

Adenocarcinoma papilar de seio nasal em cão: Abordagem histomorfológica, imunofenotípica e terapêutica

Papillary Adenocarcinoma of Nasal Sinus in a Dog:
Approach Histomorphologic, Immunophenotypic, and Therapeutic

Liliane Cunha Campos¹, Juliana de Oliveira Silva¹, Cristina Maria de Souza¹,
Cecília Bonolo de Campos¹, Conrado de Oliveira Gamba¹, Karine Araújo Damasceno¹,
Rodrigo dos Santos Horta², Gleidice Eunice Lavalle² & Geovanni Dantas Cassali¹

ABSTRACT

Background: Sinus adenocarcinomas of papillary pattern are neoplasms rarely described in dogs and most cases are characterized by slow growth, local invasion and rare cases of metastasis. Their characteristics are presence of glandular structures that may have papillary pattern, tubulo-papillary, acinar and mixed pattern. Approximately 80% of primary nasal tumors are malignant and adenocarcinomas are the most frequently histology type. This paper reports a case of papillary adenocarcinoma of nasal sinus in the dog, emphasizing the use of histochemical and immunohistochemical techniques to aiding for appropriate therapy.

Case: A 14-year-old male Poodle dog, presenting seropurulent nasal discharge, frequent sneezing and an enlargement in the nasal region, was submitted to surgical excision of a tumor. Macroscopically, was observed fragment coated with soft hairy skin and shear blackish color, and some fragments associated with more firm tissues like cartilage and bone tissue. Tumor specimens were collected, fixed in 10% neutral buffered formalin solution and embedded in paraffin. Afterwards, 4 µm histological sections were obtained and stained with HE. For immunohistochemical analysis a biotin-peroxidase system was used and secondary antibodies were identified using Advance HRP. CKAE1/AE3, CK34βE12, SMA, E-cadherin, Cox-2, Ki-67 and Her-2 expression were evaluated. For CK AE1AE3 antibody a qualitative method was used and neoplasia were classified as negative (-) or positive (+) and for CK34βE12 was used semiquantitative evaluation and neoplasms were classified as negative (-), positive with focal staining (+) and positive with diffuse staining (++) . The graduation for HER-2 expression was (+) for 4 (++++), were 4 (++++) was the most intensity membrane staining. For Cox-2 the system used was semiquantitative and the distribution was scored by estimating the percentage of tumor cells staining. Intensity was estimated on a scale from 0 (absent) to 12 (strong). The proliferative index was calculated by counting nuclei positive for Ki-67 (anti-MIB-1) in a total of 1000 neoplastic cells. Microscopically, was observed a proliferation of epithelial cells in papillary arrangement with delicate connective axis of support and areas of stromal invasion, and the tumor received the diagnosis of papillary adenocarcinoma of nasal sinus. Immunohistochemical analysis revealed strong staining for Cox-2 (score 12), CKAE1/AE3 positivity and CK34βE12 (+ + +) and negative for Her-2 (+). Loss of E-cadherin expression was observed and SMA allowed the visualization of areas of basal membrane rupture. The rate of proliferation was evaluated by means of the expression of MIB-1 was high (16%). Chemotherapy was performed with carboplatin and gemcitabine.

Discussion: Sinus carcinomas in general, despite their slow growth, are locally invasive and cause extensive destruction of adjacent tissues. In this case, the immunohistochemical analysis presented positive expression of CK AE1/AE3 and CK34βE12, indicating epithelial histogenesis with basal phenotype. Strong intensity of COX-2 expression was observed, indicating a poor prognostic for the patient. The loss of expression of E-cadherin, areas of invasive tumors and high rate of cell proliferation, demonstrated the aggressive character of papillary adenocarcinoma nasal sinus. Surgery with chemotherapy- associated was effective and tolerant treatment. Diagnosis was based on histopathological and immunohistochemical analysis. Correct characterization of this neoplasm associated with the appropriate therapy aided in prognosis and in the improvement of the animal's quality of life. The patient's overall survival has been evaluated since the surgical procedure up to this date and is over 18 months.

