. É específica do tecido muscular estriado e liso (Lyall & Bulmer, 2013; Diokmetzidou *et al.*, 2016) Em células musculares lisas a desmina apresenta uma localização citoplasmática concentrada nos corpos densos (Figura 3) (Paulin & Li, 2004; Tang, 2008; Li *et al.*, 2015, Heckmann *et al.*, 2016).

Pensa-se que as funções primárias da desmina sejam estruturais e mecânicas, oferecendo elasticidade e ao mesmo tempo rigidez às células, tal como uma teia tridimensional com vários organitos e estruturas celulares interligadas (citoesqueleto, núcleo, etc.) que mantêm organizada toda a arquitetura e o suporte mecânico da célula (Paulin & Li, 2004), sendo responsável pela

regulação de motilidade e contractilidade celular (Helfand *et al.*, 2004). Na literatura encontram-se associações entre a desmina e outras proteínas de FI como por exemplo a nebulina e a tubulina. A desmina também está envolvida no processo de apoptose, interagindo com proteases como a caspase. Esta proteína tem ainda a particularidade de ser resistente e estável a processos químicos de desnaturação (Costa *et al.*, 2004).

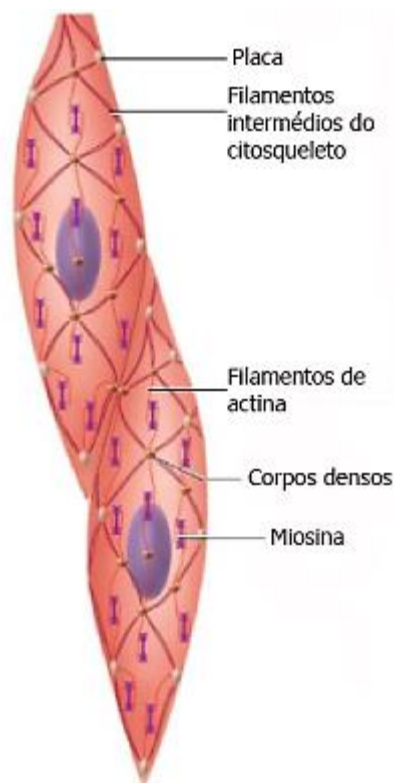


Figura 3 : Representação esquemática da desmina (FI) e alfa-actina do músculo liso. Adaptado de <http://slideplayer.com/slide/4594250/>. Acedido em 28/06/2016.

#### 1.4.1 Actina e alfa-actina do músculo liso

A actina é uma proteína do citoesqueleto (Vandekerckhove & Weber, 1979) conservada entre espécies, e expressa em quantidades diferentes por diversas células eucarióticas (Kim, 2008). Estão descritos seis tipos de isoformas de actina em mamíferos e aves. Estas isoformas são classificadas em três subgrupos: 1- actina sarcomérica, actina esquelética  $\alpha$  ( $\alpha$ -SKA), a actina cardíaca- $\alpha$  ( $\alpha$ -CAA); 2- alfa-actinas do músculo liso (s-ML:  $\alpha$ -ML e  $\gamma$ -ML); 3- as actinas

citoplasmáticas (CYAs,  $\beta$ -CYA e  $\gamma$ -CYA) (Chaponnier *et al.*, 2016). A diferença entre as várias isoformas de actina reside em variações entre cerca de 3 a 4 aminoácidos localizados na sequência N-acetilada dos decapeptídeos (Kim, 2008; Ruan & Lai, 2007).

A alfa-actina do músculo liso ( $\alpha$ -ML) é uma proteína estável e é considerada como marcador específico deste tipo de tecido (Figura 3) (Ruan & Lai, 2003). Pode também ser encontrada em quantidades importantes em miofibroblastos. Esta proteína apresenta uma localização citoplasmática com disposição em forma de rede, com pontos de ligação entre outros filamentos de actina e também com filamentos de miosina. Os seus pontos de união e ancoragem situam-se nos corpos densos de células musculares lisas (Bond & Somlyo, 1982).

A  $\alpha$ -ML é composta por dois finos proto-filamentos enrolados entre si presentes no citoplasma (Vandekerckhove & Weber, 1979; Moll *et al.*, 1982; Sanders *et al.*, 2014). A  $\alpha$ -ML intervêm principalmente na manutenção do citoesqueleto e na motilidade celular nomeadamente na contração celular (Ruan & Lai, 2007; Gunst & Zhang, 2008; Kim, 2008; Petersen, 2015).

Estudos sugerem que a alfa-actina esteja envolvida em neoplasias malignas, estando a alteração de expressão e remodelação desta proteína relacionada com a maior agressividade de determinadas neoplasias, associada à presença de miofibroblastos (Goicoechea *et al.*, 2014; Sinn *et al.*, 2014).

## 1.5 Adenocarcinomas do endométrio

Os adenocarcinomas do endométrio são tumores malignos de origem epitelial. Uma neoplasia maligna surge pelo crescimento anormal de grupos celulares com ritmo de crescimento descontrolado e, mesmo após a cessação dos eventuais estímulos iniciais envolvidos na iniciação da neoplasia, esta persiste ao longo do tempo. A neoplasia maligna é um processo com várias etapas, promovido por fatores mutagénicos e oncogénicos; onde o equilíbrio homeostático é totalmente perdido (Bertolaso, 2009; Hanahan & Weinberg, 2011).

Estudos baseados em oncologia comparativa permitem a contribuição para o avanço do saber, relacionando a medicina veterinária com a medicina humana, com a evidência de uma só saúde. Estudos em gatos têm contribuído para a compreensão do estudo das doenças dos humanos, nomeadamente em áreas da virologia, genética, oftalmologia e oncologia (Vail & Macewen, 2000; Porrello *et al.*, 2006; Vico & Maiolino, 2008; Cekanova & Rathore, 2014). Os

animais de companhia podem também ser modelos biológicos na área da oncologia, por terem uma longevidade inferior à dos humanos e viverem no mesmo ambiente, ficando sujeitos aos mesmos agentes potencialmente carcinogénicos. Ao desenvolverem determinados tumores de forma mais rápida poderão assim ser considerados animais sentinela para o homem de algumas lesões neoplásicas (LeRoy & Northrup, 2009; Pinho *et al.*, 2012).

### 1.5.1 Epidemiologia

Nas mulheres, neoplasias do endométrio são a doença maligna mais comum do útero (Boronow, 1984; Slomovitz *et al.*, 2003).

Os adenocarcinomas do endométrio nos animais apresentam diferentes incidências conforme as espécies animais em estudo, são lesões raras na maior parte das espécies, exceto nos bovinos e leporídeos (Kennedy *et al.*, 1988), e são mais comuns em gatos do que em cães (Morris & Dobson, 2001; Klein, 2007; Saraiva, 2015).

Segundo a literatura consultada, as neoplasias uterinas em gatas variam entre 0,2 a 1,5% do total de neoplasias felinas (Miller *et al.*, 2003; Taylor, 2010), mas descrições recentes referem que poderão estar subdiagnosticadas, sendo mais frequentes que o considerado até então (Saraiva, 2015). As razões expostas para esta baixa ocorrência seriam a prática de ovariectomia (OVH) em gatas bastante jovens, a presença de alterações uterinas macroscópicas inespecíficas com falta de sinais clínicos, associados à falta de hábito do exame minucioso do trato genitourinário desta espécie que deveria ser realizado por rotina quer após exérese quer após realização de necropsias (Taylor, 2010; Saraiva *et al.*, 2012).

Não existem descrições de raças de gatas predispostas aos AEG's (Klein, 2007). Um estudo nestes tumores refere que o aparecimento desta doença surge, em média aos 7 anos de vida (Saraiva *et al.*, 2012), mas em geral os AEG's surgem em gatas com mais de 9 anos de idade (McEntee, 1990; Klein, 2007; Morris & Dobson, 2008). No entanto existem casos esporádicos de AEG's em animais muito jovens, com idade inferior a dois anos de idade (Cho *et al.*, 2011; Payan-Carreira *et al.*, 2013).

### 1.5.2 Aspecto morfológico dos AEG's

O adenocarcinoma do endométrio, como o nome indica, é uma neoplasia epitelial glandular maligna. Inicia-se a partir do epitélio onde sofre alterações e atipias celulares (Miller *et al.*, 2003; Saraiva, 2015). O tamanho das lesões é variável, podendo ser inferiores a 1 cm ou atingir mais de 10 cm de comprimento, afetando apenas um dos cornos uterinos, ser uma lesão nodular ou polipóide única ou uma lesão difusa atingindo os dois cornos ou mesmo o corpo uterino (Figura 4) (Morris & Dobson, 2008; Saraiva *et al.*, 2012). Com frequência está associado a casos de piómetra, sendo muitas vezes subdiagnosticado nestes casos (Pires *et al.*, 2016).

Existem três tipos de AEG's, baseado na disposição das células neoplásicas no endométrio, e o seu aspeto morfológico dominante, com sobreposição de alguns adenocarcinomas da mulher (Horn *et al.*, 2007; Saraiva, *et al.*, 2012). O aspeto morfológico mais frequente é o papilar seroso, sendo um tipo de neoplasia que apresenta proliferação de papilas de células neoplásicas colunares a pseudoestratificadas que podem apresentar várias camadas, com perda da polaridade e por vezes multinucleadas, suportadas por um fino feixe de estroma fibrovascular (Figura 4). As células neoplásicas apresentam citoplasma mais ou menos abundante, com aspeto pleomórfico, eosinofílico ligeiramente granular. Os núcleos apresentam pleomorfismo, e variam de ovais a redondos, densos ou vesiculados, aumentados de volume com nucléolo evidente. Apresentam-se muitas vezes células multinucleadas com núcleos muito densos. Evidenciam-se zonas com aumento de figuras mitóticas (Saraiva *et al.*, 2012). Podem ainda ser observados fenómenos de apoptose em grande quantidade e infiltrado inflamatório associado (Pereira, 2013; Pires *et al.*, 2015). Áreas de necrose e hemorragia também podem estar presentes (Saraiva, *et al.*, 2012).

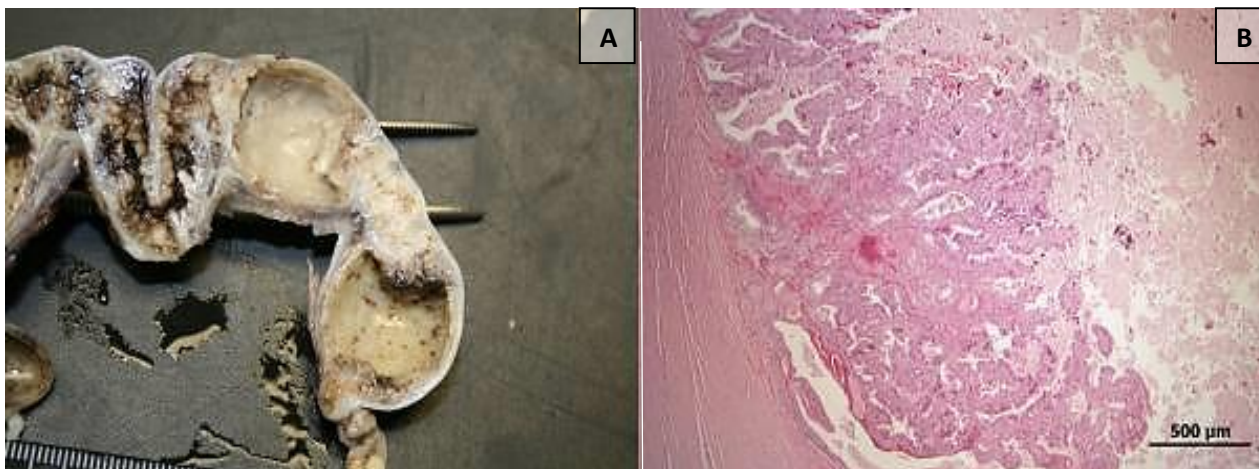


Figura 4 : A) Aspeto macroscópico de AEG com proliferações multifocais do endom conteúdo purulento. B) Aspeto microscópico de um AEG papilar seroso. De notar a estrutura papilar formada por células epiteliais neoplásicas com estreito feixe fibrovascular, que se projeta para o interior do lume, com conteúdo mucoso. HE.

Por vezes encontram-se AEG's com predominância em mais de 50% de células de citoplasma clarificado, de cor ténue e pálida com núcleo denso mais ou menos uniforme, que formam ninhos de células epiteliais poligonais e raramente apresentam células multinucleadas; também são acompanhados por estroma fibrovascular escasso. Este tipo morfológico corresponde aos AEG's de células claras, o mais raro dos tipos histológicos na gata (Saraiva *et al.*, 2012).

Em algumas situações, a proliferação neoplásica é limitada, com disposição papilar, mas sem invadir as camadas mais profundas do endométrio. É o denominado AEG papilar *in situ* (Saraiva *et al.*, 2012).

Os AEG's papilare serosos têm capacidade de invasão local, invadindo as diferentes camadas do miométrio, e em casos mais severos, a serosa (Saraiva *et al.*, 2012). A metastização à distância está raramente descrita e a sintomatologia depende dos órgãos afetados (Saraiva, 2015). Existem casos descritos de metastização por sementeira abdominal em situação de rotura da serosa (Pires *et al*, 2013).

### 1.5.3 Sinais clínicos dos AEG's

O adenocarcinoma do endométrio (AEG) da gata é geralmente considerado uma doença com evolução silenciosa, indetetável até à manifestação clinica de doença (Klein, 2007; Saraiva, 2015).

Os sinais clínicos são inespecíficos, variam conforme a idade, dependem da dimensão da lesão e da evolução clínica (Morris & Dobson, 2008; Saraiva *et al.*, 2012) e são comuns a outras doenças uterinas. Em tumores de grandes dimensões, podem ser observados fenômenos de disúria e constipação por ação mecânica de compressão visceral adjacente (Klein, 2007; Saraiva 2015). Podem ser observados sinais sistêmicos como apetite irregular, vômito, polúria/polidipsia. Devido à neoplasia e inflamação, pode observar-se corrimento seropurulento, ou com maior frequência, hemorrágico (McEntee, 1990; Taylor, 2010).

No exame físico, à palpação, pode ser detetada uma massa ou dilatação uterina, acompanhada ou não por distensão e/ ou desconforto abdominal (Klein, 2007).

Como já foi referido anteriormente os AEG's têm a capacidade de metastizar à distância (McEntee, 1990; Klein, 2007; Taylor, 2010; Saraiva, 2015). Dependendo da localização metastásica podem surgir novos sintomas secundários, como dificuldades respiratórias e tosse se o sistema respiratório estiver comprometido; casos de cegueira e descoordenação motora se afetar o sistema nervoso central; ascite se a localização for abdominal. Sintomas como anorexia, perda de peso, anemia, febre e caquexia que podem também estar associados a fenômenos de metastização (Johnston *et al.*, 2001). Os AEG's podem ser confundidos macroscopicamente com lesões do complexo hiperplasia quísticas/ piómetra e com situações de pós-parto recente (Saraiva, 2015).

#### 1.5.4 Diagnóstico e exames complementares

A suspeita de AEG é baseado na história pregressa e no exame físico, sendo o corrimento vaginal sanguinopurulento o indicador mais potente, mas nestes casos os diagnósticos diferenciais deverão incluir o complexo de hiperplasia quística/piómetra. Pode ainda não ter qualquer tipo de corrimento, ou sintoma associado ao sistema genitourinário, e ser uma lesão encontrada apenas pelo exame histopatológico (Payan-carreira *et al.*, 2013). O hemograma pode indicar uma anemia regenerativa e/ou neutrófila, estando este parâmetro geralmente associado a casos de piómetra (Morris & Dobson, 2001; Klein 2007).

Os exames complementares mais usuais são a ecografia e o raio-x (Rx). Na ecografia encontra-se líquido no útero, e/ou espessamento da parede uterina, sobreponível a

hiperplasia quística, ou uma massa hipoeoica (Klein, 2007; Saraiva, 2015). Deverá ser realizado Rx torácico e abdominal; no RX abdominal esperam-se encontrar massas com densidade correspondente a tecidos moles (Saraiva, 2015).

O diagnóstico definitivo é sempre histopatológico, realizado após a cirurgia de OVH ou recolha da peça por necropsia, mesmo que os animais tenham outro tipo de suspeita clínica como hiperplasia quística ou piómetra ou a OVH tenha sido eletiva (Klein, 2007).

### 1.5.5 Tratamento dos AEG's

O tratamento de eleição para AEG é a OVH completa, incluindo o corpo uterino. A peça excisada deverá ser sempre enviada para avaliação histopatológica. O cirurgião deverá verificar se não existem lesões ou massas suspeitas na cavidade abdominal. Se a piómetra existir concomitantemente com AEG, a administração de antibióterapia será necessária (Saraiva *et al.*, 2012).

#### 1.6.1 Microambiente, invasão e metastização

Geralmente em oncologia humana o prognóstico dos pacientes é avaliado segundo vários parâmetros previamente estabelecidos em estudos de estadiamento clínico (*follow-up*), avaliação de parâmetros histológicos, imuno-histoquímicos, bioquímicos e genéticos. Nos adenocarcinomas uterinos da mulher muitos são os parâmetros para o prognóstico e um dos principais e sempre referido é a presença de invasão e metastização do miométrio (Boronow *et al.*, 1984; Sefre *et al.*, 2004; Geels *et al.*, 2013), que estão descritos no sistema de classificação realizados pela FIGO (*Federation International Gynecologique Obstetrique*). O estadiamento tumoral (tumor, metástase, nódulo - TMN) e o prognóstico baseia-se no grau de invasão do miométrio. A profundidade de invasão é um dos critérios para definir o estadiamento neoplásico (Frei, 2000; Geels *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2013; Raj & Chitrathara, 2015). O processo de invasão do miométrio dos AEG's pode ser superficial ou profundo, pode mesmo passar o miométrio e alcançar a camada serosa (Pires *et al.*, 2013). Um dos fatores utilizado em medicina humana indicadores de prognostico é o 50 MI, que significa "Invasão do miométrio em mais de 50% da

extensão da neoplasia e no total da camada do miométrio” o que está associada a um pior prognóstico (Geels *et al.*, 2013).

Estudos sobre a invasão do miométrio pelo tumor podem permitir avanços sobre a compreensão da biopatologia tumoral e avaliação do prognóstico, bem como servir de base para estudos limitantes e da propagação do tumor, sendo relacionados com a agressividade neoplásica. O processo de invasão tumoral local surge quando células neoplásicas adquirem a habilidade de migrar do tumor primário para o tecido adjacente (que no caso dos AEG's é o miométrio) (Larson, 1996; Martin *et al.*, 2000; Geels *et al.*, 2013).

A avaliação da interface entre endométrio-miométrio e a visualização de células tumorais isoladas no miométrio nestes adenocarcinomas podem suscitar dúvidas quando se recorre apenas à coloração de rotina de hematoxilina-eosina (HE), pois a tênue camada de tecido conjuntivo pode ser de difícil observação. O miométrio apresenta habitualmente interdigitações que podem induzir em erro quanto à invasão desta camada. Casos de metaplasia do tecido muscular liso em neoplasias endometriais na mulher geram dúvidas na avaliação da invasão do miométrio (Ali *et al.*, 2007).

O processo de invasão neoplásica é complexo; para além das características invasivas das células neoplásicas, este processo é também desencadeado por uma cascata de eventos despoletados por vias de sinalização molecular e bioquímica (Anexo I) (Monaghan *et al.*, 2007; Stivarou & Patsavoudi, 2015). Para manter a homeostasia, é necessário um grande controlo de todas as vias de sinalização e bioquímicas, passando pela manutenção do correto funcionamento da matriz extracelular (Kessenbrock *et al.*, 2010; Satta *et al.*, 2011).

Vários fatores proteicos e mediadores bioquímicos solúveis circulam livremente através da matriz extra celular afetando também as células vizinhas (Giancotti & Ruoslahti, 1999). Se as propriedades da matriz extracelular forem alteradas poderão surgir problemas com consequências funcionais na sinalização, incluindo uma desorganização estrutural dos tecidos (Frisch & Francis, 1994). O microambiente extracelular tumoral contribui grandemente para a invasão tumoral pela alteração da regulação de recetores e proteínas que são libertadas para a matriz extracelular, através de fatores de crescimento e seus recetores, e ainda pela produção de fatores pró-angiogénicos (Stivarou & Patsavoudi, 2015).