Keywords: immunohistochemical, canine, respiratory tract, neoplasia.

Descritores: imuno-histoquímica, canino, trato respiratório, neoplasia.

Received: 22 May 2013

Accepted: 15 June 2013

Published: 26 July 2013

¹Laboratório de Patologia Comparada, Departamento de Patologia Geral - Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil. ²Escola de Veterinária, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG. CORRESPONDENCE: G.D. Cassali [cassali@icb.ufmg.br - FAX: +55 (31) 3409-2879]. Av. Antônio Carlos n. 6627, Pampulha. CEP 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil.

INTRODUÇÃO

As neoplasias sinonasais representam cerca de 1% da totalidade dos tumores que afetam os cães e cerca de 59 a 82% de todas as neoplasias do aparelho respiratório [20]. A maior ocorrência compreende cães de 10 anos e de médio e grande porte [11]. Clinicamente, os principais sinais consistem em espirros, epistaxe, corrimento e congestão nasal e obstrução das vias aéreas superiores provocando estertores [18-20]. Nestes casos, a excisão cirúrgica deve ser direcionada primariamente para o controle da doença local [20] podendo ser associada à radioterapia ou quimioterapia [19].

A maioria desses tumores são localmente infiltrativos [1] com raras metástases que, quando ocorrem, acometem linfonodos regionais e pulmões [20,21]. Aproximadamente 80% dos tumores nasais primários são malignos [5] sendo o adenocarcinoma um tipo histológico bastante frequente. Os adenocarcinomas caracterizam-se microscopicamente por presença de estruturas glandulares que podem apresentar padrão papilar, túbulo-papilar, acinar e padrão misto [22], sendo o último o mais frequente.

Visando um diagnóstico definitivo e preciso, ferramentas histomorfológicas e imuno-histoquímicas poderiam ser úteis na caracterização destes adenocarcinomas, podendo auxiliar na avaliação prognóstica [7]. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo descrever o caso de um cão portador de adenocarcinoma papilar de seio nasal com ênfase na caracterização morfológica e imunofenotípica, assim como a conduta terapêutica preconizada.

CASO

Um cão, raça Poodle, com 14 anos de idade, foi encaminhado ao Hospital Veterinário da UFMG apresentando secreção nasal seropurulenta bilateral (por vezes sanguinolenta), espirros e aumento de volume no plano nasal, com evolução a cerca de três meses.

O paciente foi encaminhado para exame radiográfico ventro-dorsal e látero-lateral do crânio (Figura 1) e para realização de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) do tumor. Na análise citopatológica evidenciou-se presença de grandes aglomerados celulares em forma cilíndrica e cuboidal, por vezes apresentando pequenos vacúolos citoplasmáticos e discretas células inflamatórias. Os achados foram compatíveis com tecido de origem epitelial, porém a análise histopatológica foi indicada para diagnóstico

definitivo. Foram realizadas também radiografias torácicas em incidência látero-lateral e ventro-dorsal, nas quais não foram observados focos de metástase nos campos pulmonares.

O paciente foi submetido à exérese cirúrgica da neoplasia. A rinotomia foi realizada com abordagem dorsal. Foi realizada uma incisão com cerca de 3 cm na pele e tecido subcutâneo a partir da face caudal do plano nasal, acompanhando a linha média dorsal. O osso frontal foi elevado e removido, permitindo a exploração dos seios nasais. A cavidade nasal esquerda encontrava-se repleta pela massa neoplásica, com invasão do septo nasal e acometimento do lado direito. O tecido foi removido, sem margem de segurança, juntamente com o septo nasal e estruturas trabeculares adjacentes. Para substituição do tecido ósseo nasal foi utilizado pericárdio bovino conservado em glicerina.

Amostras da massa neoplásica foram coletadas e encaminhadas para o Laboratório de Patologia Comparada (ICB/UFMG). Na avaliação macroscópica observou-se fragmento revestido por pele pilosa de consistência macia. Ao corte observou-se coloração enegrecida, e alguns fragmentos associados a tecidos mais firmes semelhantes à cartilagem e tecido ósseo. Os fragmentos foram fixados em formol 10% tamponado, processados por técnica histológica, incluídos em parafina, seccionados e corados pelo método da Hematoxilina e Eosina (HE). Histologicamente visualizou-se proliferação de células epiteliais em arranjo papilar com delicado eixo conjuntivo de sustentação e áreas de invasão estromal (Figura 2), recebendo o diagnóstico de adenocarcinoma papilar de seio nasal.

Para o estudo imuno-histoquímico, secções de 4 µm foram obtidas dos blocos de parafina, e utilizadas para identificação de expressão de Ciclooxigenase -2 (Cox-2) (diluição 1:10; SP21, Neomarkers)¹, citoqueratina (CK) 34βE12 (diluição 1:40; 34βE12, Dako)², CKAE1/AE3 (diluição 1:100; AE1/AE, Dako)², α-actina de músculo liso (ASMA) (diluição 1:100, 1A4, Dako)², Ki-67 (clone Mib-1, Dako, 1/25)², E-caderina (diluição 1:60, 4A2C7, Invitrogen)³ e receptor de fator de crescimento epidermal humano-2 (Her-2) (diluição 1:200, policlonal Dako)². Para o anticorpo CK AE1/A3 utilizou-se a avaliação qualitativa classificando a neoplasia em negativa (-) ou positiva (+) e para CK34βE12 utilizou-se avaliação semi-quantitativa classificando a neoplasia em negativa (-), positiva focal (+) e positiva difusa (++) . A graduação da expressão

de Her-2 foi de 1 (+) a 4 (++++), sendo 4 (++++ a marcação de maior intensidade [9]. Apenas marcação membranar foi considerada positiva. O número de células positivas para Cox-2 foi avaliado semi-quantitativamente e definido pela estimativa de porcentagem de células positivas segundo intensidade de coloração na escala de 0 (sem coloração) a 12 (coloração forte) [10]. O índice de proliferação celular foi obtido pela contagem de núcleos positivos para Ki-67 em um total de 1000 células em aumento de 40x [4].

A análise imuno-histoquímica revelou forte marcação para Cox-2 (escore 12), positividade para CKAE1/AE3 (Figura 3) e CK34 E12 (+++) e negatividade para Her-2 (+). Perda da expressão de E-caderina foi observada e a ASMA permitiu a visualização de áreas de ruptura de membrana basal. O índice de proliferação, avaliado por meio da expressão do MIB-1, mostrou-se elevado (16%) [Figura 4].

Durante o pós-operatório, o animal foi medicado com amoxicilina-clavulanato de potássio a cada 12 h, por 10 dias. Nos dois primeiros dias o paciente

foi medicado com cloridrato de tramadol e meloxicam por via intramuscular a cada 12 h. Para redução do processo inflamatório e redução da dor pós-operatória, após a alta hospitalar, foi prescrito firocoxibe por via oral, de 24 em 24 h durante quatro dias consecutivos. O animal se recuperou bem apresentando sangramento nasal apenas no primeiro dia do pós-operatório. Por volta do segundo dia houve o desenvolvimento de um enfisema subcutâneo extenso na região da face e pescoço, no entanto, a complicação foi auto-limitante, com resolução completa em 15 dias.

O paciente foi submetido a tratamento quimioterápico com cinco ciclos a cada 21 dias de cloridrato de gencitabina e carboplatina em infusão rápida. O protocolo quimioterápico foi iniciado após a retirada dos pontos (dez dias após cirurgia). O paciente apresentou boa evolução clínica e tolerância à medicação com raros episódios de vômito e perda de apetite, sendo submetido à reavaliação clínica a cada dois meses, no Hospital Veterinário da UFMG, com realização de ultrassonografia abdominal e radiografias do tórax e crânio.