A invasão promovida pelas células neoplásicas é efetivada através da degradação da MEC pela estabilização e ativação de proteínas oncogénicas, pela estimulação de neovascularização e pela alteração das comunicações célula-célula e célula-matriz (Stevenson *et al.*, 1993).

Resumidamente, as células neoplásicas progridem pelos tecidos adjacentes mediante a sinalização captada a partir da matriz extracelular, esta sinalização é também gerada pelo estroma circundante. A invasão, para além de estar dependente das condições do próprio tumor e estroma adjacente também está associada às células do sistema imunitário (Figura 5) (Lu *et al.*, 2012; Mirantes *et al.*, 2012; Pereira, 2013.)

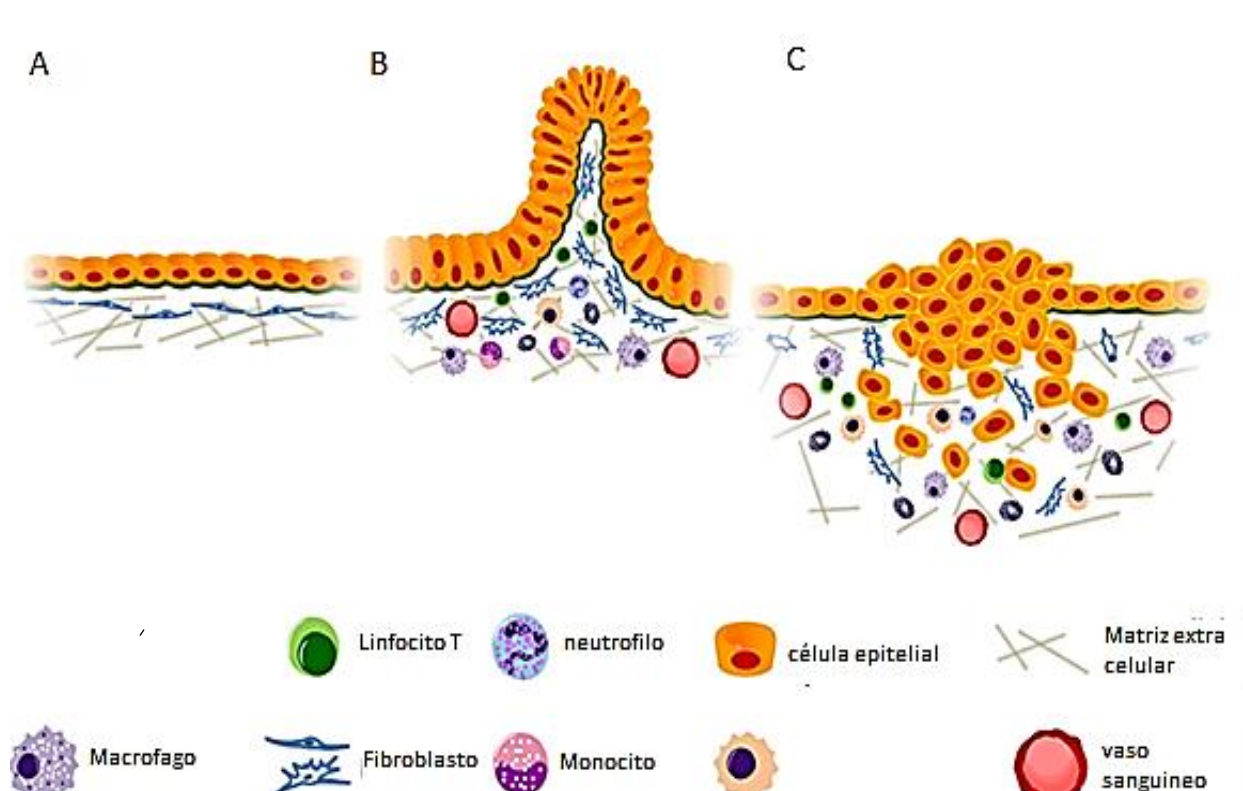


Figura 5 : Fases de formação de um adenocarcinoma. A - Epitélio normal; B - Proliferação celular apresentando atipias e presença de células inflamatórias e chamada de miofibroblastos no estroma associado à neoplasia; C – Progressão e invasão. Nesta fase existem também macrófagos associados ao tumor e as células neoplásicas sofrem migração e invadem o estroma adjacente, que se pode apresentar desmoplásico. Adaptado de <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2012.00270/full>. Acedido em 12/2/2016.

Relativamente aos processos de metastização surgiram novas teorias nas últimas décadas, sugerindo que este processo pode surgir mesmo em neoplasias de dimensões reduzidas, promovendo a libertação de micrometástases. Estudos apontam que estas micrometástases possam ser a causa de tumores secundários (Naumov *et al.*, 2002; Niikura *et al.*, 2007). As

células tumorais podem permanecer inalteradas por um longo período, num estado de dormência do seu ciclo celular, na matriz extracelular dos tecidos em causa. Pensa-se que a persistência dessas células tumorais contribuam para a perpetuidade do tumor bem como para a ineficiência dos tratamentos efetuados (Barkan, *et al.*, 2010).

### 1.6.2 Transição epitelial-mesênquima (TEM)

Existem três tipos de TEM descritos na literatura. O “tipo 1” está associado ao processo de implementação da gastrulação embrionária. O “tipo 2” de TEM envolve os processos de inflamação e fibrose, e pode comprometer a integridade dos tecidos e culminar com a destruição do órgão afetado se o processo inflamatório concomitante com o processo de TEM for expresso de forma contínua ao longo do tempo. Por fim, o “tipo 3” de TEM, está relacionado com células totipotentes e com células neoplásicas malignas de origem epitelial, que intervêm e promovem fenómenos de invasão e metastização (Figura 6) (Kalluri & Weinberg, 2009).

A integridade entre as células é assegurada através de junções intercelulares designadas de *tight junctions*, *adherens junctions*, *gap junctions* e de desmossomas. A quebra deste tipo de organização e a justaposição celular epitelial é a primeira etapa da transição epitélio-mesênquima (Thiery & Sleeman, 2006; Yilmaz & Christofori, 2009; Lamouille *et al.*, 2014).

### Transição Epitelial-Mesenquima

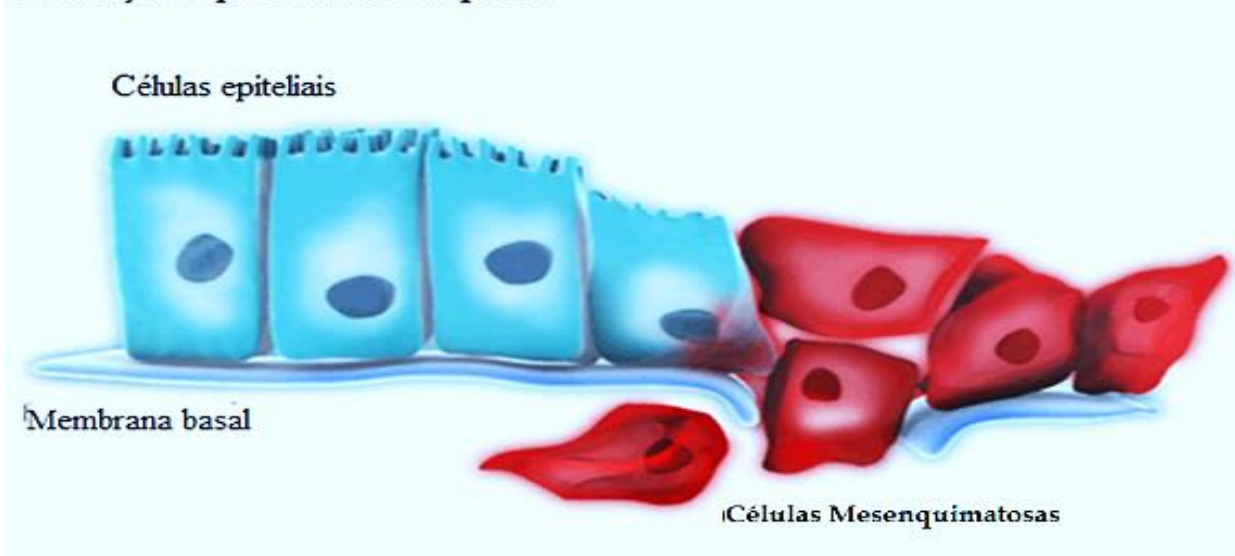


Figura 6: Representação esquemática da transição epitélio-mesênquima. As células de cor azul matêm as características de células epiteliais normais; as células de cor vermelha representam as células epiteliais que sofreram alterações e expressam proteínas com características de células mesenquimatosas, dotadas de capacidade de contração e migração pela matriz extra-celular. Observa-se também a perda de justaposição característica de células epiteliais. Adaptado de <http://www.sabiosciences.com/pathwaymagazine/minireview/fib.php>. Acedido em 9/5/2016.

Células epiteliais que anteriormente mantinham a polaridade fisiológica são sujeitas a perturbações provocado desregulação e quebra da polaridade celular, alteração específica que consiste na segunda etapa de TEM (Thiery & Sleeman, 2006; Bueno, *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2012). Na terceira etapa há alteração de expressão génica característica das células epiteliais, ao mesmo tempo que a expressão génica característica de células mesenquimatosas é massivamente ativada (Thiery & Sleeman, 2006; Peinado *et al.*, 2007; Craene *et al.*, 2013). A célula sofre assim fenómenos que interferem na sua funcionalidade e também na sua estrutura e conformação, perdem as características e arquitetura de células epiteliais assemelhando-se mais a células mesenquimatosas (Figura 7). As células adotam uma capacidade invasiva móvel através da aquisição de lamelipodia, filopodia e invadopodia; concomitantemente surge a expressão de metaloproteinases (MMPs), enzimas que possuem a capacidade de degradar as proteínas da MEC (Thiery & Sleeman, 2006; Lamouille *et al.*, 2014).

Estudos realizados em TEM que envolvem a invasão neoplásica e formação de metástases distantes relativamente ao local de origem, indicam que pode haver reversão deste tipo de processo, originando um outro processo denominado de transição mesênquima-epitelial,

clarificando a forma como as células neoplásicas que sofreram alterações mesenquimatosas, que sofreram migração alojando-se em órgãos secundários e tornam novamente a exibir particularidades morfológicas e funcionais de células epiteliais, formando deste modo tumores secundários morfológicamente similares às neoplasias maligna de origem (Thompson & Williams, 2008; Rhim *et al.*, 2012).

## 1.7 Imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica surgiu em 1941, descrita por Coons. Esta técnica engloba três grandes disciplinas: a histologia, imunologia e a química. A imunohistoquímica permite localizar antígenos específicos presentes no tecido, através da utilização de anticorpos comerciais com uma leitura fácil ao microscópio ótico e com uma sensibilidade elevada (Lourenço, 2008; Pires *et al.*, 2010).

A imunohistoquímica é uma técnica que pode ser realizada por diferentes métodos sendo os indiretos enzimáticos os mais utilizados atualmente (Figura 7). Os métodos diretos só usam um anticorpo ligado à enzima, dando muitos resultados falsos positivos (Pires *et al.*, 2010).

A recuperação antigénica pelo calor, método introduzido por Shi e colaboradores (1991), permitiu a utilização de tecidos parafinados e os estudos retrospectivos. A variação do tempo e tampão utilizado neste passo crítico da imunohistoquímica permite também que possam ser usados em tecidos animais anticorpos produzidos para antígenos humanos. Este fenómeno designa-se por reatividade cruzada (Pires *et al.*, 2010).

Os anticorpos podem ser monoclonais e policlonais. Os anticorpos monoclonais são produzidos *in-vitro*, desenhados para produzir anticorpos específicos contra o epítipo do antígeno pretendido e os anticorpos policlonais são produzidos *in vivo*, em geral em coelhos ou cabras. Os anticorpos monoclonais são mais específicos que os policlonais (Pires *et al.*, 2010).

A imunohistoquímica é amplamente utilizada em laboratórios de anatomia patológica para fins de investigação científica e como complemento de diagnóstico clínico de múltiplas doenças, agentes infecciosos, sendo mais utilizada no diagnóstico de neoplasias, caracterização morfológica, estudo de factores de prognóstico e como auxiliar terapêutico (Taylor, 2014).

No entanto esta técnica apresenta algumas desvantagens, e alguns dos pontos críticos não são facilmente controláveis, como é o caso da fixação. Também, pelo facto dos clones dos anticorpos não serem totalmente específicos para os animais de companhia, poderá ser observada alguma marcação inespecífica, havendo por isso necessidade da adaptação dos protocolos e optimização das técnicas para cada tecido animal afim de evitar falhas de interpretação dos resultados. A qualidade, tempo de fixação de tecidos, pH dos tampões e oscilações da temperatura ambiente, são fatores críticos que podem influenciar o sucesso desta técnica (Pires *et al.*, 2010).

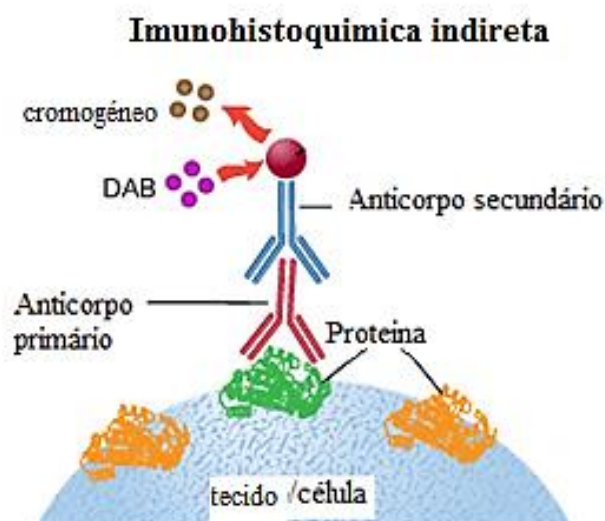


Figura 7: Representação do método indireto de imunohistoquímica - avidina-biotina. O anticorpo primário liga-se através das suas cadeias leves ao antígeno presente no tecido. O anticorpo secundário liga-se ao anticorpo primário. Esta ligação efetua-se entre a cadeia pesada do anticorpo primário e a cadeia leve do anticorpo secundário. A glicoproteína avidina, composta por quatro subunidades, tem uma elevada afinidade para a vitamina biotina. Por cada glicoproteína de avidina podem ser ligadas quatro biotinas. Este complexo enzimático é revelado pelo cromógeno 3-3'- diaminabenzidina (DAB) conferindo a cor castanha aos tecidos positivos. Adaptado de <http://www.leinco.com/immunohistochemistry>. Acedido em 18/7/2016.

## 1.8 Objetivos

Foram objetivos gerais deste trabalho contribuir a caraterização do estroma do útero normal de gata nas duas fases do ciclo éstrico e o estudo do estroma neoplásico e o seu papel no microambiente tumoral nos AEG's.

Otimização da técnica de imunohistoquímica para anticorpos anti-alfa-actina e anti-desmina em tecidos de gato.

Avaliação da imunoexpressão de alfa-actina do músculo liso e desmina nas diferentes estruturas do útero normal: no epitélio superficial e glandular, no estroma do endométrio; no miométrio; nos vasos do estroma e nos vasos do estrato vascular do miométrio, quer nas fases normais (fase folicular e fase lútea) quer em casos de AEG.

Comparar estatisticamente os biomarcadores, tanto de desmina como de alfa-actina do músculo-liso em situações de AEG's relativamente a situações normais (fase folicular e fase lútea) em todas as estruturas avaliadas. Comparar estatisticamente os dois biomarcadores ( $\alpha$ -ML e DES) em situações normais (fase folicular e fase lútea), em todas as estruturas avaliadas. Comparação estatística entre os dois biomarcadores ( $\alpha$ -ML e DES) em situações de AEG's em todas as estruturas avaliadas.

Identificar estruturas/ células presentes especificamente em casos de AEG com resultados significativos relativamente às fases normais.

Avaliar a invasão tumoral no miométrio recorrendo à alfa-actina do músculo liso e/ ou à desmina, com identificação do melhor biomarcador.

## 2. Materiais e Métodos

O material utilizado provinha do acervo do arquivo do laboratório de Histologia e Anatomia Patológica (LHAP), da Universidade de Trás os Montes e Alto Douro (UTAD), assim como material proveniente de cirurgias electivas no âmbito do controlo de colónias de gatas na ilha de Faro, este projeto contou também com a colaboração da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Após a exérese dos órgãos genitais femininos recorrendo à técnica cirúrgica de ovariectomia as amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% enviadas para o LHAP onde foram processadas por rotina para parafina (no processador Shadon Hypercenter XP e inclusão no equipamento Shadon Histocenter 2). Os cortes de 3 micra (efetuados no micrótomo Leica RM 2255) foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) e avaliada a sua morfologia com estadiamento do ciclo éstrico ou diagnóstico da patologia presente. Cortes seriados, com a mesma espessura, foram efetuados para lâminas adesivadas com Silane® para posteriormente se efetuar a técnica de imunohistoquímica. A confidencialidade da origem das amostras provenientes dos hospitais e clínicas veterinárias foi respeitada, e este projeto foi autorizado pela comissão de ética da UTAD.

Para cada caso foi incluído metade de cada ovário, seccionado segundo o seu eixo longitudinal, após avaliadas as suas dimensões. Cada um dos cornos uterinos foi medido a partir da bifurcação do corpo uterino até à parte mais anterior do mesmo e seccionados nos casos normais transversalmente a cerca de 1 cm da trompa uterina e junto ao corpo uterino, e nos restantes casos e sempre que a espessura o permitiu, foi efetuado um corte longitudinal incluindo assim a maior parte do segmento e corpo quando presente. A trompa foi sempre incluída em cortes transversais. Em caso de lesão foi efetuado preferencialmente uma secção longitudinal de cada corno e corpo uterinos.

O diagnóstico da fase do ciclo éstrico, bem como a avaliação das lesões presentes foram realizadas através da observação direta ao microscópio ótico, com coloração de hematoxilina e eosina (H.E) por, pelo menos um patologista do LHAP.

Depois desta avaliação foram selecionados 13 úteros em fase estrogénica ou folicular e 11 em fase progestagénica, lútea ou secretora. Foram também escolhidos com base na sua morfologia predominante, 34 casos de adenocarcinomas do endométrio do tipo papilar seroso.

## 2.1 Imunohistoquímica

Neste trabalho recorreu-se ao método de imunohistoquímica indireto enzimático de streptavidina-biotina, com distintos anticorpos monoclonais reativos contra a alfa-actina do músculo liso e contra a desmina humanas (Tabela 1).

Tabela 1: Anticorpos desmina e alfa-actina do músculo liso.

| <u>Anticorpo</u>               | <u>Clone</u>               | <u>Diluição</u> | <u>Recuperação<br/>antigénica</u>                            | <u>Tempo e<br/>temperatura de<br/>incubação</u> |
|--------------------------------|----------------------------|-----------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Alfa-actina do<br>músculo liso | Monoclonal                 | 1:50            | Micro-ondas<br>(3 ciclos de 5'<br>cada) em<br>tampão citrato | Durante a<br>noite (ON) a<br>4 °C               |
|                                | Mouse antibody<br>to human |                 |                                                              |                                                 |
|                                | NovoCastra                 |                 |                                                              |                                                 |
| Desmina                        | Monoclonal                 | 1:100           | Micro-ondas<br>(2 ciclos de 5'<br>cada) em<br>tampão citrato | Durante a<br>noite (ON)<br>4°C                  |
|                                | Mouse antibody<br>to human |                 |                                                              |                                                 |
|                                | Dako, D33                  |                 |                                                              |                                                 |

### 2.2.1 Protocolo utilizado:

1. Desparafinação das lâminas em xilol durante 20 minutos.
2. Hidratação das lâminas em álcoois com percentagem decrescente de concentração; 100% > 95% > 80% > 70%, durante cerca de 5 minutos cada. Passagem das lâminas por água destilada.
3. Recuperação antigénica dos tecidos com tratamento térmico em micro-ondas em tampão citrato (pH 6,0±0,2); (Para a preparação das soluções consultar.o anexo II)
4. Arrefecimento lento à temperatura ambiente, durante aproximadamente 30 minutos.
5. Inativação das peroxidases endógenas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3%, durante 30 minutos.
6. Colocação das lâminas em câmara húmida (Bio-Optica Milano S.P.A.) horizontal.
7. Delimitar o corte histológico com caneta hidrofóbica.
8. Lavagem das lâminas em PBS (tampão fosfato salino, pH 7,4±0,2), 3 vezes.
9. Incubar com soro normal universal durante 5 min (Large volume, Ultra V Block® da Thermo scientific).
10. Escorrer o excesso de soro normal.
11. Incubar durante a noite (ON), com o anticorpo primário, com diluição respetiva (Tabela 1).
12. Lavar 3 vezes cada lâmina com PBS.
13. Incubar com o soro biotilado universal (Biotinylated Goat Polyvalent Secondary, incluído no kit Ultra V Block® da Thermo Scientific), durante 10 min.
14. Lavagem com PBS 3 vezes.
15. Incubar com a estreptavidina Universal (Streptavidin Peroxidase, do kit Ultra V Block® da Thermo Scientific).
16. Revelação com o agente cromogénico, 3'-3 diaminobenzidina (DAB) ativado imediatamente antes de utilizar com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 33,3%. Deixar atuar durante 10 min.  
Nota: o DAB deveria de ser cuidadosamente manipulado, e todo o material que contacta com esta solução devia ser depositado num recipiente próprio contendo lixívia.
17. Lavar as lâminas em água corrente durante 5-10 minutos.