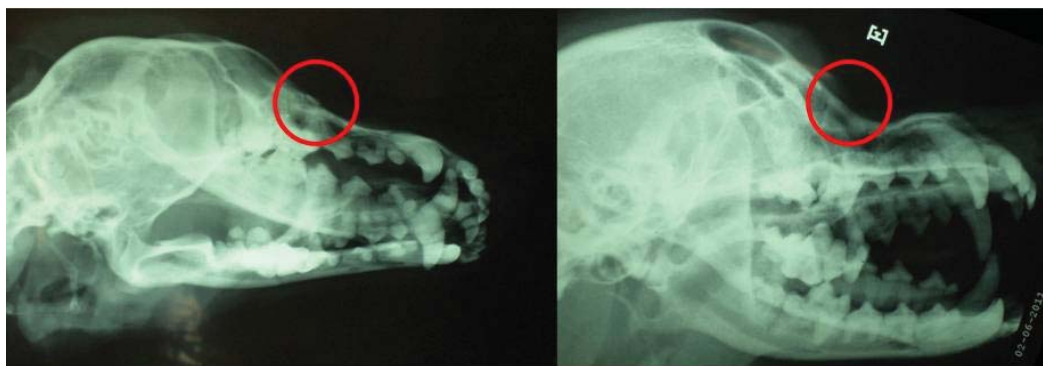


Figura 1. Radiografias látero-lateral do crânio antes e após a cirurgia, respectivamente. Observar a área circulada, referente ao tumor na primeira radiografia e a mesma área, na segunda radiografia, com redução da radiopacidade devido à substituição do tecido ósseo pela membrana de pericárdio bovino.



Figura 2. Adenocarcinoma nasal em cão. Proliferação de células epiteliais em arranjo papilar com delicado eixo conjuntivo de sustentação (seta). [HE, 33x].

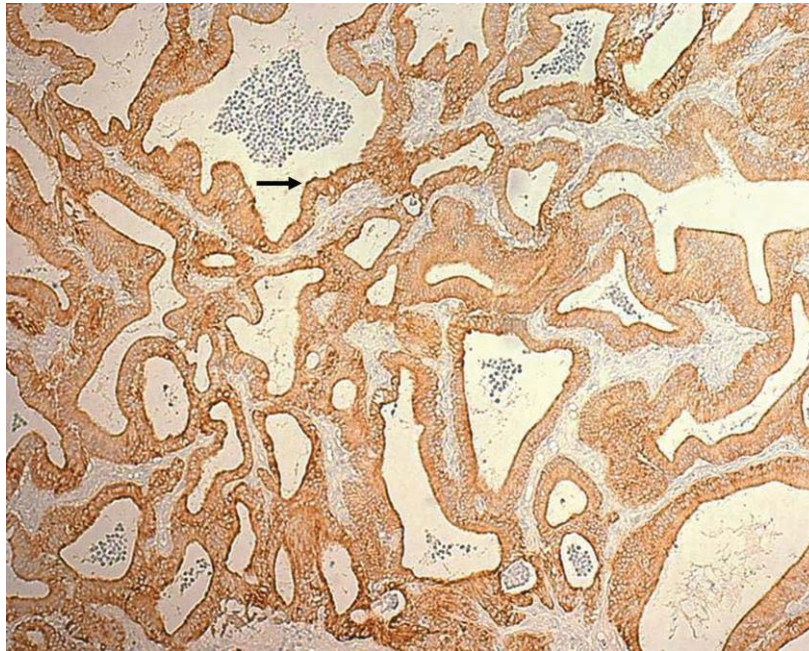


Figura 3. Adenocarcinoma nasal em cão. Reação de imuno-histoquímica para citoqueratina AE1/AE3 revelou marcação citoplasmática em células epiteliais (seta). [33x].

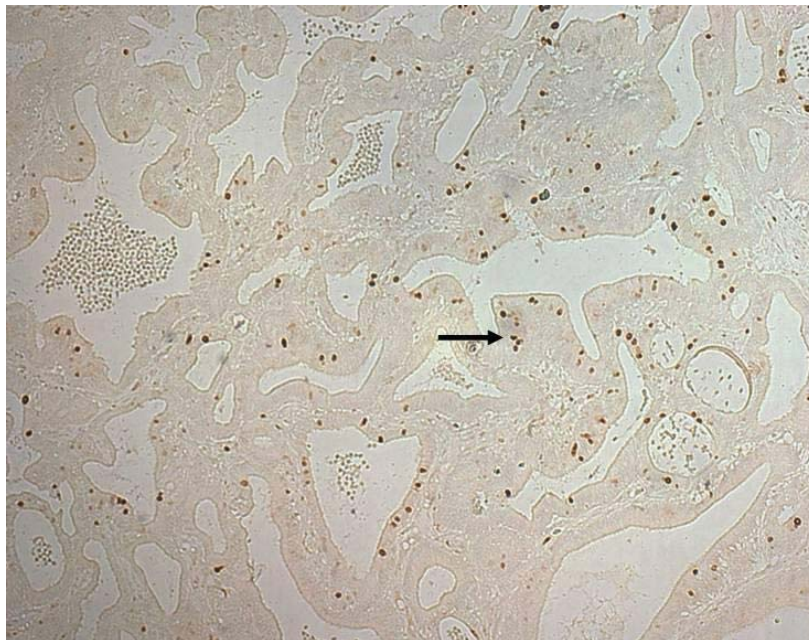


Figura 4. Adenocarcinoma nasal em cão. Reação de imuno-histoquímica para expressão de MIB-1 revelou índice de proliferação elevado (16%)(seta). [33x].

DISCUSSÃO

O adenocarcinoma de seio nasal em padrão papilar, apesar de ser frequente na espécie canina, é uma neoplasia pouco descrita na literatura. Manifestações clínicas como corrimento nasal, dispneia e aumento do volume facial observados nesse trabalho têm sido descritos na literatura [11], e estão de acordo com o relato apresentado.

O exame radiográfico evidenciou perda no padrão trabecular, aumento da radiopacidade do tecido mole e dos seios frontais.

A realização da cirurgia foi fundamental para reduzir o desconforto respiratório do paciente, melhorando assim sua qualidade de vida. O resultado obtido com a utilização do pericárdio bovino conservado em glicerina foi semelhante a trabalhos descritos anteriormente [17]. Essa membrana biológica natural representa uma alternativa de baixo custo para reparações anatômicas, oferecendo grande flexibilidade e baixa antigenicidade. A glicerina é um excelente antisséptico, protetor e fixador da integridade celular, pois promove a desidratação do tecido sem prejudicar sua elasticidade e as concentrações iônicas das células [12].

Na análise histopatológica foi observada proliferação epitelial em padrão papilar, apresentando projeções para o lúmen com delicado eixo conjuntivo de sustentação. As células neoplásicas apresentaram grânulos citoplasmáticos PAS positivos, que correspondem a uma característica fundamental para diferenciar este tipo de tumor de outras neoplasias epiteliais [15]. Os exames de radiografia e ultrassonografia não evidenciaram metástases e o animal foi avaliado, segundo sistema TNM [14], em T2N0M0.

Na análise imuno-histoquímica foi observado expressão positiva para CK AE1/AE3 e para CK34βE12, indicando histogênese epitelial com fenótipo basal. Estudos anteriores descrevem a ausência de expressão de citoqueratinas de alto peso molecular em adenocarcinomas nasais [3].