18. Contraste com hematoxilina de Gill, durante 1 minuto a 30 segundos.
19. Lavar as lâminas em água corrente tépida durante 10 minutos.
20. Desidratação das lâminas com passagem por álcoois com percentagem crescente de concentração, 95% I> 95% II> 100% I> 100% II, finalizando com a diafanização em xilol.
21. Montagem das lâminas com Entellan ® (Merck).

### 2.2.2 Avaliação da imunoexpressão

A avaliação da imunomarcção para ambos os anticorpos foi realizada da mesma forma, através da evidência de coloração castanha-dourada no citoplasma de diversos componentes celulares presentes no endométrio felino, sendo considerado controlo positivo interno para estes marcadores o miométrio.

A imunoexpressão observada foi contabilizada a nível celular em diferentes estruturas: no miométrio e nos vasos do estrato vascular; no endométrio, o epitélio quer da superfície quer glandular; o estroma do endométrio e os vasos presentes neste estroma.

Nos adenocarcinomas do endométrio, além do miométrio, vasos do estrato vascular e estroma tumoral também foi avaliada a expressão destes dois marcadores no epitélio tumoral.

As fases secretoras e as fases proliferativas foram utilizadas como grupo controlo normais, dado que estes marcadores ainda não estavam caraterizados para este órgão nas suas diferentes fases do ciclo.

Procedeu-se à avaliação da imunoexpressão de forma semi-quantitativa categórica, avaliando a intensidade de marcação, utilizando a média de cinco campos de 40x (Tabela 2), sendo avaliadas nestes as diversas estruturas anteriormente descritas segundo a sua intensidade para os diferentes grupos (grupos controlo e adenocarcinomas do endométrio).

Os marcadores alfa-actina do músculo liso e desmina, pelo facto de serem marcadores musculares permitiram a melhor observação de situações em que os adenocarcinomas do endométrio invadem a camada muscular. Foram por isso avaliadas com a denominação de invasão as situações em que se observaram permeações das camadas musculares: da camada interna (considerada assim invasão superficial) e da camada muscular mais externa (invasão profunda).

Tabela 2: Avaliação da intensidade de expressão dos anticorpos em estudo.

| Valor por 5 campos | Intensidade  |
|--------------------|--------------|
| 0                  | Sem marcação |
| 1 (+)              | Fraca        |
| 2 (++)             | Moderada     |
| 3 (+++)            | Forte        |

## 2.3 Análise estatística

A análise estatística dentro e entre os diferentes grupos foi realizada através da utilização do software IBM SPSS Statistics 24, para o Windows® pelo teste de Qui-quadrado. Foi considerado como estatisticamente significativo, quando o valor de  $p \leq 0,05$ .

## 3 Resultados

### 3.1 Imunoexpressão de alfa-actina do músculo liso

A tabela 3 e a figura 8 representam a avaliação da expressão da alfa-actina em todos os casos e estruturas observados. Na figura 9 podemos observar a expressão da intensidade e localização da alfa-actina presente em AEG's.

Foi possível observar marcação específica no controlo positivo interno (miométrio) em todos os casos utilizados.

Os resultados mostram que todas as células epiteliais do endométrio das fases folicular e lútea não apresentaram qualquer marcação para este anticorpo. A grande maioria das neoplasias também não apresentaram qualquer marcação (n=27 - 79,4%); no entanto em 7 casos (20,6%)

verificou-se marcação de intensidade fraca no epitélio neoplásico. As diferenças verificadas para a expressão da alfa-actina nos diferentes epitélios não foi significativa ( $p=0,66$ ).

Houve variação na intensidade de marcação para este anticorpo nos casos de úteros normais, havendo casos sem qualquer marcação e outros em que se observou uma marcação fraca. Verificou-se marcação positiva para a alfa-actina no estroma de todos os casos de adenocarcinoma ( $n=35$ ). Nestes casos, verificámos que a marcação predominante foi forte ( $n=17$  - 50%). O valor de ( $p=0,00$ ) no estroma entre as fases normais e os adenocarcinomas foi estatisticamente muito significativo.

Relativamente aos vasos do endométrio, durante o ciclo éstrico, em ambas as fases [na fase lútea ( $n=11$  - 100%) e na fase folicular ( $n=13$  - 100%)], houve expressão de marcação com intensidade fraca em todos os casos analisados. Os vasos do estroma dos adenocarcinomas obtiveram marcação positiva para todos os casos ( $n=35$ ); verificámos ainda que a intensidade de marcação predominante nesta situação foi forte ( $n=21$ ; 61,8%). Em função do observado, houve uma diferença altamente significativa ( $P < 0,001$ ) na expressão da alfa-actina do músculo liso dos vasos do estroma entre estes os úteros normais e os AEG's.

Em todos os casos foi possível evidenciar intensidade de expressão de alfa-actina no miométrio, até porque este tecido foi o nosso controlo positivo. A expressão forte foi a intensidade mais observada, sendo que nos AEG's está representada em 79,4% dos casos ( $n=27$ ) e no grupo controlo, onde também se observou uma forte expressão na maior parte dos casos [na fase folicular em 53% dos casos ( $n=7$ ) e em 72,7% dos casos na fase lútea ( $n=8$ )]. A avaliação estatística deste parâmetro não evidenciou uma diferença significativa ( $p=0,198$ ).

A intensidade de expressão de alfa-actina no estrato vascular do miométrio foi evidenciada em todos os casos. Foi forte a intensidade de expressão da alfa-actina na maior parte os casos da fase lútea ( $n=11$ ; 84,6%) e na fase folicular ( $n=10$ ; 90,9%), assim como nos casos de adenocarcinomas do endométrio ( $n=25$ ; 73,5%). A diferença entre a expressão destes grupos não foi significativa ( $p=0,298$ ) para este parâmetro.

Tabela 3: Imunoexpressão de Alfa-actina do músculo liso.

| Intensidade        | 0          | +         | ++        | +++       |         |
|--------------------|------------|-----------|-----------|-----------|---------|
| Epitélio           |            |           |           |           |         |
| Fase folicular     | 13(100%)   | 0(0,0%)   | 0(0,0%)   | 0(0,0%)   | P=0,66  |
| Fase lútea         | 11(100%)   | 0(0,0%)   | 0(0,0%)   | 0(0,0%)   |         |
| AGE´s              | 27 (79,4)% | 7 (20,6)% | 0(0,0%)   | 0(0,0%)   |         |
| Estroma            |            |           |           |           |         |
| Fase folicular     | 8(61,5%)   | 5(38,5%)  | 0(0,0%)   | 0(0,0%)   | P=0,000 |
| Fase Lútea         | 2(18,2%)   | 9(81,8%)  | 0(0,0%)   | 0(0,0%)   |         |
| AEG´s              | 0(0,0%)    | 5(14,7%)  | 12(35,3%) | 17(50%)   |         |
| Miométrio          |            |           |           |           |         |
| Fase folicular     | 0(0,0%)    | 0(0,0%)   | 6(46,2%)  | 7(53,8%)  | P=0,198 |
| Fase Lútea         | 0(0,0%)    | 0(0,0%)   | 3(27,3%)  | 8(72,7%)  |         |
| AEG´s              | 0(0,0%)    | 0(0,0%)   | 7(20,6%)  | 27(79,4%) |         |
| Vasos do Estroma   |            |           |           |           |         |
| Fase folicular     | 0(0,0%)    | 13(100%)  | 0(0,0%)   | 0(0,0%)   | P=0,000 |
| Fase lútea         | 0(0,0%)    | 11(100%)  | 0(0,0%)   | 0(0,0%)   |         |
| AEG´s              | 0(0,0%)    | 8(23,5%)  | 5(14,7%)  | 21(61,8%) |         |
| Vasos do miométrio |            |           |           |           |         |
| Fase folicular     | 0(0,0%)    | 0(0,0%)   | 2(15,4%)  | 11(84,6%) | P=0,298 |
| Fase lútea         | 0(0,0%)    | 1(9,1%)   | 0(0,0%)   | 10(90,9%) |         |
| AEG´s              | 0(0,0%)    | 8(23,5%)  | 5(14,7%)  | 21(61,8%) |         |

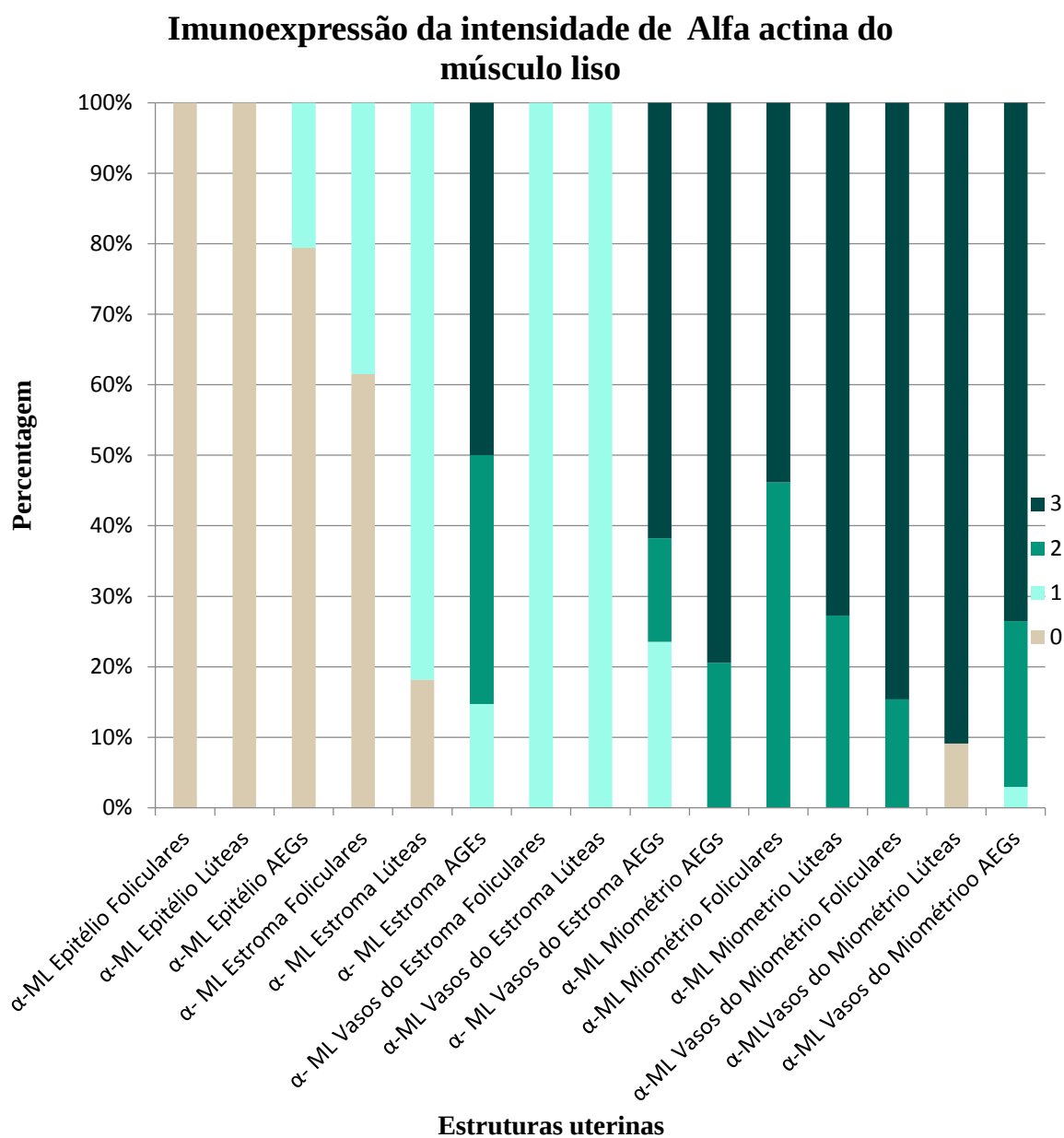


Figura 8: Gráfico representando a intensidade de expressão da alfa-actina do músculo liso em todos os casos e estruturas estudadas. Intensidade forte, verde-escuro (3); a cor verde traduz a intensidade moderada (2); a verde clara intensidade fraca (1) a ausência de marcação e sem intensidade corresponde à cor bege (0).

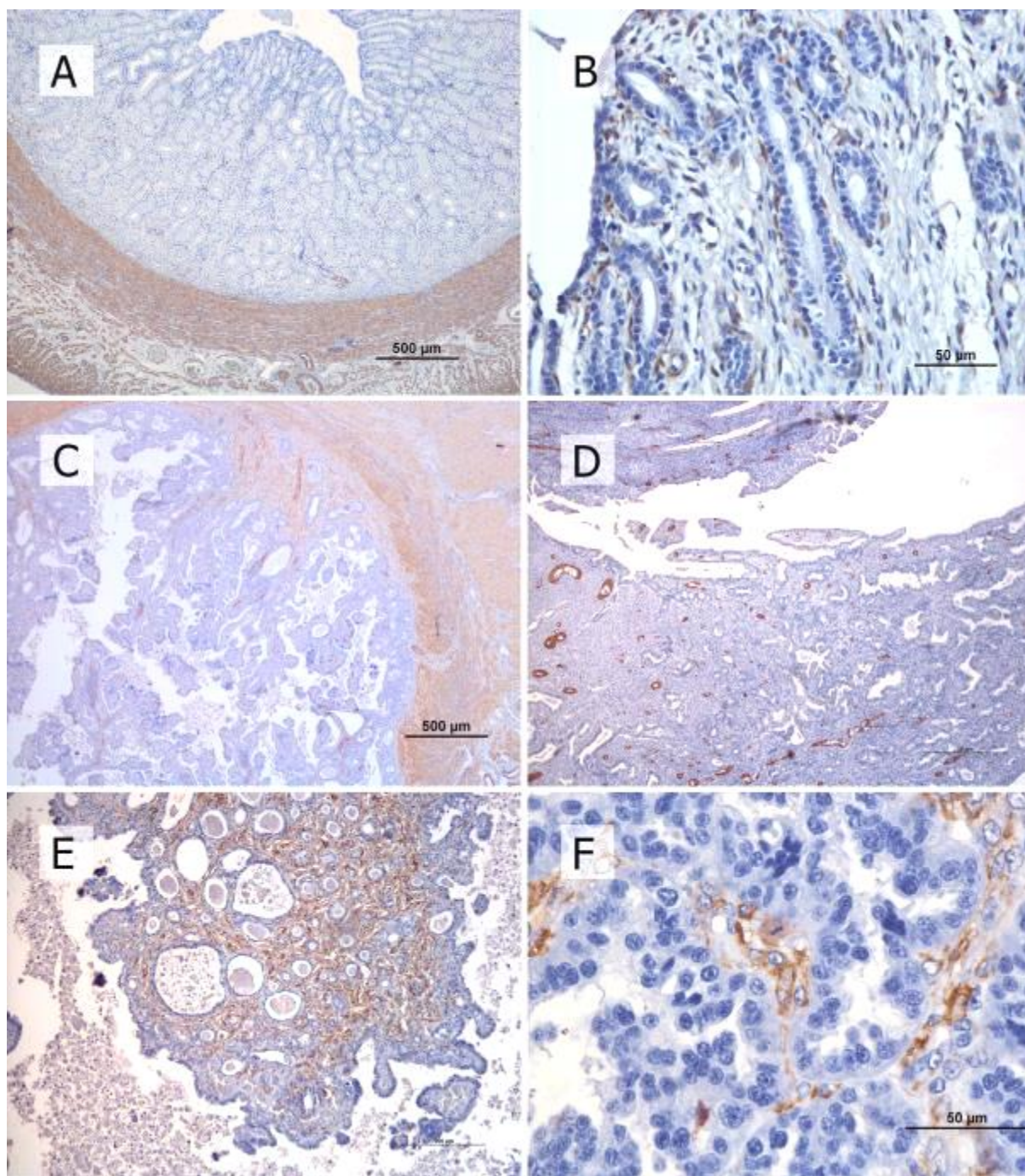


Figura 9: Imunoexpressão da alfa-actina do músculo liso. A) Marcação com intensidade forte do miométrio na fase secretora; B) Fase folicular, marcação nos vasos do estroma do endométrio; C) AEG, marcação positiva do miométrio (marcação moderada); D) Marcação positiva dos vasos em AEG's; E) marcação forte do estroma.. AEG's. F) Marcação forte do estroma e de células nos AEG's. Marcação com avidina-biotina pelo anticorpo alfa actina, contrastado com Hematoxilina de Gill.

### 3.2 Imunoexpressão de desmina

A tabela 4 e figura 10 são relativas à expressão da intensidade da desmina nas estruturas uterinas dos diferentes casos estudados. Foi possível observar marcação específica no controlo positivo interno, os vasos do miométrio, na totalidade dos casos observados. Na figura 11 podemos observar a expressão da intensidade e localização da desmina presente em AEG's.

Nenhuma célula epitelial do endométrio dos casos controlo, compreendendo a fase folicular e lútea, apresentaram qualquer expressão de desmina. Também o mesmo se verificou na maioria das neoplasias malignas (n=21 - 60%). No entanto, em 40% dos casos de adenocarcinomas (n=14), observou-se fraca intensidade de marcação das células epiteliais neoplásicas para a desmina, sendo uma diferença de expressão altamente significativa ( $p=0,002$ ) entre os casos controlo e os tumores.

Os vasos do estroma do endométrio apresentaram intensidade fraca de marcação nos casos estudados, em 58,3% dos casos na fase folicular (n=7), em 83,3% na fase lútea (n=10) e em 82,9% dos adenocarcinomas do endométrio (n=29) pelo que não se observaram diferenças significativas entre estes valores ( $p=0,226$ ).

O estroma do endométrio apresentou fraca intensidade na maior parte dos casos durante o ciclo, com 7 casos na fase folicular (58,3%) e 10 (83,3%) na fase lútea, os restantes casos não evidenciaram qualquer marcação. Também no estroma dos adenocarcinomas se observou predominantemente intensidade fraca de marcação (n=22 - 62,9%), pelo que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $p=0,27$ ).

Todos os vasos do miométrio (presentes no estrato vascular) dos adenocarcinomas do endométrio apresentaram marcação para a desmina, com uma intensidade de marcação variável, mas predominantemente fraca (n=21 - 60%). No grupo controlo observou-se a intensidade moderada em 50% dos casos na fase folicular (n=6) em 66,7% dos casos na fase lútea (n=8; 66,7%), verificando-se assim uma diferença estatisticamente significativa entre estes casos ( $p=0,056$ ). O miométrio foi o controlo positivo para a desmina, pelo que não observámos diferenças significativas ( $p=0,267$ ) na expressão deste marcador no miométrio dado a expressão ser predominantemente forte em todos os grupos em estudo: em 66,7% (n=8) dos casos na fase folicular; 83,3% (n=10) dos casos na fase lútea e em 65,7% (n=23) dos adenocarcinomas do endométrio.

Tabela 4: Imunoexpressão de Desmina em fases normais e em adenocarcinomas do endométrio felino

| Intensidade               | 0          | +          | ++        | +++       |           |
|---------------------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Epitélio</b>           |            |            |           |           |           |
| Fase folicular            | 12(100%)   | 0(0,0%)    | 0(0,0%)   | 0(0,0%)   |           |
| Fase lútea                | 12(100%)   | 0(0,0%)    | 0(0,0%)   | 0(0,0%)   | $P=0,002$ |
| AEG's                     | 21(60,00%) | 14(40,00%) | 0(0%)     | 0(0,0%)   |           |
| <b>Estroma</b>            |            |            |           |           |           |
| Fase folicular            | 5(41,7%)   | 7(58,3%)   | 0(0,0%)   | 0(0,0%)   |           |
| Fase lútea                | 2(16,7%)   | 10(83,3%)  | 0(0,0%)   | 0(0,0%)   | $P=0,273$ |
| AEG's                     | 9(25,7%)   | 22(62,9%)  | 4(11,4%)  | 0(0,0%)   |           |
| <b>Miométrio</b>          |            |            |           |           |           |
| Fase folicular            | 0(0,0%)    | 1(8,3%)    | 3(25%)    | 8(66,7%)  |           |
| Fase lútea                | 0(0,0%)    | 0(0,0%)    | 2(16,7%)  | 10(83,3%) | $P=0,267$ |
| AEG's                     | 0(0,0%)    | 0(0,0%)    | 12(34,3%) | 23(65,7%) |           |
| <b>Vasos do estroma</b>   |            |            |           |           |           |
| Fase folicular            | 5(41,7%)   | 7(58,3%)   | 0(0,0%)   | 0(0,0%)   |           |
| Fase lútea                | 2(16,7%)   | 10(83,3%)  | 0(0,0%)   | 0(0,0%)   | $P=0,226$ |
| AEG's                     | 6(17,1%)   | 29(82,9%)  | 0(0,0%)   | 0(0,0%)   |           |
| <b>Vasos do Miométrio</b> |            |            |           |           |           |
| Fase folicular            | 1(8,3%)    | 4(33,3%)   | 6(50%)    | 1(8,3%)   | $P=0,056$ |
| Fase lútea                | 0(0,0%)    | 2(16,7%)   | 8(66,7%)  | 2(16,7%)  |           |
| AEG's                     | 0(0,0%)    | 21(60%)    | 11(31,4%) | 3(8,6%)   |           |

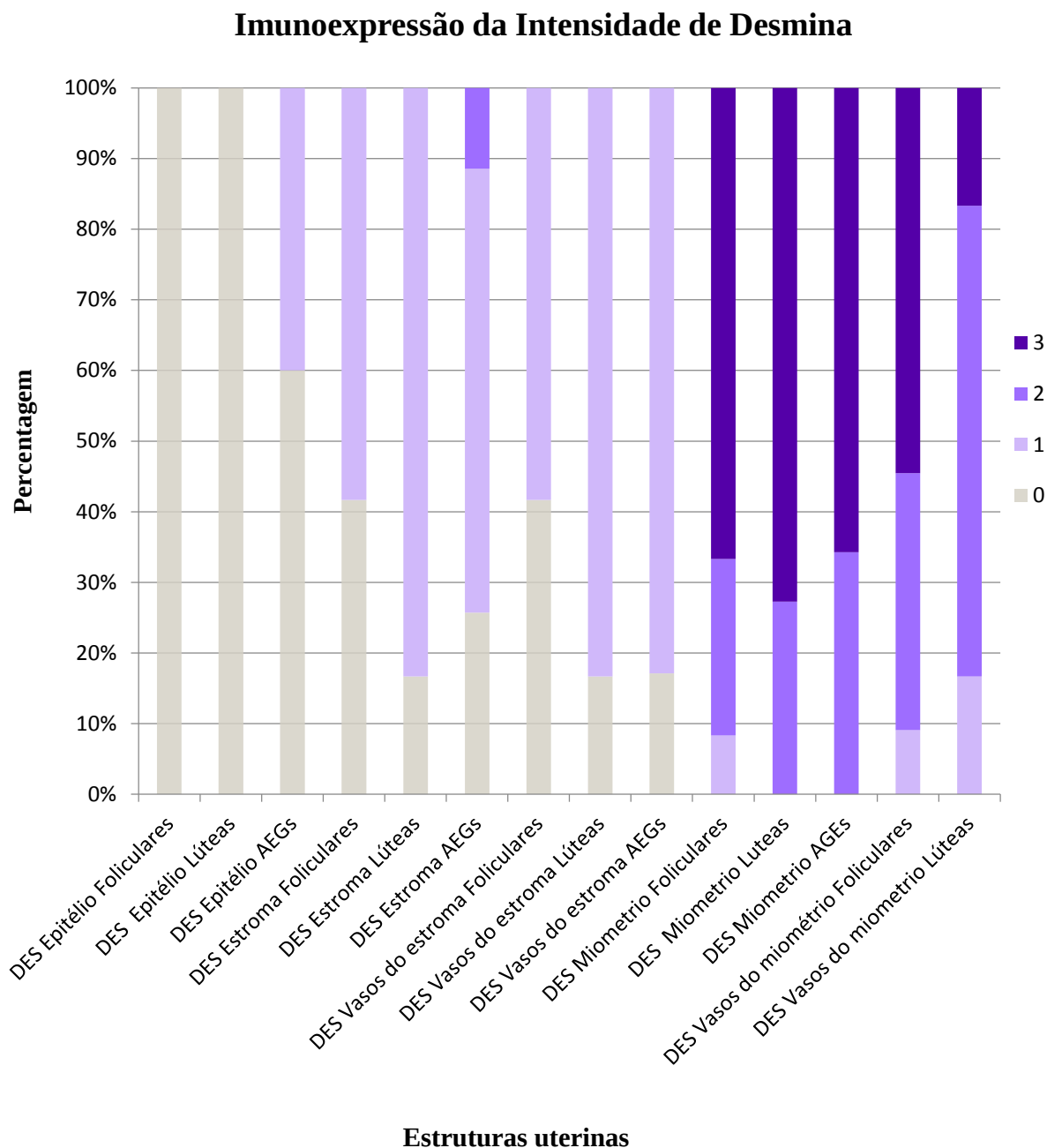


Figura 10 : Gráfico representando a intensidade de expressão da desmina em todas as estruturas e casos estudados. Com diferentes valores de intensidade a cor lilás; escuro representa intensidade forte (3); a lilás é a intensidade moderada (2); lilás claro intensidade fraca (1). A ausência de marcação corresponde à cor bege (0).

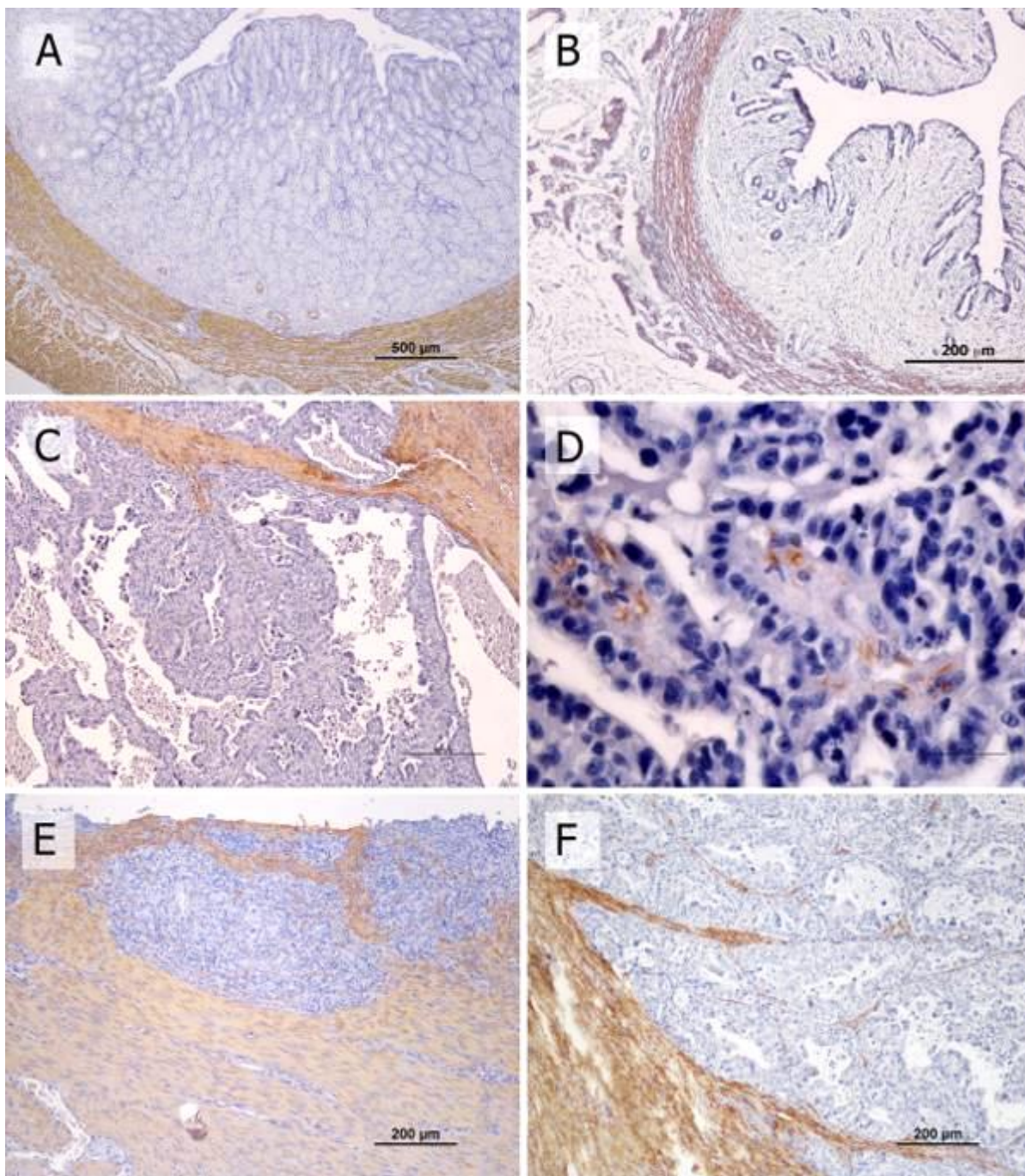


Figura 11: Imunoexpressão de desmina. A) Fase lútea, imunoexpressão forte para o miométrio e estrato vascular; B) Fase folicular com imunoexpressão forte para o miométrio e estrato vascular do miométrio; C) AEG's papilar seroso com forte intensidade do miométrio D) Células epiteliais neoplásicas que mostram imunoexpressão positiva para desmina; E) invasão da camada interna por AEG através do miométrio; F- invasão da camada interna por AEG através do miométrio.

### 3.3 Imunoexpressão de desmina e alfa-actina do músculo liso em casos normais

Tabela 5: Imunoexpressão de alfa-actina do músculo liso em fases normais

| Intensidade                   | 0        | +        | ++         | +++        |                 |
|-------------------------------|----------|----------|------------|------------|-----------------|
| <u>Estroma</u>                |          |          |            |            |                 |
| Fase folicular                | 8(61,5%) | 5(38,5%) | 0(0,0%)    | 0(0,0%)    | <i>P</i> =0,04  |
| Fase lútea                    | 2(18,2%) | 9(81,8%) | 0(0,0%)    | 0(0,0%)    |                 |
| <u>Miométrio</u>              |          |          |            |            |                 |
| Fase folicular                | 0(0,0%)  | 0(0,0%)  | 6(46,2,4%) | 7(53,8%)   | <i>P</i> =0,341 |
| Fase lútea                    | 0(0,0%)  | 0(0,0%)  | 3(27,3,0%) | 8(72,7,0%) |                 |
| <u>Vasos do<br/>estroma</u>   |          |          |            |            |                 |
| Fase folicular                | 0(0,0%)  | 13(100%) | 0(0,0%)    | 0(0,0%)    | <i>P</i> =1     |
| Fase lútea                    | 0(0,0%)  | 11(100%) | 0(0,0%)    | 0(0,0%)    |                 |
| <u>Vasos do<br/>miométrio</u> |          |          |            |            |                 |
| Fase folicular                | 0(0,0%)  | 0(0,0%)  | 2(15,4%)   | 11(84,6%)  | <i>P</i> =0,482 |
| Fase lútea                    | 1(9,1%)  | 0(0,0%)  | 0(0,0%)    | 1(90,9%)   |                 |

Tabela 6: Imunoexpressão de desmina em fases normais

| Intensidade               | 0        | +         | ++       | +++       |         |
|---------------------------|----------|-----------|----------|-----------|---------|
| <u>Estroma</u>            |          |           |          |           |         |
| Fase folicular            | 5(41,7%) | 7(58,3%)  | 0(0,0%)  | 0(0,0%)   | P=0,185 |
| Fase lútea                | 2(28,6%) | 10(70,8%) | 0(0,0%)  | 0(0,0%)   |         |
| <u>Miométrio</u>          |          |           |          |           |         |
| Fase folicular            | 0(0,0%)  | 1(8,3%)   | 3(25,0%) | 8(66,7%)  | P=0,640 |
| Fase lútea                | 0(0,0%)  | 0(0,0%)   | 2(16,7%) | 10(83,3%) |         |
| <u>Vasos do estroma</u>   |          |           |          |           |         |
| Fase folicular            | 5(41,7%) | 7(58,3%)  | 0(0,0%)  | 0(0,0%)   | P=0,185 |
| Fase lútea                | 2(28,6%) | 10(70,8%) | 0(0,0%)  | 0(0,0%)   |         |
| <u>Vasos do miométrio</u> |          |           |          |           |         |
| Fase folicular            | 1(8,3%)  | 4(33,3%)  | 6(50%)   | 1(8,3)    | P=0,600 |
| Fase lútea                | 0(0,0%)  | 2(16,7%)  | 8(66,7)  | 2(16,7)   |         |

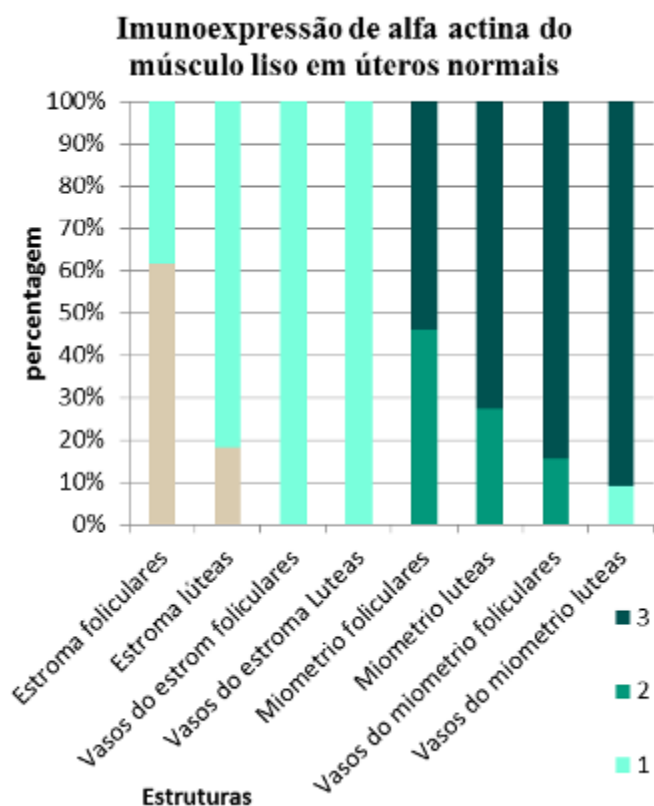


Figura 12: Imunoexpressão da alfa-actina do músculo liso em todas as estruturas estudadas em casos normais Com diferentes valores de intensidade. Cor verde escuro corresponde a intensidade forte (3);intensidade moderada (2) a verde claro intensidade fraca clara a intensidade fraca (1) ausência de marcação a cor bege (0)

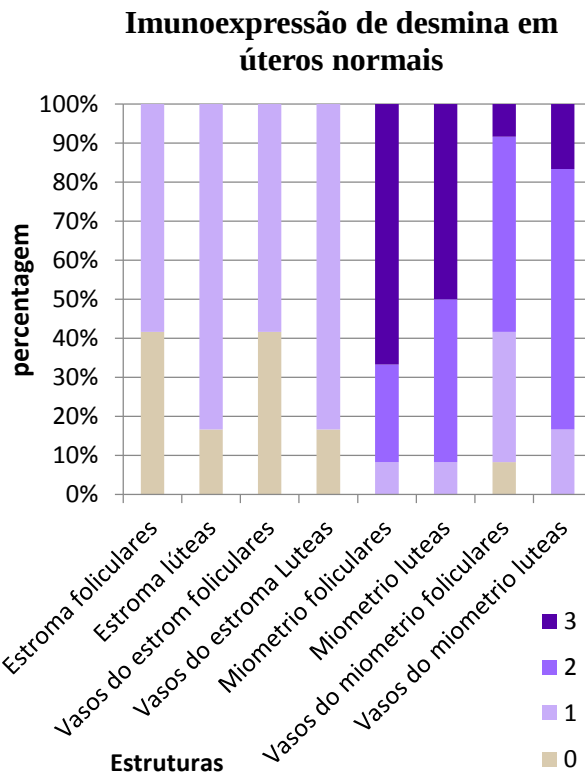


Figura 13: Imunoexpressão de desmina em todas as estruturas estudadas em casos normais com diferentes valores de intensidade. Cor lilás escuro corresponde a intensidade forte (3); a lilás intensidade moderada (2) a lilás claro intensidade(1) ausência de marcação cor bege (0)

Nos casos normais, os dois marcadores utilizados são praticamente sobreponíveis, com exceção da alfa-actina do músculo liso que marca mais intensamente os vasos, nomeadamente os vasos do miométrio (Tabela 5 e 6; Figura 12 e 13).

Para ambos os biomarcadores a marcação é mais intensa a nível do miométrio e vasos do miométrio, correspondendo aos controlos internos positivos, comparativamente com todas as outras estruturas uterinas analisadas.

Os vasos do estroma do endométrio apresentam uma intensidade fraca em 100% dos casos, para o marcador alfa-actina do músculo liso, para ambas as fases; Ao passo que no marcador desmina apresenta uma percentagem sem marcação que não ultrapassa os 45% na fase folicular e 20% na fase lútea.

### 3.4 Comparação da marcação da desmina e alfa-actina nos adenocarcinomas do endométrio

Fez-se a comparação da imunoexpressão dos dois marcadores nas diferentes estruturas em estudo, nos adenocarcinomas do endométrio (Tabela 7 e Figura 14).

O epitélio apresentou fraca expressão para os dois marcadores, embora com maior intensidade de expressão pela desmina, não apresentando diferenças significativas. O estroma, os vasos do estroma e do miométrio, apresentaram diferenças altamente significativas ( $p \leq 0,001$ ) sendo mais intensa a marcação destas estruturas pela alfa-actina. O miométrio exibiu uma marcação semelhante, sem qualquer diferença significativa.

A alfa-actina do músculo liso marcou células presentes no estroma com intensidade forte em  $n=17$  (50%) contrastando com a desmina em que a intensidade predominante encontrada nestas células é fraca ( $n= 22$ ; 62,9 %).