As células neoplásicas apresentaram forte marcação para o anticorpo COX-2 (score 12). A superexpressão de Cox-2 nos carcinomas nasais sugere a participação dessa enzima na carcinogênese e progressão tumoral [2]. A expressão de COX-2 pode ser induzida por várias citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, carcinó-

genos e oncogenes. A expressão dessa enzima em processos neoplásicos, tanto na espécie humana, quanto em outras espécies animais está relacionada à progressão tumoral, sendo considerada um fator de prognóstico desfavorável para vários tipos histológicos [6,8,16]. Os carcinomas de seio nasal em geral, apesar de possuírem crescimento lento, são localmente invasivos e causam destruição extensa dos tecidos adjacentes [22]. Neste relato observou-se perda de expressão de E-caderina (proteína relacionada à adesão celular), evidenciação de áreas de invasão e elevado índice de proliferação celular demonstrando o caráter agressivo do adenocarcinoma papilar de seio nasal.

O tratamento cirúrgico isolado, embora preconizado para melhorar a qualidade de vida do paciente, não promove aumento na sobrevida [19]. A gencitabina associada a carboplatina é ideal para uso no tratamento quimioterápico, sendo que seus diferentes mecanismos são complementares quando combinados [13]. O protocolo quimioterápico utilizado mostrou-se eficaz no caso relatado, com ausência de efeitos colaterais gastrointestinais e alterações hematológicas brandas (observadas no período de Nadir) e custo viável. Além disso, observou-se aumento do tempo livre de doença e a sobrevida global do paciente, que apresenta, até o momento, sobrevida de 14 meses, sem sinal de recidiva ou lesões metastáticas, contando a partir do procedimento cirúrgico.

Em conclusão, a avaliação histomorfológica associada à análise imuno-histoquímica permitiu caracterizar o comportamento biológico da neoplasia auxiliando na escolha de uma conduta terapêutica adequada. O procedimento cirúrgico utilizado associado ao protocolo quimioterápico preconizado mostrou-se eficiente, culminando com aumento da sobrevida do paciente.

SOURCES AND MANUFACTURERS

¹Neomarkers, Inc. 47790 Westinghouse Dr, Fremont, CA 94539 USA.

²Dako North America, Inc. 6392 Via Real. Carpinteria, CA 93013 USA.

³Invitrogen, Inc. 1600 Faraday Ave. Carlsbad, CA 92008 USA.

Declaration of interest. Os autores declaram não haver conflito de interesses relacionados a este manuscrito.