Tabela 7: Comparação da imunoexpressão de desmina e alfa-actina do músculo liso em adenocarcinomas do endométrio felino

| Intensidade     |             | 0         | +         | ++        | +++       |               |
|-----------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------|
| Epitélio        | Alfa-actina | 27(79,4%) | 7(20,6%)  | 0(0,0%)   | 0(0,0%)   | $P=0,099$     |
|                 | Desmina     | 21(60,0%) | 14(40,0%) | 0(0,0%)   | 0(0,0%)   |               |
| Estroma         | Alfa-actina | 0(0,0%)   | 5(14,7%)  | 12(35,3%) | 17(50%)   | $P\leq 0,001$ |
|                 | Desmina     | 9(25,7%)  | 22(62,9%) | 4(11,4%)  | 0(0,0%)   |               |
| Miométrio       | Alfa-actina | 0(0,0%)   | 0(0,0%)   | 7(20,6%)  | 27(79,4%) | $P=0,141$     |
|                 | Desmina     | 0(0,0%)   | 0(0,0%)   | 12(34,3%) | 23(65,7%) |               |
| Vasos estroma   | Alfa-actina | 0(0,0%)   | 8(23,5%)  | 5(14,7%)  | 21(61,8%) | $P\leq 0,001$ |
|                 | Desmina     | 3(17,1%)  | 29(82,9%) | 0(0,0%)   | 0(0,0%)   |               |
| Vasos miométrio | Alfa-actina | 0(0,0%)   | 1(2,9%)   | 8(23,5%)  | 25(73,5%) | $P\leq 0,001$ |
|                 | Desmina     | 0(0,0%)   | 21(60,0%) | 11(31,4%) | 3(8,6%)   |               |

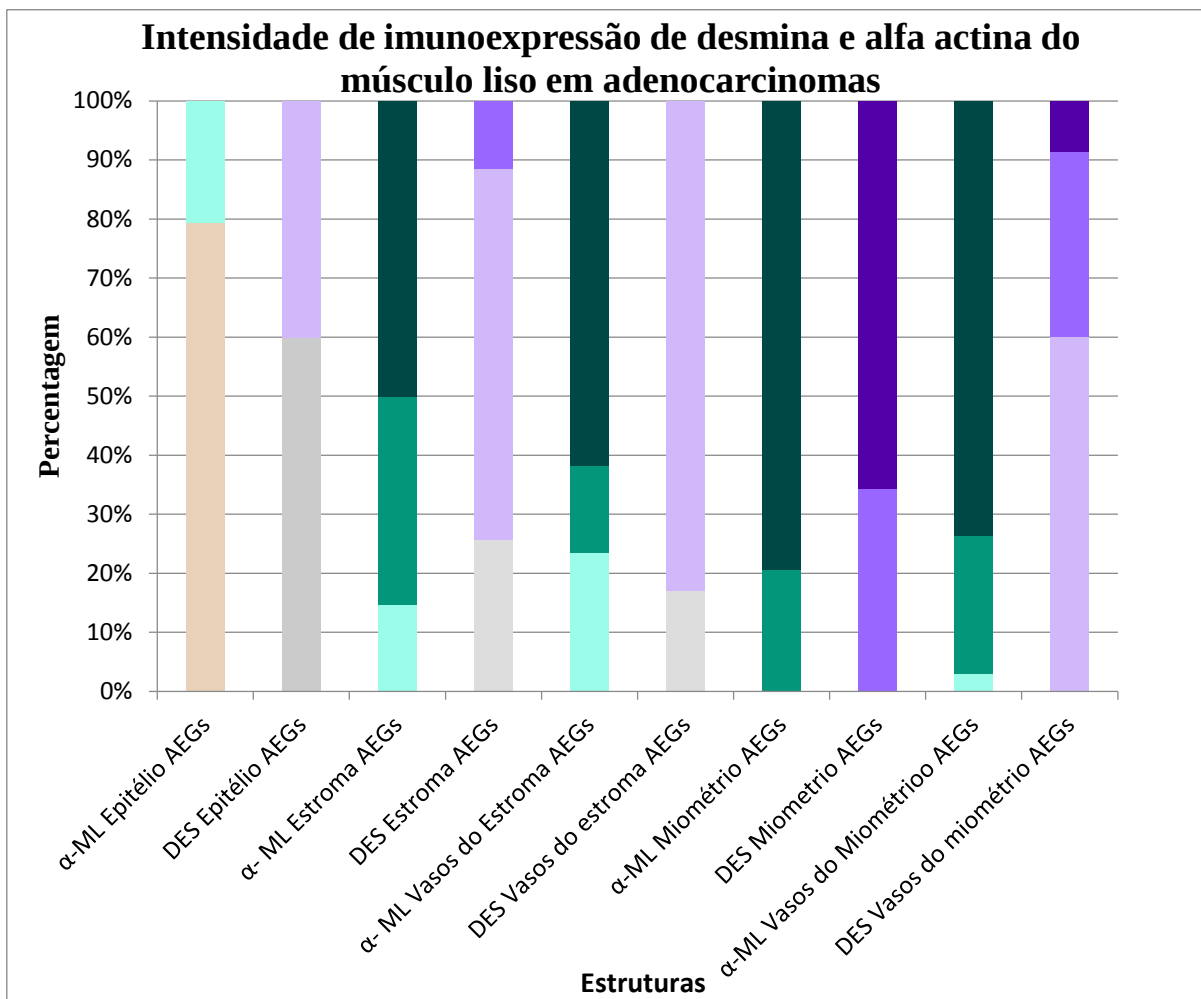


Figura 14: Representação da imunoexpressão da alfa-actina e da desmina nas diferentes estruturas dos adenocarcinomas do endométrio.

Para diferentes valores de intensidade de desmina, a cor lilás escuro representa intensidade mais forte (3); a lilás a intensidade moderada (2); a lilás clara intensidade fraca (1) a ausência de marcação a cinza claro (0).

Para diferentes valores de intensidade de alfa-actina do músculo liso: cor verde escuro representa intensidade mais forte (3); a verde moderada (2); a verde clara intensidade fraca (1) a ausência de marcação bege (0).

A alfa-actina do músculo liso em geral marcou de uma forma mais intensa as estruturas vasculares. Demonstrou assim uma expressão com intensidade forte no estrato vascular do miométrio, em 73,5% dos casos (n=25) para este marcador, ao passo de que para a mesma estrutura com a desmina esta marcação forte apenas foi registada em 8,6% das estruturas (n=3). Quanto aos vasos presentes no estroma, verificou-se uma marcação com intensidade forte para a

alfa-actina do músculo liso em 61,8% dos casos avaliados (n=21), contrastando com a desmina que apenas expressou marcação fraca predominante em 82,9% dos casos (n=29).

### 3.5 Invasão do miométrio

Dos adenocarcinomas em estudo, foi possível avaliar em 34 casos, a existência ou não de permeação muscular (Tabelas 8 e 9; Figuras 15 e 16).

Com a alfa-actina do músculo liso observou-se invasão muscular em 73% (n=25) dos adenocarcinomas do endométrio, sendo que 16 (47 %) a uma invasão é apenas da camada superficial e 9 (26%) apresentam também invasão da camada profunda.

A mesma avaliação com a desmina permitiu visualizar essa invasão em 70% dos casos (n= 24) , sendo 12 casos (35%) com invasão da camada muscular superficial e 12 (35 %) com invasão da camada profunda.



Figura 15: Invasão do miométrio recorrendo ao marcador desmina



Figura 16: Invasão do miométrio recorrendo ao anticorpo alfa-actina do músculo liso

Tabela 8 : Invasão do miométrio recorrendo ao marcador desmina

| Invasão  |             |             |
|----------|-------------|-------------|
| Profunda | Superficial | Sem invasão |
| N=12     | N=12        | N=10        |

Tabela 9 : invasão do miométrio recorrendo ao marcador alfa-actina do músculo liso

| Invasão  |             |             |
|----------|-------------|-------------|
| Profunda | Superficial | Sem invasão |
| N=9      | N=16        | N=9         |

## 4 Discussão

Os estudos realizados nos últimos anos com a técnica de imunohistoquímica permitiram avanços na compreensão de muitas patologias animais e também acerca dos adenocarcinomas do endométrio de gata. No entanto, os trabalhos de investigação nesta área são escassos, e até ao presente estes estudos focaram-se principalmente na avaliação de marcadores que caracterizam as células neoplásicas (Saraiva, 2015).

Uma das razões para esta forma de abordagem mais geral em relação a este tipo de neoplasia deveu-se ao facto de estes tumores serem considerados raros nos felinos (Kennedy *et al.*, 1998). No entanto, estudos mais recentes permitiram a observação mais frequente de adenocarcinomas do endométrio em gata, mesmo em animais mais jovens, com idade inferior a 2 anos (Payan-Carreira *et al.*, 2013; Saraiva, 2015). Uma das conclusões destes estudos é que é importante que se proceda sempre à avaliação metódica e sistemática dos úteros de animais submetidos a necrópsia ou excisados por OVH de rotina, com ou sem sintomatologia clínica do sistema reprodutor ou em contexto de prevenção relacionados por exemplo com tumores mamários (Payan-Carreira *et al.*, 2013; Saraiva, 2015).

Foi objeto do presente estudo alargar os nossos conhecimentos acerca da biopatologia dos AEG's, fazendo uma abordagem desta patologia centrada no estudo do estroma neoplásico juntamente com a matriz extra celular e os seus constituintes. Pretendia-se assim compreender melhor as alterações do microambiente neoplásico.

Estudar especificamente determinados antigénios presentes em células, nomeadamente proteínas citoplasmáticas, permite de uma forma essencial compreender as comunicações e interações biológicas fundamentais em células e tecidos no seu estado fisiológico e hígido. Estes dados permitem depois a comparação entre tecidos sãos e em situações de doença.

Pela escassa quantidade de informação relativa a este tema, no presente estudo tivemos de recorrer a consulta de literatura noutras espécies animais e nos Humanos.

Os filamentos intermédios, os microfilamentos e os microtúbulos são os três principais componentes do citoesqueleto das células (Helfand *et al.*, 2004). Embora estes três sistemas sejam constituídos por proteínas distintas, estes elementos estão constantemente em interação (Schliwa & Blerkom, 1981; Yang *et al.*, 1996; Helfand *et al.*, 2004; Margiotta & Bucci, 2016).

A alfa-actina do músculo liso assim como a desmina, são estudadas tanto em medicina veterinária como em medicina humana na investigação de processos fisiológicos e patológicos. Nos laboratórios de anatomia patológica é utilizada para fins de diagnóstico mais vulgarmente do foro oncológico. Estes compostos estão incluídos em painéis imunohistoquímicos que permitem identificar e diferenciar a histogénese dos tecidos e das lesões em estudo (Vos *et al.*, 1993; Patterson *et al.*, 2003; Gumber *et al.*, 2015; Kawabata *et al.*, 2016).

A alfa-actina do músculo liso está inserida no grupo dos microfilamentos associada ao músculo liso possibilitando a sua identificação em neoplasias relacionadas com este tecido, quer benignos (leiomiomas), quer malignos (leiomiossarcomas) quer em humanos ou em animais (Skalli *et al.*, 1989; Serakides *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2003; Radi *et al.*, 2005, Souza *et al.*, 2012, Payan-Carreira *et al.*, 2013). Esta molécula está intimamente associada a adesões intercelulares e intervém em duas vertentes principais, uma delas estrutural, que inclui a integridade/ arquitetura celular, e outra envolvida na motilidade promotora/ geradora de força, uma vez que está associada à contractilidade celular (Franquemont *et al.*, 1991). A alfa-actina do músculo liso é codificada por apenas um gene, expressa por células musculares lisas, compreendendo a camada média, e os pericitos do sistema vascular (Yuan, 2015). A sua expressão pode estar dependente de fatores hormonais como o estradiol (Christensen *et al.*, 1995; Hong, 2004).

Neste trabalho, observámos uma marcação extensa e intensa nas células musculares do miométrio e dos vasos, confirmando assim a sensibilidade do anticorpo utilizado. O miométrio foi por isso usado como controlo positivo, certificando que o anticorpo usado, desenhado para humanos, pode ser utilizado para a espécie felina para marcar especificamente músculo liso, pela propriedade da reatividade cruzada. Os nossos resultados estão de acordo com os estudos de Gil da Costa e colaboradores (2009) que, numa série menor (n=6), também encontrou reatividade positiva deste anticorpo no músculo liso no miométrio e nos vasos do útero de gatas.

Não havendo referências ao padrão de normalidade detalhado para estes marcadores, iniciamos o estudo com a marcação de úteros sem qualquer alteração patológica, em duas fases do ciclo éstrico: na fase de dominância estrogénica ou folicular, e na fase de predomínio de progesterona ou fase lútea ou secretora. Nestas fases observou-se expressão fraca de alfa-actina

do músculo liso em células do estroma do endométrio, o que está de acordo com estudos mais antigos realizados em mulheres (Franquemont *et al.*, 1991).

Os miofibroblastos possuem certas propriedades inerentes a células musculares lisas e características ultra-estruturais onde é possível observar estruturas como microfilamentos e corpos densos (Bird & Willis, 1965) sendo positiva a marcação para a alfa-actina de músculo liso (Franquemont *et al.*, 1991; Rao *et al.*, 2014). Por esta razão sugerimos que as células do estroma do endométrio que apresentaram esta marcação positiva nos casos por nós estudados, com marcação positivas possam ser miofibroblastos (Franquemont *et al.*, 1991; Miettinen & Lasota, 2001; Tuxhorn *et al.*, 2002; Ding *et al.*, 2014;). Nos adenocarcinomas do endométrio, a marcação do estroma foi constante em todos os casos com intensidade variável, predominantemente forte, expressa de forma significativa mais preponderante que nos úteros normais. As células do estroma com expressão positiva apresentavam uma morfologia fusiforme alongada, sugerindo novamente que estas células mesenquimatosas associadas a este tipo de neoplasias sejam muito provavelmente miofibroblastos que alguns autores denominam de “fibroblastos associados a cancro”, do inglês “*cancer-associated fibroblasts*” (Ballardini, 1988; Cintorino *et al.*, 1991; Yang, 1996; Kishaba, *et al.*, 2010; Pietras & Östman, 2010; Augsten, 2014). Estas células apresentam um aumento da quantidade de alfa-actina que poderá estar relacionado com o aumento da sua atividade e contractilidade, podendo contribuir ativamente desta forma para a um microambiente neoplásico com características muito próprias (Zhang *et al.*, 1996; Hinz *et al.*, 2003).

Existem vários estudos, especialmente na medicina humana e em animais de laboratório, que evidenciam o papel agressivo de miofibroblastos associados ao processo neoplásico; estas células estão implicadas na potencialização da proliferação e subsequente progressão tumoral (Cintorino *et al.*, 2001; Augsten *et al.*, 2014; Hanley *et al.*, 2016). Acredita-se que os miofibroblatos associados aos tumores contribuam para diversas alterações do meio neoplásico, facilitando os processos de progressão celular e metastização. Estas células podem produzir componentes que modulam a matriz extracelular e diferentes factores solúveis como citocinas, quimiocinas, factores de crescimento como o vascular endotelial o VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), o TGF- $\beta$ 1, (factor de crescimento de transformação beta1) metaloproteinases e fibronectina. Os miofibroblastos excretam factores de crescimento promovendo e acelerando o

crescimento das células epiteliais malignas (Orimo *et al.*, 2001; Xing *et al.*, 2010). Desta forma este tipo de células desempenha funções importantes na modulação do microambiente celular por via parácrina, e ainda altera as propriedades físicas da matriz extracelular (Xing *et al.*, 2010; Cirri & Chiarugi, 2011; Augsten *et al.*, 2014). Os miofibroblastos apresentam morfologia comum a fibroblastos e a células musculares lisas.(Davis & Molkentin, 2014).

Nos vasos do estroma em situações de AEG's, a alfa-actina do músculo liso apresentou três níveis diferentes de intensidade de imunoexpressão (fraca, moderada e forte), contrastando com o grupo controlo que apenas apresentou fraca intensidade de expressão deste marcador. Este fato pode ser mais uma prova do comportamento heterogêneo dos vasos associados ao tumor, os quais sofrem alterações morfológicas e bioquímicas em situações de neoplasia (Tonino & Abreu, 2011).

Observámos também, nos vasos sanguíneos, uma maior expressão da alfa-actina do músculo liso que da desmina. Assim, entre estes dois biomarcadores sugerimos que a alfa-actina possa ser um melhor o anticorpo para identificar estruturas vasculares, propondo a aplicação futura em estudos e diagnóstico que foquem estas estruturas e estas lesões na espécie felina.

A imunoexpressão nos vasos do estroma entre as fases normais e o grupo dos AEG's demonstram resultados estatisticamente significativos para alfa-actina do músculo liso. Este aumento de imunoexpressão nos AEG's para a alfa-actina do músculo liso pode indicar, por um lado, um sinal de remodelação vascular e por outro, maturação vascular presente na neoplasia (Morikawa *et al.*, 2002). No entanto, não foi objeto específico deste estudo a quantificação dos vasos presentes nesta doença, pelo que as observações descritas são baseadas numa avaliação semiquantitativa. Observamos no entanto, que nem todos os vasos presentes no estroma expressaram este biomarcador e esta heterogeneidade de marcação pode estar relacionada com alterações estruturais vasculares associadas também à fragilidade característica dos vasos nas neoplasias (Eberhard *et al.*, 2002; Tonino & Abreu, 2011).

A desmina, assim como a alfa-actina é utilizada para o diagnóstico diferencial e determinação da histogénese tumoral (Arentz *et al.*, 2011). É o filamento intermédio que predomina em células musculares lisas do trato genital, com exceção das células musculares lisas dos vasos em que o FI predominante não é a desmina mas sim a vimentina. Esta observação foi

evidenciada em estudos de células musculares lisas de várias espécies (homem, rato, porco, vaca, coelho) (Gabbiani *et al.*, 1981) e o presente estudo confirmam estes dados.

A desmina interage com várias moléculas, e pode formar heteropolímeros com proteínas da mesma classe como a vimentina. A desmina pode ser responsável por propriedades elásticas musculares, contribui também para a motilidade/ contratilidade, uma vez que os corpos densos observados em microscopia eletrónica são considerados “centros de contração” (Costa, 2004; Arentz *et al.*, 2011).

Neste trabalho os dois biomarcadores estudados não apresentaram diferenças relevantes entre as duas fases nos grupos controlo (fases normais: fase lútea/ proliferativa e fase folicular/ secretora). Noutros trabalhos desenvolvidos pelo grupo que está integrado no CECAV-UTAD e no LHAP, foram descritas pequenas variações entre as fases lútea e folicular para outros marcadores, de forma não significativa (Macedo, 2016; Saraiva, 2015).

No presente estudo a intensidade de imunoexpressão da desmina no estroma dos adenocarcinomas, foi superior relativamente ao grupo controlo, contudo não foi significativo, contrastando com o biomarcador alfa-actina do músculo liso que apresentou resultados estatisticamente significativos com maior intensidade de expressão. Em medicina humana verifica-se que o estroma pode ser positivo para casos normais/fisiológicos para desmina e a alfa-actina do músculo liso, no entanto foi um estudo realizado num pequeno número de casos (n=5) (Franquemont *et al.*, 1991).

Comparando os diferentes grupos, os vasos do miométrio apresentaram idêntica expressão entre os animais normais e grupos com AEG's, não sendo os resultados estatisticamente significativos.

Nas células do epitélio, ao contrário dos resultados negativos das fases normais observámos marcação positiva para alfa-actina e desmina em adenocarcinomas, o que sugere que as células epiteliais estejam em processo de TEM. Outros estudos nestes adenocarcinomas com o marcador vimentina e citoqueratinas 8/18 obtiveram resultados semelhantes com a indicação de uma indiferenciação celular com a perda de expressão de CK8/18 e expressão positiva nas células epiteliais de vimentina corroborando com a nossa hipótese de transição TEM desta neoplasia (Abreu, 2015; Macedo, 2016). Devido a estes factos, acreditamos que os AEG's estejam a sofrer alterações a nível do metabolismo basal, bioquímico, estando o fenómeno de TEM associado ao

aumento de agressividade biológica para os tumores de origem epitelial, exacerbando a invasão tumoral por estas células neoplásicas (Tsai & Yang, 2013; Zhao *et al.*, 2014; Sowa *et al.*, 2015) uma vez que as células do epitélio com estas alterações adquirem propriedades e funções de células mesenquimatosas aumentando o seu potencial de metastização (Tennakoon, *et al.*, 2015).

O mecanismo de TEM foi alvo de muitos estudos e estão associados a tumores de origem epitelial que adotaram um comportamento mais agressivo, invasivo e com pior prognóstico. As células neoplásicas presentes em tumores que adquiram características TEM podem prevenir o fenómeno de senescência induzida por oncogenes, promovendo deste modo a agressividade das neoplasias (Kalluri & Weinberg, 2009). As etapas chave que acompanham o processo completo de TEM são: a invasão, a permeação vascular, o transporte através da corrente sanguínea, a formação de micrometástases e a colonização de tecidos à distância (Kalluri & Weinberg, 2009; Tsa & Yang, 2013).