REFERENCES

- 1 Avner A., Dobson J.M., Sales J.I. & Herrtage M.E. 2008. Retrospective review of 50 canine nasal tumors evaluated by low-field magnetic resonance imaging. *Journal of Small Animal Practice*. 49(5): 233-239.
- 2 Borzacchiello G., Paciello O. & Paparella S. 2004. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in canine nasal carcinomas. *Journal Comparative Pathology*. 131(1): 70-762.
- 3 Brunnert S.R. & Altma N.H. 1990. Canine Lingual Acinic Cell Carcinoma (Clear Cell Variant) of Minor Salivary Gland. *Veterinary Pathology*. 27: 203-205.
- 4 Dutra A.P., Azevedo Júnior G.M., Schmit, F.C. & Cassali G.D. 2008. Assessment of cell proliferation and prognostic factors in canine mammary gland tumors. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 60(6): 1403-1412.
- 5 Hedlund C. S. 1998. Surgery of the nasal cavity and sinuses. In: Birchard S.J. & Sherding R.G. (Eds). *Saunders Manual of Small Animal Practice*. São Paulo: Roca, pp.609-611.
- 6 Holmila R., Cyr D., Luce D., Heikkila P., Dictor M., Steiniche T., Stjernvall T., Bornholdt J., Wallin H., Wolff H. & Husgafvet- Pursiainen K. 2008. COX-2 and p53 in human sinonasal cancer: COX-2 expression is associated with adenocarcinoma histology and wood-dust exposure. *International Journal of Cancer*. 122(9): 2154-2159.
- 7 Horta R.S., Costa M.P., Lavalle G.E., Araújo R.B. & Cassali G.D. 2012. Fatores prognósticos e preditivos dos tumores caninos definidos com auxílio da imuno-histoquímica. *Ciencia Rural*. 42(6): 1033-1039.
- 8 Impellizeri J.A. & Esplin D.G. 2008. Expression of cyclooxygenase-2 in canine nasal carcinomas. *The Veterinary Journal*. 176(3): 408-410.
- 9 Kha N.A.J, Digiovanna M.P., Ross D.A., Sasaki C.T., Carter D., Son Y.H. & Haffty B.G. 2001. Adenoid cystic carcinoma: a retrospective clinical review. *International Journal of Cancer*. 96(3): 149-158.
- 10 Kleiter M., Malarkey D.E., Ruslander D.E. & Thrall D.E. 2004. Expression of cyclooxygenase-2 in canine epithelial nasal tumors. *Veterinary Radiology & Ultrasound*. 45(3): 255-260.
- 11 Lana S. E. & Withrow S.J. 2001. Nasal Tumors. In: Withrow S.J. & MacEwen E.G. (Eds). *Small Animal Clinical Oncology*. 3rd edn. Philadelphia: WB Saunders Company. pp.370-375.
- 12 Leite J.B.F., Marques A.F., Gomes O.M. & Pigossi N. 1979. A glicerina e a preservação dos tecidos. *Revista Paulista de Medicina*. 93(3): 81-84.
- 13 McMahon M., Mathie T., Stingle N., Romansik E., Vail D. & London C. 2011. Adjuvant Carboplatin and Gemcitabine Combination Chemotherapy Postamputation in Canine Appendicular Osteosarcoma. *Journal Veterinary Internal Medicine*. 25(3): 511-517.
- 14 Patnaik A.K. 1989. Canine sinonasal neoplasms: clinicopathological study of 285 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 25(1): 103-114.
- 15 Psalla D., Geigy C., Konar M., Marçal V.C. & Oevermann A. 2008. Nasal Acinic Cell Carcinoma in a Cat. *Veterinary Pathology*. 45(3): 365-368.
- 16 Queiroga F.L., Perez-Alenza M.D., Silvan G., Peña L., Lopes C. & Illera J.C. 2005. Cox-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: Clinicopathological features and prognostic significance. *Anticancer Research*. 25(6b): 4269-4275.
- 17 Quitzan J.G., Rahal S.C. & Rocha N.S. 2003. Comparação entre pericárdio bovino preservado em glicerina e malha de poliéster no reparo de falhas da parede abdominal em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 18(4): 297-301.
- 18 Rassnick D.M., Goldkamp C.E. & Erb H.N. 2006. Evaluation of factors associated with survival in dogs with untreated nasal carcinomas: 139 cases (1993-2003). *Journal of American Veterinary Medical Association*. 229(3): 401-406.
- 19 Silva M.C.V., De Nardi A.B. & Rodaski S. 2009. Neoplasias do sistema respiratório. In: Daleck C.R., De Nardi A.B. & Rodaski S. (Eds). *Oncologia em cães e gatos*. São Paulo: Roca, pp.335-344.
- 20 Turek M.M. & Lana S.E. 2007. Canine nasosinal tumors. In: Withrow S.J. & MacEwen E.G. (Eds). *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 4th edn. Philadelphia: Saunders Company, pp.525-539.
- 21 von Biberstein S.E., Spiro J.D. & Coll W. 1999. Acinic cell carcinoma of the nasal cavity. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 120(5): 759-762.
- 22 Wilson D.W. & Dungworth D.L. 2002. Tumors of the respiratory tract. In: Meuten D.J. (Ed). *Tumors in Domestic Animals*. 4th edn. Iowa: Blackwell, pp.365-399.