A nível do estroma dos adenocarcinomas os resultados observados para estes dois marcadores são bastante diferentes, com expressão predominantemente fraca para a desmina contrastando com expressão forte de forma significativa para a alfa-actina do músculo liso. A alfa-actina do músculo liso é utilizada como marcador dos miofibroblastos, ao passo que a utilização da desmina nesta função é um marcador controverso (Wever *et al.*, 2008; Xing *et al.*, 2010; Rao *et al.*, 2014). Comparando os grupos de adenocarcinomas com o grupo controlo observaram-se diferenças estatisticamente significativas na expressão de alfa-actina do músculo liso, com imunoexpressão mais forte nos casos de AEG's, o que confirma a nossa sugestão que possa haver no estroma destes tumores miofibroblastos/ CAF's.

As células que se encontram em TEM possuem propriedades facilitadoras para a formação de miofibroblastos e vice-versa o que poderá ser a justificação do aumento da expressão nos tumores para estes dois marcadores (Augsten *et al.*, 2014).

Os adenocarcinomas do endométrio em animais domésticos poderão também emitir metástases e colonizar órgãos à distância. Como nas outras neoplasias, a primeira fase da cascata de metastização é a iniciação, seguindo-se do crescimento/ desenvolvimento neoplásico. Depois com a migração e invasão através do miométrio e a permeação vascular permite alcançar órgãos distantes através do sistema circulatório. Quando efracionam a serosa ocorre metastização

subsequente, por sementeira, pela cavidade abdominal com metástases nos órgãos vizinhos (Pires *et al*, 2013).

No processo de TEM ocorre remodelação das proteínas do citoesqueleto; por um lado as células do epitélio perdem peculiaridades específicas das células epiteliais como as citoqueratinas, e por outro lado adquirem um fenótipo fusiforme no qual são expressas proteínas específicas do “novo” tipo celular (das células mesenquimatosas) como a vimentina (Klymkowsky *et al.*, 2009; Yilmaz & Christofori, 2009) e características funcionais das mesmas, destacando-se do epitélio em que se encontram e adquirem a habilidade de migrar através da remodelação do ambiente circundante. As células do epitélio com morfologia arredondada ou poliédrica tornam-se achatadas, alongadas ou estreladas, assemelhando-se a células mesenquimatosas (Yang & Weinberg, 2008). Estas células além de alterarem o seu comportamento a nível da motilidade também adquirem um grau elevado de resistência devido a alterações sofridas no citoesqueleto e capacidade de degradar a matriz extracelular (Gurzu *et al.*, 2015).

O fenómeno de TEM pode culminar num processo metastático. Este processo de proliferação à distância de células do tumor primário, pode ser facilitado pela formação de microprotusões da membrana (filopodia e pseudópodes), que conferem a capacidade de aderir ao endotélio e de sofrer permeação vascular (Wicki *et al.*, 2006; Yang & Weinberg, 2008). Este fenómeno de TEM é controlado por diversas vias de sinalização, e regulado através da expressão de vários fatores de transcrição (Thiery, 2002).

O TEM tem sido relacionado com fenómenos de remodelação da matriz extra celular mediada por enzimas proteolíticas como as metaloproteinases. A perda de expressão da caderina-E, interveniente a nível das junções celulares, é uma das características do processo de TEM (Thiery, 2002). Hoje pensa-se que o processo de TEM está também relacionado com inflamação e a angiogénese através da produção da COX-2, que por sua vez estimula o TGF-  $\beta$  controlada pela via da PGE-2 (Kalluri & Weinberg 2009; Fuxe & Karlsson, 2012).

O comportamento de adaptabilidade e plasticidade celular exibido pelas células quando expostas aos diferentes estímulos do ambiente neoplásico, é interessante para se explorar em estudos futuros. O TEM, como já foi referido, promove o aparecimento de células com características pró-invasivas que partilham o mesmo tipo de proteínas que os miofibroblastos, que

curiosamente podem promover e estimular a TEM, contribuindo também para esta alteração fenotípica (Radisky *et al.*, 2007; Augsten, 2014).

Um estudo de Gil da Costa e colaboradores (2009) sugere que a transição epitélio-mesenquima não é comum em adenocarcinomas endometriais felinos. No entanto, o estudo destes autores foi realizado numa série muito limitada de casos (apenas 6), pelo que, o presente estudo numa série bem mais ampla, apresenta fortes indícios de que este mecanismo possa estar presente neste tipo de neoplasia. Estudos com a vimentina (Abreu, 2015) nesta mesma série de tumores são mais um reforço desta nossa afirmação, mas mesmo assim ainda serão necessários outros estudos complementares, com outros biomarcadores, como por exemplo as metaloproteinases e a caderina-E, para conseguirmos de forma mais segura tirar estas ilações.

Uma melhor compreensão da biopatologia oncológica consiste em estudar as diferentes interações entre células neoplásicas e o estroma envolvente mediados por moléculas sinalizadoras (Levental *et al.*, 2009).

O termo interessante de *seed and soil* empregue na oncologia associa o processo de invasão e metastização ao microambiente neoplásico. Um dos princípios desta teoria defende que as neoplasias malignas tanto são constituídas por células neoplásicas como pelas células do estroma, células do endotélio vascular e células inflamatórias presentes na lesão (Fidler, 2003; Wever *et al.*, 2008; Quail & Joyce, 2013). O comportamento das células neoplásicas é bastante oportunista uma vez que utiliza o meio em seu próprio benefício, promovendo o crescimento, sobrevivência, angiogénese, invasão e metastização (Fidler, 2003). Hoje está definido como um dos *hallmark of cancer* as propriedades invasivas tumorais, devido a estudos que focaram a ação nociva do microambiente. (Hanahan & Weinberg, 2000; Hanahan, & Weinberg, 2011).

Os *hallmarks of cancer* foram propostos para englobar e organizar os complexos e enormes avanços realizados no âmbito da oncologia. Dividiram-se seis eventos biológicos presentes no processo aquando o desenvolvimento tumoral. Incluem: a sinalização e proliferação sustentável; os supressores da invasão e do crescimento, resistência à morte celular, evasão aos supressores do crescimento, morte celular de células em repouso, capacidade de replicação imortal ou infundável, indução da angiogénese, e ativação da invasão e metastização (*sustaining proliferative signalling, evading growth su ressors, resisting cell death, enabling replicative immortality, inducing angiogenesis, e activating invasion and metastasis*). Este artigo,

acrescentou mais estratos de complexidade, reconhecendo o comportamento de “recrutamento” de células vizinhas normais (principalmente do estroma) que contribuem para a aquisição de características-chaves dos *Hallmarks*, demonstrando desta forma uma associação complexa favorável entre o desenvolvimento neoplásico e as células vizinhas, este ambiente próprio denominado de microambiente tumoral (Hanahan & Weinberg, 2000; Hanahan, & Weinberg, 2011). As propriedades invasivas tumorais em AEG's foram um dos nossos focos de estudo e tanto os miofibroblastos como a TEM são considerados fatores que contribuem diretamente para o carácter agressivo tumoral.

As células neoplásicas são alvo de variações fenotípicas e genotípicas com potencial para invadir o tecido vizinho e ainda desenvolver o fenómeno de metastização, contudo hoje em dia é em geral, aceite pela comunidade científica de que, isoladamente, as células neoplásicas dificilmente completam o processo de metastização. É necessário uma orquestra de mediadores e sinalizadores bioquímicos a atuar em conjunto para a propagação do tumor primário; este evento pode ser mediado através de células do sistema imunitário, células do próprio estroma e alterações bioquímicas da matriz extracelular (Hanahan & Weinberg, 2000; Hanahan & Weinberg, 2011; Sleeman, 2012). A matriz extracelular é constituída por um conjunto interligado de macromoléculas que, além do suporte físico, promovem a progressão neoplásica através da degradação da própria matriz (Xu *et al.*, 2001; Kishaba *et al.*, 2010).

No processo de invasão as células neoplásicas conseguem migrar, começando pela degradação da membrana basal e com processos que induzem a remodelação da matriz extracelular. O crescimento neoplásico é assegurado através do suporte sanguíneo e pela neovascularização. As próprias células imunitárias presentes no local alteram o seu comportamento em relação às células neoplásicas e passam a excretar fatores pró-tumorais. Assim, as características agressivas das células neoplásicas são suportadas por um conjunto de fatores e pelas células presentes no meio ambiente tumoral (Wever *et al.*, 2008; Alphonso & Alahari, 2009; Quail & Joyce, 2013).

Um dos fatores intervenientes nas neoplasias é o fator de transformação de crescimento beta (TGF $\beta$ ), que também facilita a progressão tumoral, promove uma série de eventos e alterações na formação de miofibroblastos, estimula e controla as células do sistema imunitário e está associado com processos de TEM (Papageorgis & Stylianopoulos, 2015). O TGF- $\beta$  é

considerado o principal indutor de transformação de fibroblastos para CAFs (Veirman *et al.*, 2014). O trabalho de Machado (2016) mostrou que o recetor 1 do TGF  $\beta$  está aumentado em situações de AEG's, mais predominante no estroma, semelhante á correlação positiva descrita em ensaios com foco em neoplasias em humanos, utilizando ratos como modelo, que relaciona positivamente miofibroblastos e o TGF $\beta$ , contribuindo para um microambiente neoplásico específico (Lewis *et al* 2004., Scharenberg *et al.*, 2014).

Observámos, nas nossas amostras, principalmente de AEG's, células do sistema imunitário em quantidades variáveis, nomeadamente neutrófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos concomitantemente com células tumorais, à semelhança do estudo de Pereira (2013), numa amostra semelhante à nossa de AEG's, na qual o objecto do trabalho foi a avaliação das células do sistema imunitário nestas lesões. Múltiplos trabalhos se debruçam sobre as relações do SI e principalmente dos macrófagos com diferentes lesões neoplásicas, que podem estar intimamente associados ao processo neoplásico, denominados de “macrófagos associados ao tumor” (*Tumor associated macrophages* ou TAM); são células com duas diferentes fases de atuação, numa primeira fase com predomínio de fenótipo M1 claramente com uma ação anti neoplásica e, posteriormente numa segunda fase, exibem um fenótipo M2 com atividade de produção de fatores que beneficia a progressão do tumor (Sica *et al.*, 2006; Beirão *et al.*, 2015; Raposo *et al.*, 2015).

Os macrófagos, podem comportar-se como agentes nocivos para esta; a neoplasia amplifica todos os sinais biológicos e altera o comportamento destes macrófagos, que numa segunda fase vão facilitar o processo neoplásico. Estes macrófagos apresentam várias propriedades, pró-tumorais, entre as quais a indução de angiogénese, mediada por quimocinas, VEGF e TNF. Outra propriedade deste tipo celular é a supressão de imunidade adaptativa. O evento da remodelação da matriz extracelular é efetuada através de fatores de crescimento como o TGF $\beta$ , e de outros componentes, nomeadamente por fatores de crescimento. Por fim, o processo de invasão é acompanhado por metastização, que também é facilitado por via das metaloproteinases, de quimocinas e do TNF (Sica *et al.*, 2006; Pereira, 2013).

Recorrendo à desmina e à alfa actina do músculo liso um dos objectivos deste estudo foi verificar o carácter invaso para miométrio pelos AEG's, sendo esta uma das vias que pode ser mais direta a metastização, através da ruptura da serosa e por implantação das metástases, como

está descrito por outros autores (Sandmeyer *et al.*, 2009; Pires *et al.*, 2013); A invasão pode ser avaliada por hematoxilina e eosina, mas há situações que a sutileza das efrações obriga a maior esforço e experiência do patologista.

Devido à falta de *follow-up* dos casos em estudo, não nos foi possível identificar a existência de metástases à distância nem a evolução dos casos em que observámos invasão muscular, ou efração da serosa, e como tal não temos dados que nos permitam propor fatores de prognóstico; no entanto observámos que a invasão está presente em adenocarcinomas do endométrio da gata, confirmado por estudos já efetuados por Saraiva e colaboradores (2012). A invasão da camada mais profunda do miométrio é menor que os casos que apresentam invasão da camada superficial. Os adenocarcinomas papilares serosos do endométrio da mulheres, são semelhantes a nível histológico e partilham as mesmas características que os por nós observados neste estudo de AEG's, estando descrito em medicina humana que a invasão profunda do miométrio está associada a um pior prognóstico (Frei *et al.*, 2000; Euscher, *et al.*, 2013).

Na nossa série, tivemos um caso em que estava presente a invasão da serosa, e este nível de invasão compromete órgãos presentes na cavidade abdominal. São em geral casos de curso muito rápido com presença de metástases em órgãos como o fígado (Sandmeyer *et al.*, 2009; Pires *et al.*, 2013).

A vasculatura desempenha funções cruciais para a sobrevivência das células e dos tecidos, tanto normais, como em neoplasias, assegurando a nutrição e a oxigenação (Pezzella *et al.*, 2014). Como vimos anteriormente o crescimento neoplásico não depende apenas das propriedades biológicas das células cancerígenas, mas também do estroma e da vascularização neoplásica. A imunoexpressão positiva para alfa-actina do músculo liso em vasos, permite avaliar o comportamento do crescimento neoplásico que pode ditar um carácter mais agressivo da neoplasia. (Gilead & Neeman, 2004).

A vascularização é necessária para o processo de iniciação tumoral maligna e a progressão tumoral, está também relacionado com fatores pro-angiogénicos por parte das células tumorais vizinhas (Gilead *et al.*, 2004; Tonino & Abreu, 2011; Vong & Kalluri, 2011). O microambiente neoplásico favorece a produção de factores pró angiogénicos, e muitos destes fatores como foi mencionado anteriormente podem ser produzidos pelos miofibroblastos e macrófagos associados à neoplasia (Kishaba & Niki, 2010; Vong & Kalluri, 2011).

Há evidências que suportam a existência de uma correlação entre o diâmetro e a intensidade de marcação nos vasos sanguíneos que expressam a alfa-actina do músculo liso o que explica a maior intensidade de marcação por nós observada nos vasos do miométrio (que pertencem ao *stratum* vascular) por apresentarem um maior diâmetro (Morikawa *et al.*, 2002). Pensamos também que esta intensidade de marcação, superior a nível dos vasos do miométrio, possa também ser devida ao aumento do número de células na camada média destes mesmos vasos comparativamente com os vasos do estroma do endométrio felino .

Comparando os dois grupos de marcadores referentes aos adenocarcinomas, obtiveram-se resultados estatísticos significativos referentes, aos vasos do estroma e aos vasos do miométrio. À semelhança do que ocorre noutros estudos, esta diferença de intensidade superior expressa pela alfa-actina pode residir na elevada afinidade deste marcador para as células musculares lisas da camada média dos vasos. A diminuição da expressão de desmina já era esperada uma vez que os filamentos intermédios do tipo III predominantes em células musculares lisas vasculares são os de vimentina e não os de desmina (Gabbiani *et al.*, 1981).

Dos vários fatores indutores de angiogénese que estão envolvidos no processo neoplásico, destaca-se o fator VEGF, que estimula o crescimento de células endoteliais, e sua migração e diferenciação. As células endoteliais desencadeiam uma série de eventos moleculares implicando as células musculares lisas vasculares através factores de crescimento, estes ligam-se com VEGF e com as células da matriz extracelular promovendo angiogénese (Carmeliet, 2000). O trabalho de Alonso (2015) observou imunoexpressão do VEGF com forte intensidade em células endoteliais e do estroma numa série semelhante de AEG's, o que está de acordo com o aparente aumento da intensidade, da alfa actina do músculo liso para as estruturas vasculares observadas nos adenocarcinomas do endométrio no nosso trabalho..

Com intuito de perceber melhor o papel do estroma do endométrio e suas interações com as células neoplásicas dos AEG's, seriam relevantes estudos futuros com a utilização de outros biomarcadores complementares como a caderina-E ou as metaloproteinases de entre outras, com a técnica de imunohistoquímica e outras metodologias de biologia molecular. Os estudos de *follow-up* serão muito úteis para a definição de fatores de prognóstico que, em associação com a caracterização morfológica e imunohistoquímica destas lesões irão permitir, no futuro, desenvolver novas formas de terapia e a melhoria do bem estar destes animais.

No âmbito de uma só saúde, seria interessante propor esta espécie como modelo de estudo deste tipo de lesões, como espécie sentinela relativamente à medicina humana, na medida em que os carcinomas papilares serosos apresentam muitas semelhanças com os adenocarcinomas papilares serosos em mulheres.

Uma vez que o gato é um animal que faz parte das nossas famílias e partilha o nosso ambiente, as gatas poderiam servir como um bom modelo oncológico sentinela contribuindo para uma melhor saúde pública, embora seja muito importante ter em conta as diferenças fisiológicas do trato reprodutor destas duas espécies (Schmidt, 2009; Reif, 2011).

## 5 Conclusão

Devido à falta de *follow-up* dos casos em estudo, a avaliação da invasão do miométrio é limitada à observação histológica. Conclusões mais sólidas e a sua associação com o prognóstico assim como a atribuição de um eventual estadiamento com base na invasão e metastização ainda não são possíveis nem uma realidade próxima numa parte dos estudos para a medicina veterinária contrastando com a medicina humana. Contudo os objetivos principais deste trabalho foram obtidos.

Os marcadores de citoesqueleto estudados, alfa-actina do músculo liso e desmina, específicos para tecidos humanos, são ambos válidos nos tecidos de gata. No entanto, a desmina revelou ser o marcador de eleição para a identificação de invasão do miométrio, pois permite realizar um diagnóstico simples e preciso aquando da avaliação em casos de adenocarcinoma endométrico em gatas.

Os úteros da fase proliferativa e da fase secretora apresentam marcação positiva do miométrio para ambos os marcadores e embora estas proteínas sejam diferentes bioquimicamente, são sobreponíveis para a marcação de células musculares lisas do trato genital de gata.

Devido à especificidade para músculo liso vascular a alfa-actina marca de forma positiva e intensa os vasos em adenocarcinomas do endométrio da gata, bem como nos grupos normais (na fase secretora e na fase proliferativa). Assim a alfa-actina pode ser considerado um marcador proveitoso em estudos futuros sobre a vascularização do endométrio da gata.

A alfa-actina apresenta uma expressão positiva mais intensa no estroma dos AEG's que nos casos de útero normais, indicando muito provavelmente que estas células sejam miofibroblastos.

Este estudo, à semelhança de outras investigações efetuadas no mesmo grupo de trabalho do CECAV/UTAD/LHAP, sugere fortemente a presença de um processo de transição epitelial mesenquimatosa, uma vez que as proteínas desmina e alfa-actina são expressas pelas células epiteliais neoplásicas.

A falta de dados clínicos não nos permite fazer a associação para a espécie felina, contudo há que salientar o papel importante que o estroma desempenha em situações de doença

neoplásica. Este estudo permitiu reforçar a ideia que o tumor não é apenas constituído por células neoplásicas propriamente ditas mas também da sua associação a um conjunto de alterações do microambiente das quais se incluem as células estroma, incluindo vasos e a matriz extra celular que, através da libertação de fatores de crescimento de entre outros sinalizadores, produzidos pelas células da matriz, do estroma, neoplásicas e também por células do sistema imunitário são indispensáveis para o crescimento, invasão e possivelmente, ditam também a capacidade de metastização e promoção de tumores secundários em órgãos distantes destas neoplasias.

Séries mais completas, com dados clínicos, *followup* e com metodologias complementares de biologia molecular seriam muito úteis para conseguir aumentar o espectro de conclusões sobre o comportamento destes adenocarcinomas.

Os avanços têm sido feitos no estudo desta neoplasia especialmente na área da imunohistoquímica, com a caracterização morfológica destas lesões. Porém existe ainda uma grande falta de informação relativamente a esta doença.

Seria interessante utilizar as mesmas séries e comparar os estudos já efetuados com outros fatores e enzimas que interferem no microambiente, como por exemplo as metaloproteinases, e a caderina-E nas interações celulares neoplásicas.

A compreensão da expressão da sinalização do estroma e do microambiente neoplásico será um passo muito importante para a contribuição da biologia tumoral dos adenocarcinomas do endométrio das gatas.

A comparação destes estudos entre espécies, poderá ser no futuro uma forma útil de avanços bioquímicos e tecnológicos. Os AEG's da gata poderão eventualmente ser propostos como modelo de estudo para os tumores papilares serosos do endométrio da mulher, dado as suas semelhanças morfológicas e bioquímicas de alguns fatores já estudados, salvaguardando no entanto sempre, as diferenças fisiológicas entre as espécies.

## 6 Referências bibliográficas

- Abreu, M. (2015) Estudo da expressão molecular de Vimentina, Colagénio e Citoqueratina 14 em adenocarcinomas do endométrio felino. UTAD- Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro. Vila Real.
- Akashi, T., Minami, J., Ishige, Y., Eishi, Y., Takizawa, T., Koike, M., *et al.*, (2005). Basement membrane matrix modifies cytokine interactions between lung cancer cells and fibroblasts. *Pathobiology*, 72(5), 250-259.
- Alexander-Sefre, F., Singh, N., Ayhan, A., Thomas, J. M., & Jacobs, I. J. (2004). Assessment of the depth of myometrial invasion in stage I endometrioid endometrial cancer using pancytokeratin immunohistochemistry. *International Journal of Gynecological Cancer*, 14(4), 665-672.
- Ali, A., Black, D., & Soslow, R. (2007). Difficulties in assessing the depth of myometrial invasion in endometrial carcinoma. *International journal of gynecological pathology*, 26(2), 115-123.
- Alonso, R., (2015) Estudo da expressão imuno histoquímico do VEGF em útero normal e no adenocarcinoma do endométrio de gata. UTAD- Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro. Vila Real.
- Alphonso, A., & Alahari, S. (2009). Stromal cells and integrins: conforming to the needs of the tumor microenvironment. *Neoplasia*, 11(12), 1264-1271.
- Arentz, G., Chataway, T., Price, T., Izwan, Z., Hardi, G., Cummins, A , *et al.*, (2011). Desmin expression in colorectal cancer stroma correlates with advanced stage disease and marks angiogenic microvessels. *Clinical proteomics*, 8(1), 1.
- Augsten, M. (2014). Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Frontiers in oncology*, 4, 62.
- Ballardini, G., Fallani, M., Biagini, G., Bianchi, F, & Pisi, E. (1988). Desmin and actin in the identification of Ito cells and in monitoring their evolution to myofibroblasts in experimental liver fibrosis. *Virchows Archiv B*, 56(1), 45-49.
- Banks, D., & Stabenfeldt, G. (1982). Luteinizing hormone release in the cat in response to coitus on consecutive days of estrus. *Biology of Reproduction*, 26:603-611.

Beirão, B., Raposo, T., Pang, L., & Argyle, J. (2015). Canine mammary cancer cells direct macrophages toward an intermediate activation state between M1/M2. *BMC veterinary research*, 11(1), 151.

Bertolaso, M. (2009). The Neoplastic Process and the Problems with the Attribution of. In *Rivista di Biologia/Biology Forum* (102, 273-296).

Bird, C. C., & Willis, R. (1965). The production of smooth muscle by the endometrial stroma of the adult human uterus. *Pathology and bacteriology*, 90(1), 75-81.

Bond, M., and Somlyo, A. (1982) Dense bodies and actin polarity in vertebrate smooth muscle. (1982). *Cell Biology*, 95(2), 403–413.

Boronow R, Morrow C, Creasman WT, *et al.*, (1984) surgical staging in endometrial cancer: clinical-pathologic findings of a prospective study. *Obstetrics & Gynecology*; 63: 825–832

Brown, J. (2011). Female reproductive cycles of wild female felids. *Animal reproduction science*, 124(3), 155-162.

Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine*, 6(4), 389-396.

Cekanova, M., & Rathore, K. (2014). Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. *Drug design, development and therapy*, 8.

Chatdarong, K., Rungsipipat, A., Axné, E., & Forsberg, C. (2005). Hysterographic appearance and uterine histology at different stages of the reproductive cycle and after progestagen treatment in the domestic cat. *Theriogenology*, 64(1), 12-29

Cho, S, Lee, H., Hong, S., Kim, O. (2011). Uterine adenocarcinoma with feline leukaemia virus infection. *Laboratory Animal Research*. 27(4):347-351.

Christensen, S., Verhage, H., Nowak, G., De Lanerolle, P., Fleming, S., Bell, S. C., *et al.*, (1995). Smooth muscle myosin II and alpha smooth muscle actin expression in the baboon (*Papio anubis*) uterus is associated with glandular secretory activity and stromal cell transformation. *Biology of reproduction*, 53(3), 598-608.

Cintorino, M., De-Marco, E., Leoncini, P., Tripodi, S., Ramaekers, F., Sano, A., *et al* G. (1991). Expression of  $\alpha$ -smooth-muscle actin in stromal cells of the uterine cervix during epithelial neoplastic changes. *International journal of cancer*, 47(6), 843-846.

Cirri, P., & Chiarugi, P. (2011). Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *American journal of cancer research*, 1(4), 482.

Cooper, G. 2000. The Cell: A Molecular Approach. Intermediate Filaments. 2Ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates

Costa, M., Escaleira, R., Cataldo, A., Oliveira, F., & Mermelstein, C. (2004). Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein. *Brazilian journal of medical and biological research*, 37(12), 1819-1830.

Davis, J., & Molkenstein, J. D. (2014). Myofibroblasts: trust your heart and let fate decide. *Molecular and cellular cardiology*, 70, 9-18.

De Craene B, Berx G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature Reviews Cancer*.; 13:97–110.

De Veirman, K., Rao, L., De Bruyne, E., Menu, E., Van Valckenborgh, E., Van Riet, I., et al., (2014). Cancer Associated Fibroblasts and Tumor Growth: Focus on Multiple Myeloma. *Cancers*, 6 (3), 1363–1381.

De Vico, G., & Maiolino, P. (2008). Canine and Feline Models for Cancer. Sourcebook of Models for Biomedical Research, . 677-682. Humana Press Inc., Totowa, NJ

De Wever, O., Demetter, P., Mareel, M., & Bracke, M. (2008). Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *International journal of cancer*, 123(10), 2229-2238.

Debus, E., Weber, K., & Osborn, M. (1983). Monoclonal antibodies to desmin, the muscle-specific intermediate filament protein. *EMBO*, 2(12), 2305.

Ding, L., Zhang, Z., Shang, D., Cheng, J., Yuan, H., Wu, Y., et al., (2014).  $\alpha$ -Smooth muscle actin-positive myofibroblasts, in association with epithelial – mesenchymal transition and lymphogenesis, is a critical prognostic parameter in patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *Oral Pathology & Medicine*, 43(5), 335-343.

Diokmetzidou, A., Tsikitis, M., Nikouli, S., Kloukina, I., Tsoupri, E., Papathanasiou, S., et al., (2016). Chapter Fifteen-Strategies to Study Desmin in Cardiac Muscle and Culture Systems. *Methods in enzymology*, 568, 427-459.

Eberhard, A.; Kahlert, S.; Goede, V.; Hemmerlein, B.; Plate, K.; Augustin, H. (2000) Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: Implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer research*. 160, 1388-1393.

Euscher, E., Fox, P., Bassett, R., Al-Ghawli, H., Ali-Fehmi, R., Barbuto, D, *et al.*, (2013). The Pattern of Myometrial Invasion as a Predictor of Lymph Node Metastasis or Extrauterine Disease in Low Grade Endometrial Carcinoma. *The American journal of surgical pathology*, 37(11), 1728.

Fatet, A., Pellicer-Rubio, M., & Leboeuf, B. (2011). Reproductive cycle of goats. *Animal reproduction science*, 124(3), 211-219.

Feldman C and Nelson W., (2004). Feline reproduction. In: Feldman EC and Nelson RW (Eds.) Canine and Feline Endocrinology and Reproduction, 3rd Ed., 1016-1043. Saunders, Elsevier, St. Louis, Missouri.

Fidler, I. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the seed and soil hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 453-458.

Fontbonne, A., & Garnier, F. (1998). Données récentes en physiologie et endocrinologie sexuelles dans l'espèce féline. *Point vétérinaire*, 29(195), 11-16.

Foster R (2007). Female reproductive system. In: McGavin MD and Zachary JF (Eds.), Pathologic Basis of Veterinary Disease, 4th Ed., . 1263-1317. Mosby / Elsevier, St. Louis, Missouri.

Franquemont, D., Frierson, F., & Mills, E. (1991). An immunohistochemical study of normal endometrial stroma and endometrial stromal neoplasms: evidence for smooth muscle differentiation. *The American journal of surgical pathology*, 15(9), 861-870.

Frei, K., Kinkel, K., Bonél, H, Lu, Y., Zaloudek, C., & Hricak, H. (2000). Prediction of Deep Myometrial Invasion in Patients with Endometrial Cancer: Clinical Utility of Contrast-enhanced MR Imaging-A Meta-analysis and Bayesian Analysis 1. *Radiology*, 216(2), 444-449.

Frisch, S., & Francis, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *Cell biology*, 124(4), 619-626

Fuchs, E.; Weber, K. (1994) Intermediate filaments: Structure, dynamics, function, and disease. *Annual review of biochemistry*, 63, 345-382.

Fuxe, J., & Karlsson, M. C. (2012, October). TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition: a link between cancer and inflammation. *Seminars in cancer biology*

Gabbiani, G., Schmid, E., Winter, S., Chaponnier, C., De Ckhashtonay, C., Vandekerckhove, J., & Franke, W. W. (1981). Vascular smooth muscle cells differ from other

smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(1), 298-302.

Geels, Y. P., Pijnenborg, J. M. A., van den Berg-van Erp, S. H. M., Snijders, M. P. M. L., Bulten, J., & Massuger, L. F. A. G. (2013). Absolute depth of myometrial invasion in endometrial cancer is superior to the currently used cut-off value of 50%. *Gynecologic oncology*, 129(2), 285-291.

Geisler, F., & Leube, R. (2016). Epithelial Intermediate Filaments: Guardians against Microbial Infection?. *Cells*, 5(3), 29.

Geisler, N., & Weber, K. (1981). Comparison of the proteins of two immunologically distinct intermediate-sized filaments by amino acid sequence analysis: desmin and vimentin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(7), 4120-4123.

Geisler, N., Kaufmann, E., & Weber, K. (1982). Proteinchemical characterization of three structurally distinct domains along the protofilament unit of desmin 10 nm filaments. *Cell*, 30(1), 277-286.

Getty, Robert, Sisson, Septimus; Grossman, James Daniels. Aparelho urogenital. In Sisson/Grossman Anatomia dos Animais Domésticos (1986). 5. Ed. Koogan, capítulo 65, 2º volume. Rio de Janeiro: Guanabara.

Giancotti, F., & Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science*, 285 (5430), 1028-1033.

Gil da Costa, R., Santos, M., Amorim, I., Lopes, C., Pereira, P., & Faustino, A. (2009). An immunohistochemical study of feline endometrial adenocarcinoma. *Comparative pathology*, 140(4), 254-259.

Gilead, A., Meir, G., & Neeman, M. (2004). The role of angiogenesis, vascular maturation, regression and stroma infiltration in dormancy and growth of implanted MLS ovarian carcinoma spheroids. *International journal of cancer*, 108(4), 524-531.

Goicoechea, S., Garcia-Mata, R., Staub, J., Valdivia, A., Sharek, L., McCulloch, C., *et al.*, (2014). Palladin promotes invasion of pancreatic cancer cells by enhancing invadopodia formation in cancer-associated fibroblasts. *Oncogene*, 33(10), 1265.

Goldman, R., Khuon, S., Chou, Y. H., Opal, P., & Steinert, M. (1996). The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *Cell biology*, 134(4), 971-983.

Goodrowe, K., Hay, M., & King, W. (1991). Nuclear maturation of domestic cat ovarian oocytes in vitro. *Biology of reproduction*, 45(3), 466-470

Gumber, S., Stovall, M., Owens, D., Davis, J. N., & Crane, M. M. (2015). Pathology in Practice. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 247(6), 615-617.

Gunst, S., & Zhang, W. (2008). Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction. *Cell Physiology*, 295(3), C576-C587.

Gurzu, S., Turdean, S., Kovacs, A., Contac, A. O., & Jung, I. (2015). Epithelial-mesenchymal, mesenchymal-epithelial, and endothelial-mesenchymal transitions in malignant tumors: An update. *World journal of clinical cases*, 3(5), 393-404.

Hanahan, D., & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.

Hanley, C., Mellone, M., Thomas, G. (2016). Abstract B15: Targeting NOX4 in the tumor microenvironment inhibits myofibroblast differentiation and suppresses tumor progression. *Cancer Research*, 76(15 Supplement), B15-B15.

Heckmann, M., Bauer, R., Jungmann, A., Winter, L., Rapti, K., Strucksberg, K., *et al.*, (2016). AAV9-mediated gene transfer of desmin ameliorates cardiomyopathy in desmin-deficient mice. *Gene therapy*.

Helfand, B., Chang, L., & Goldman, R. (2004). Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *Cell science*, 117(2), 133-141.

Hendrickson, M., Ross, J., Eifel, P., Martinez, A., & Kempson, R. (1982). Uterine papillary serous carcinoma: a highly malignant form of endometrial adenocarcinoma. *The American journal of surgical pathology*, 6(2), 93-108.

Herrmann, H., Strelkov, S. V., Burkhard, P., & Aebi, U. (2009). Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *The Journal of clinical investigation*, 119(7), 1772-1783.

Hinz, B., Gabbiani, G., Chaponnier, C. (2002). The NH2-terminal peptide of  $\alpha$ -smooth muscle actin inhibits force generation by the myofibroblast in vitro and in vivo. *The Journal of cell biology*, 157(4), 657-663.

Hong, J., Song, C., Shin, Y., Kim, H., Cho, S., Kim, W., *et al.*, (2004). Estrogen induction of smooth muscle differentiation of human prostatic stromal cells is mediated by transforming growth factor- $\beta$ . *The Journal of urology*, 171(5), 1965-1969.

Horn L, Meinel A, Handzel R, Einenkel J (2007). Histopathology of endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma – an update. *Annals of Diagnostic Pathology*. 11(4):297-311.

Huang R, Guilford P, Thiery (2012) JP. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *Cell Sci.*; 125:4417–4422

Hurni, H. (1981). Daylength and breeding in the domestic cat. *Laboratory animals*, 15(3), 229-233.

Johnston, S., Kustritz, M., Olson, P. (2001). Disorders of the feline uterus and uterine tubes (oviducts). *Canine and Feline Theriogenology*. 470. Saunders, London.

Junqueira LC e Carneiro L (2004). Aparelho reprodutor feminino. In: *Histologia Básica, Texto e Atlas*, 10 Ed., 432-452. Guanabara / Koogan, Rio de Janeiro.

Kalluri, R., & Weinberg, R. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1420-1428.

Kawabata, A., Del Piero, F., Caserto, B., & Langohr, I. (2016). Metastatic Leiomyosarcoma Causing Ataxia in a Horse. *Journal of Equine Veterinary Science*, 43, 23-27.

Kennedy, P., Cullen, J., Edwards, J., Goldshmidt, M., Larsen S, Munson, L., Nielsen, S (1998). Histological classification of tumors of the genital system of domestic animals. Armed Forces Institute of Pathology in cooperation with the American Registry of Pathology and The World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference, Comparative Oncology 32. Washington, DC.

Kessenbrock, K., Plaks, V., & Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, 141(1), 52-67.

Kim H, A., Vetterkind, G. Morgan, K. Smooth muscle signaling pathways in health and disease. *Cell Mol Med*. 2008; 12:2165-80.

Kim, S., Turnbull, J., Guimond, S. (2011). Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *Journal of Endocrinology*, 209(2), 139-151.

Kishaba, Y., Matsubara, D., Niki, T. (2010). Heterogeneous expression of nestin in myofibroblasts of various human tissues. *Pathology international*, 60(5), 378-385.

Kiss, B., Röhlich, P., Kellermayer, M. S. (2011). Structure and elasticity of desmin protofibrils explored with scanning force microscopy. *Journal of Molecular Recognition*, 24(6), 1095-1104.

Klein MK (2007). Tumours of the female reproductive system: uterine tumours. In: Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology (4 Ed), 613-614. Withrow S and Vail D (Eds.), Saunders/Elsevier Health Sciences, St Louis, Missouri.

Klymkowsky, M., Savagner, P. (2009). Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *The American journal of pathology*, 174(5), 1588-1593.

Kutzler, M. (2007). Estrus induction and synchronization in canids and felids. *Theriogenology*, 68:354- 374.

Lamouille, S., Xu, J., Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(3), 178.

Larson, D., Connor, G., Broste, S, Krawisz, B., & Johnson, K., (1996). Prognostic significance of gross myometrial invasion with endometrial cancer. *Obstetrics & Gynecology*, 88(3), 394-398.

Lazarides, E. (1980). Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature*, 283(5744), 249-256.

LeRoy, B., & Northrup, N. (2009). Prostate cancer in dogs: comparative and clinical aspects. *The Veterinary Journal*, 180(2), 149-162.

Levental, K., Yu, H., Kass, L., Lakins, J., Egeblad, M., Erler, J., *et al.*, (2009). Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*, 139(5), 891-906.  
Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine*, 19(11), 1423-1437.

Lewis, M. P., Lygoe, K. A., Nystrom, M. L., Anderson, W. P., Speight, P. M., Marshall, J. F., & Thomas, G. J. (2004). Tumour-derived TGF- $\beta$ 1 modulates myofibroblast differentiation and promotes HGF/SF-dependent invasion of squamous carcinoma cells. *British Journal of Cancer*, 90(4), 822-832. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601611>

Li, Z., Lilienbaum, A., Butler-Browne, G., Paulin, D. (1989). Human desmin-coding gene: complete nucleotide sequence, characterization and regulation of expression during myogenesis and development. *Gene*, 78(2), 243-254.

Li, Z., Parlakian, A., Gao-Li, J., Mericskay, M., Agbulut, O. (2015). Desmin Plays Dual Structural and Regulatory Functions through Its Interaction with Partners in Muscle. In *The Cytoskeleton in Health and Disease* ( . 241-280)

Liman, N., Alan, E., Bayram, G., Gürbulak, K. (2013). Expression of survivin, Bcl-2 and Bax proteins in the domestic cat (*Felis catus*) endometrium during the oestrus cycle. *Reproduction in Domestic Animals*. 48(1):33-45.

Lourenço, L. (2008). Protocolos de rotina do laboratório de histologia e anatomia patológica. UTAD. 1-Ed, Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro. Vila Real.

Lyall, F., Robson, S. C., & Bulmer, J. (2013). Spiral artery remodeling and trophoblast invasion in preeclampsia and fetal growth restriction relationship to clinical outcome. *Hypertension*, 2 (6), 1046-1054.

Macedo.J.(2016)Estudo da marcação de queratinas 8- 18 em útero normal, nas hiperplasias quística se nos adenocarcinomas do emdométrio de gata. UTAD- Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro. Vila Real.

Machado (2016) Estudo da expressão do Fator de Transformação de Crescimento (TGF- $\beta$ 1) e do seu recetor 1 no útero de Gata e em lesões do mesmo. UTAD- Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro. Vila Real.

Maguer-Satta, V., Besançon, R., Bachelard-Cascales, E. (2011). Concise review: neutral endopeptidase (CD10): a multifaceted environment actor in stem cells, physiological mechanisms, and cancer. *Stem Cells*, 29(3), 389-396.

Malandain, P., Rault, D., Froment, E., Baudon, S., Begon, D., Chastant-Mallard. 2006) S. Croissance folliculaire et ovulation chez la chatte.

Malpaux, B., Viguie, C., Skinner, D. C., Thierry, J. C., Pelletier, J., & Chemineau, P. (1996). Seasonal breeding in sheep: mechanism of action of melatonin. *Animal reproduction science*, 42(1), 109-117.

Margiotta, A., & Bucci, C. (2016). Role of Intermediate Filaments in Vesicular Traffic. *Cells*, 5 (2), 20.

Martin, T., Ye L, Sanders, A., Lane, J., Jiang W. (2000) Cancer invasion and metastasis: molecular and cellular perspective. In: Jandial R Madame Curie Bioscience Database.

Miettinen, M., & Lasota, J. (2001). Gastrointestinal stromal tumors—definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Archiv*, 438(1), 1-12.

Miller, A., Ramos-Vara, J., Dickerson, M., Johnson, G., Pace, L., Kreeger, J., *et al.* (2003). Uterine neoplasia in 13 cats. *Veterinary diagnostic investigation*, 15(6), 515-522.

Mirantes, C., Espinosa, I., Ferrer, I., Dolcet, X., Prat, J., & Matias-Guiu, X. (2013). Epithelial-to-mesenchymal transition and stem cells in endometrial cancer. *Human pathology*, 44(10), 1973-1981.

Moll, R., Franke, W., Schiller, D., Geiger, B., Krepler, R. (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31(1), 11-24.

Monaghan, H., MacWhinnie, N., Williams, A. (2007). The role of matrix metalloproteinases-2,-7 and-9 and  $\beta$ -catenin in high grade endometrial carcinoma. *Histopathology*, 50(3), 348-357.

Morikawa, Shunichi . “Abnormalities in Pericytes on Blood Vessels and Endothelial Sprouts in Tumors.” *The American Journal of Pathology* 160.3 (2002): 985–1000.

Morris J., Dobson J (2001). Genital tract: uterus and cervix. In: Small Animal Oncology, Wiley-Blackwell, Oxford, London, . 169-171.

Nagy, P., Guillaume, D., Daels, P. (2000). Seasonality in mares. *Animal Reproduction Science*, 60, 245-262

Naumov, G., MacDonald, I., Weinmeister, P., Kerkvliet, N., Nadkarni, K., Wilson, S., *et al.*, (2002). Persistence of solitary mammary carcinoma cells in a secondary site a possible contributor to dormancy. *Cancer research*, 62(7), 2162-2168.

Niikura, H., Okamoto, S., Yoshinaga, K., Nagase, S., Takano, T., Ito, K., *et al.*, (2007). Detection of micrometastases in the sentinel lymph nodes of patients with endometrial cancer. *Gynecologic oncology*, 105 (3), 683-686.

Orimo, A., Gupta, P., Sgroi, D., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., *et al.*, (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, 121(3), 335-348.

O'Shea, J., Robson, R., Hartzer, M., Huiatt, T., Rathbun, W., & Stromer, M. (1981). Purification of desmin from adult mammalian skeletal muscle. *Biochemical Journal*, 195(2), 345-356.

Paape, S., Shille, V., Seto, H., Stabelfeldt, G.H. (1975). Luteal activity in the pseudopregnant cat. *Biology of Reproduction*, 13:470-474.

Pageorgis, P., & Stiylianopoulos, T. (2015). Role of TGF $\beta$  in regulation of the tumor microenvironment and drug delivery (Review). *International Journal of Oncology*, 46(3), 933-943. <http://doi.org/10.3892/ijo.2015.2816>

Parry, D., & Steinert, P. (1999). Intermediate filaments: molecular architecture, assembly, dynamics and polymorphism. *Quarterly reviews of biophysics*, 32(02), 99-187.

Patterson, M. M., Rogers, A. B., Schrenzel, M. D., Marini, R. P., & Fox, J. G. (2003). Alopecia attributed to neoplastic ovarian tissue in two ferrets. *Comparative medicine*, 53(2), 213-217.

Paulin, D., & Li, Z. (2004). Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Experimental cell research*, 301(1), 1-7.

Payan-Carreira R., Alvura N., Graça J., Pires M. (2013) Bilateral Primary Ovarian Leiomyoma in A Lion (*Panthera leo*). *Pathology Research*, ISSN: 0976-8068 & E-ISSN: 0976-8076, 2,1.-024-029.

Payan-Carreira, R., Saraiva, A., Santos, T., Vilhena, H., Sousa, A., Santos, C., *et al.*, (2013). Feline endometrial adenocarcinoma in females < 1 year old: a description of four cases. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(5), e70-e77.

Peinado, H., Olmeda, D., Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?. *Nature Reviews Cancer*, 7(6), 415-428.

Pereira, M. (2013). Comparison of macrophages and lymphocytes in non-diseased endometrium and feline endometrial adenocarcinomas. UTAD- Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro. Vila Real.

Petersen Amanda, (2015). *Reproductive physiology of the female cat*. First cycle, G2E., Dept. of Anatomy, Physiology and Biochemistry. U sala: SLU

Pezzella, F., & Harris, A. (2014). When cancer co-opts the vasculature. *New England Journal of Medicine*, 370(22), 2146-2147.

Pietras K., Pahler J., Bergers G., Hanahan D. (2008); Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *Plos Medicine* 5: e19.

Pietras, K., & Östman, A. (2010). Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Experimental cell research*, 316(8), 1324-1331.

Pinho, S., Carvalho, S., Cabral, J., Reis, C., & Gärtner, F. (2012). Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. *Translational Research*, 159(3), 165-172.

Pires, M., & Payan-Carreira, R. (2015). Resident Macrophages and Lymphocytes in the Canine Endometrium. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(5), 740-749.

Pires, M., Coelho, A.C., Palmeira, C., Cardoso, M.N., Seixas, F. e Rodrigues, J. (2010). *Protocolos de Imunologia*. 49-55.

Pires, M., Vilhena, H., Miranda S., Pereira M, Seixas, F., Saraiva A (2016) *Insights from animal reproduction*. 10 DOI: 10.5772/62788

Pires, M.; Saraiva, A.; Vilhena, H.; Miranda, S.; Fonseca, I.; Moreira, P., et al (2013) Endometrial adenocarcinoma in a cat with abdominal metastasis *Comparative Pathology*. 148 (1):67

Pope, C. (2000). Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology*, 53(1), 163-174.

Porrello, A., Cardelli, P., Spugnini, E. (2006). Oncology of companion animals as a model for humans. An overview of tumor histotypes. *Experimental & clinical cancer research*., 25(1), 97-105.

Quail, D., & Joyce, J. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine*, 19(11), 1423-1437.

Radi, Z. (2005). Vulvar lipoleiomyoma in a dog. *Veterinary diagnostic investigation*, 17(1), 89-90.

Radisky, D., Kenny, P., Bissell, M. (2007). Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT?. *Cellular biochemistry*, 101(4), 830-839.

Raj, S., & Chitrathara, K. (2015). Endometrial Cancer Staging. In *Uterine Cancer Diagnosis and Treatment*. Part III ( . 169-178). Springer India.

Rao, B., Malathi, N., Narashiman, S., Rajan, S. (2014). Evaluation of myofibroblasts by expression of alpha smooth muscle actin: a marker in fibrosis, dysplasia and carcinoma. *Clinical and diagnostic research: JCDR*, 8(4), ZC14.

Raposo, T., Pires, I., Carvalho, M., Prada, J., Argyle, D., Queiroga, F. (2015). Tumour-associated macrophages are associated with vascular endothelial growth factor expression in canine mammary tumours. *Veterinary and comparative oncology*, 13(4), 464-474.

Rehman, K., Yin, S., Mayhew, B., Word, R., & Rainey, W. (2003). Human myometrial adaptation to pregnancy: cDNA microarray gene expression profiling of myometrium from non-pregnant and pregnant women. *Molecular human reproduction*, 9(11), 681-700.

Reif, J. (2011). Animal sentinels for environmental and public health. *Public Health Reports*, 50-57.

Rhim, A., Mirek, E., Aiello, N., Maitra, A., Bailey, J., McAllister, F., *et al.*,(2012). EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*, 148(1), 349-361.

Risso, A., Corrada, Y., Barbeito, C., Diaz, J. D., Gobello, C. (2012). Long-Term-Release GnRH Agonists Postpone Puberty in Domestic Cats. *Reproduction in domestic animals*, 47(6), 936-938.

Robinson, R. & Sawyer, C. (1987). Hypothalamic control of ovulation and behavioral estrus in the cat. *Brain Research* 418, 41-51.

Ruan, W., & Lai, M. (2007). Actin, a reliable marker of internal control?. *Clinica Chimica Acta*, 385(1), 1-5

Samuelson D. (2007), female reproductive system, 1st edn, in: Textbook of Veterinary Histology. St. Louis, MI: Saunders Elsevier, 63146.

Sanders, K. M., Ward, S. M., & Koh, S. D. (2014). Interstitial cells: regulators of smooth muscle function. *Physiological reviews*, 94(3), 859-907

Sandmeyer, L., Cosford, K., Grahn, B. (2009). Metastatic carcinoma in a cat. *The Canadian Veterinary Journal*, 50(1), 95.

- Saraiva, A. (2015). Contribution to the study of feline endometrial adenocarcinomas. *ICBAS. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar*
- Saraiva, A., Payan-Carreira, R., Gärtner, F., & Pires, M. (2012). Feline endometrial adenocarcinomas. *CECAV-Centro de Ciência Animal e Veterinária*.
- Scharenberg, M., Pippenger., Sack, R., Zingg, D., Ferralli, J., Schenk, S., *et al.*,(2014). TGF- $\beta$ -induced differentiation into myofibroblasts involves specific regulation of two MKL1 isoforms. *Cell Science*,127(5), 1079-1091.
- Schlafer, D & Foster, A. Female genital system. In: Maxie GM, ed. Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol 3. 6-Ed. St. Louis, MO: Elsevier; 2016
- Schliwa, M., & Van Blerkom, J. (1981). Structural interaction of cytoskeletal components. *Cell Biology*, 90(1), 222-235.
- Schmidt, P. (2009). Companion animals as sentinels for public health. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 39(2), 241-250.
- Selam, B., Kayisli, U., Garcia-Velasco, J., Arici, A. (2002). Extracellular matrix-dependent regulation of Fas ligand expression in human endometrial stromal cells. *Biology of reproduction*, 66(1), 1-5.
- Serakides, R., Sant-Ana, F., Carneiro, R., Lavalle, G. (2000). Pulmonary and renal leiomyosarcoma in dog: a case report. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 52 (6), 599-603.
- Shille, V., Lundstrom, K., Stabenfeldt, G. (1979) Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol-17 $\beta$  concentrations in plasma: relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. *Biology of Reproduction*, 21(4), 953-963.
- Shille, V., Munrot, C., Farmer, S., Papkoff, H., Stabenfeld, G. H. (1983). Ovarian and endocrine responses in the cat after coitus. *Reproduction and fertility*, 69(1), 29-39.
- Sica, A., Schio, T., Mantovani, A., Allavena, P.(2006) Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarized population promoting tumour progression: potential targets of anticancer therapy. *European Journal of Cancer*, 42, 717-727.
- Sinn, M., Denkert, C., Striefler, J., Pelzer, U., Stieler, J., Bahra, M., *et al.*,(2014).  $\alpha$ -Smooth muscle actin expression and desmoplastic stromal reaction in pancreatic cancer: Results from the CONKO-001 study. *British journal of cancer*, 111(10), 1917-1923.

Skalli, O., Pelte, M., Peclet, M., Gabbiani, G., Gugliotta, P., Bussolati, G., *et al.*, (1989). Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *Histochemistry & Cytochemistry*, 37(3), 315-321.

Sleeman, J. (2012). The metastatic niche and stromal progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(3-4), 429-440.

Slomovitz, B., Burke, T., Eifel, P., Ramondetta, L., Silva, E. G., Jhingran, *et al.*, (2003). Uterine papillary serous carcinoma (UPSC): a single institution review of 129 cases. *Gynecologic oncology*, 91(3), 463-469.

Souza, S., D., Watanabe, T., Casagrande, R., Wouters, A., Wouters, F., Driemeier, D. (2012). Histopathological and immunohistochemical characterization of mesenchymal neoplasms of the genitalia in 43 bitches. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32(12), 1313-1318.

Sowa, T., Menju, T., Sonobe, M., Nakanishi, T., Shikuma, K., Imamura, N., *et al.*, (2015). Association between epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness and their effect on the prognosis of lung adenocarcinoma. *Cancer medicine*, 4(12), 1853-1862.

Stivarou, T., & Patsavoudi, E. (2015). Extracellular molecules involved in cancer cell invasion. *Cancers*, 7(1), 238-265.

Tang, D. (2008). Intermediate filaments in smooth muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 294(4), C869-C878.

Taylor, C. (2014). Predictive biomarkers and companion diagnostics. The future of immunohistochemistry – ‘in situ proteomics’, or just a ‘stain’?. *A lied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 22(8): 555-561.

Taylor, K. (2010). Female reproductive tumours. In: Henry CJ, Higginbotham ML (Eds.), *Cancer Management in Small Animal Practice [Part V: Specific Tumours]*, . 268–274, Saunders, Elsevier, St. Louis, Missouri

Tennakoon, A., Izawa, T., Kuwamura, M., Yamate, J. (2015). Pathogenesis of Type 2 Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) in Renal and Hepatic Fibrosis. *Journal of clinical medicine*, 5(1), 4.

Thiery, J. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(6), 442-454.

Thiery, J., & Sleeman, J. (2006). Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(2), 131-142.

Thompson, E., & Williams, E. (2008). EMT and MET in carcinoma—clinical observations, regulatory pathways and new models. *Clinical and Experimental Metastasis*, 25(6), 591-592.

Tonino, P., & Abreu, C. (2011). Microvessel density is associated with VEGF and  $\alpha$ -SMA expression in different regions of human gastrointestinal carcinomas. *Cancers*, 3(3), 3405-3418.

Tsai, J., & Yang, J. (2013). Epithelial–mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes & development*, 27(20), 2192-2206.

Tsutsui, T., & Stabenfeldt, G. (1992). Biology of ovarian cycles, pregnancy and pseudopregnancy in the domestic cat. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 47, 29-35.

Tsutsui, T., Nakagawa, K., Hirano, T., Nagakubo, K., Shinomiya, M., Yamamoto, K., Hori, T. (2004). Breeding season in female cats acclimated under a natural photoperiod and interval until puberty. *Veterinary medical science*, 66(9), 1129-1132.

Tuxhorn, J., Ayala, G., Smith, M., Smith, C., Dang, T., & Rowley, D. R. (2002). Reactive stroma in human prostate cancer induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clinical Cancer Research*, 8(9), 2912-2923.

Vail, D., & Macewen, E. (2000). Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer investigation*, 18 (8), 781-792.

Vandekerckhove, J., & Weber. (1979). The complete amino acid sequence of actins from bovine aorta, bovine heart, bovine fast skeletal muscle, and rabbit slow skeletal muscle. A protein-chemical analysis of muscle actin differentiation. *Differentiation*, 14(1-3), 123-133.

Vong, S., & Kalluri, R. (2011). The role of stromal myofibroblast and extracellular matrix in tumor angiogenesis. *Genes & cancer*, 2(12), 1139-1145

Vos, J., Van-Den-Ingh, T., Misdorp, W., Molenbeek, R., Van Mil, F., Rutteman, G., *et al.*, , F. C. S. (1993). Immunohistochemistry with keratin, vimentin, desmin, and  $\alpha$ -smooth muscle actin monoclonal antibodies in canine mammary gland: Benign mammary tumours and duct ectasias. *Veterinary quarterly*, 15(3), 89-95.

Wei, J., Paintal, A., Keh P. 2013. Histologic and immunohistochemical analyses of endometrial carcinomas: experiences from endometrial biopsies in 358 consultation cases. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*; 137:1574-83.

Wicki, A., Lehenbre, F., Wick, N., Hantusch, B., Kerjaschki, D., Christofori, G. (2006). Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer cell*, 9(4), 261-272.

Wildt, D., Seager, S. J., Chakraborty, P. K. (1980). Effect of Copulatory Stimuli on Incidence of Ovulation and on Serum Luteinizing Hormone in the Cat. *Endocrinology*, 107(4), 1212-1217.

Xing, F., Saidou, J., Watabe, K. (2010). Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Frontiers in bioscience*, 15, 166.

Xu, J., Rodriguez, D., Petitclerc, E., Kim, J., Hangai, M., Yuen, S. M., *et al.*, (2001). Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. *Cell biology*, 154(5), 1069-1080.

Yang, J., & Weinberg, R. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental cell*, 14(6), 818-829.

Yang, Y., Dowling, J., Yu, Q., Kouklis, P., Cleveland, D., Fuchs, E. (1996). An essential cytoskeletal linker protein connecting actin microfilaments to intermediate filaments. *Cell*, 86(4), 655-665.

Yang, Y., Dowling, J., Yu, Q., Kouklis, P., Cleveland, D., Fuchs, E. (1996). An essential cytoskeletal linker protein connecting actin microfilaments to intermediate filaments. *Cell*, 86(4), 655-665.

Yilmaz, M., & Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28(1-2), 15-33.

Zhang, H., Gharaee-Kermani, M., Zhang, K., Karmiol, S., Phan, S. (1996). Lung fibroblast alpha-smooth muscle actin expression and contractile phenotype in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *The American journal of pathology*, 148(2), 527.

Zhao, J., Dong, D., Sun, L., Zhang, G., Sun, L. (2014). Prognostic significance of the epithelial-to-mesenchymal transition markers e-cadherin, vimentin and twist in bladder cancer. *International Brazilian Journal Of Urology*, 40 (2), 179-189.

## Anexos

### Anexo I

#### Invasão neoplásica

Tabela 10: Moléculas extracelulares envolvidas na invasão neoplásica e no processo de metastização

| Categoria                             | Nome / Tipo molecular                                 | Mecanismos                                                                                                                                                |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Moléculas da Matriz extra-celular     | Acido hialuronico                                     | Sobrevivência e crescimento tumoral.                                                                                                                      |
|                                       | Glicosaminoglicano                                    | O seu aumento provoca fluidez da matriz promovendo invasão tumoral.<br>Promove angiogénese tumoral                                                        |
|                                       | Fibronectina                                          | Degradação e remodelação de MEC, invasão tumoral                                                                                                          |
|                                       | Glicoproteína                                         |                                                                                                                                                           |
|                                       | Glicoproteína <i>Sibiling</i>                         | Comportamento similar as chaperonas. Envolvido na regulação de metaloproteinases                                                                          |
| Receptores da matriz extra-celular    | Integrinas, laminina, fibronectina, colagénio tipo IV | Envolvida na regulação de metaloproteinases                                                                                                               |
|                                       | Receptor Celular de superfície (CD 44)                | Receptor de ácido hialuronico                                                                                                                             |
| Factores de crescimento               | Factor de crescimento beta 1 (TGF- $\beta$ 1)         | Interagem com integrinas. Mudança de pH<br>Participam na transição de células epiteliais-mesenchimatosas. Alteram organização celular de fibras de actina |
|                                       | Heregulina - Factor de crescimento e desdiferenciação | Crescimento tumoral, indutor de angiogénese, remodelação da dispersão de fibras de actina. Invasão tumoral                                                |
| Receptores de factores de crescimento | Receptor celular de superfície (EGFR)                 | Proliferação celular, angiogénese, invasão tumoral                                                                                                        |
|                                       | Co-receptor celular de superfície (HER-2)             | Presente na progressão e invasão tumoral<br>E arranjo de fibras de actina                                                                                 |
|                                       | Receptor Celular de superfície (IRGF-R)               | Envolvido na proliferação, motilidade e adesão celular tumoral.<br>Inibição de apoptose                                                                   |
| Metaloproteinases de matriz           | Matriz Metaloproteinase 9 e 2 (MMP-9) (MMP- 2)        | Degradam gelatina e colagénio tipo IV, que são constituintes da membrana basal.<br>Remodelação da matriz                                                  |

|            |                                            |                                       |
|------------|--------------------------------------------|---------------------------------------|
|            | Endopeptidase de zinco                     |                                       |
|            | Metalopeptidase dependente de zinco (CD10) | Clivagem de péptidos                  |
| Chaperones | Co – Chaperone (Cdc37)                     | Migração e invasão tumorais           |
| LRP-1      | Recetor lipoproteína baixa densidade (LRP) | Motilidade celular<br>Invasão tumoral |

Adaptado de Stivarou & Patsavoudi 2015. <http://www.mdpi.com/2072-6694/7/1/238>,  
acedido em 21/4/2016.

## Anexo II- Preparação de soluções:

### Tampão Citrato:

1- Preparar as seguintes soluções: Soluções a ser previamente preparadas, para depois se fazer o tampão citrato:

Solução A :

Ácido cítrico 0,1M – 21,01g

Água destilada – 1000mL

Solução B :

Citrato de sódio ( $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ ) – 29,41g

Água destilada – 1000mL

### 2 - Para 500 mL de solução de trabalho:

- 9 mL da solução A + 41 mL de solução B e perfazer o volume até 500 mL com água destilada.

Ajustar o pH a  $6 \pm 0,2$

### Tampão PBS:

Dissolver:

$Na_2HPO_4$  – 11,5g

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  – 2,6184g

$NaCl$  – 5,84g

Em 1000 mL de água destilada.

Ajustar o pH a  $7,4 \pm 0,2$

### DAB:

Dissolver uma tablete de DAB (sigma) em 15 mL de PBS.