



Caracterização anatomopatológica e imuno-histoquímica dos tumores das glândulas cutâneas em cães

[Anatomopathological and immunohistochemical characterization of skin gland tumors in dogs]

J.S. Vasconcelos¹, R.A.S. Siqueira¹, R.B. Lucena², A.F.M. Dantas³, A.G.A. Alves⁴

¹Aluno de pós-graduação - Universidade Federal de Campina Grande - Patos, PB

²Universidade Federal da Paraíba - Areia, PB

³Universidade Federal de Campina Grande - Campina Grande, PB

⁴Centro de Ciência Animal e Veterinária - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro - Vila Real, Portugal

RESUMO

O presente estudo objetivou caracterizar os aspectos anatomopatológicos e imuno-histoquímicos dos tumores das glândulas cutâneas em cães. A caracterização morfológica seguiu a classificação atualizada da Organização Mundial de Saúde. Para a caracterização imuno-histoquímica, utilizaram-se anticorpos monoclonais primários anti-citoqueratina 14 (CK14), vimentina, p63, calponina, EGFR e Ki-67. Dos animais examinados, 66,67% (18/27) eram machos e 33,33% (9/27) fêmeas, 21 tinham raça definida e seis eram sem raça definida (SRD), com idade variando entre sete e 15 anos. Dos tumores caracterizados, 40,74% eram hepatoides (11/27), 29,63% sebáceos (8/27), 25,92% apócrinos (7/27) e 3,70% meibômio (1/27). Os tumores malignos representaram 55,56%, e os benignos 44,44%. Com esses resultados, foi possível demonstrar que os tumores das glândulas cutâneas em cães são frequentes, sem predileção por raça, sexo e com idade superior ou igual a sete anos. Os anticorpos CK 14, p63, vimentina e EGFR foram imunoexpressos nas células basais, células de diferenciação sebácea dos tumores hepatoides e de meibômio e células mioepiteliais. Entretanto, a vimentina e o EGFR não demonstraram imunomarcagem para os tumores sebáceos. A calponina foi um bom marcador para as células mioepiteliais. O índice de Ki-67 foi mais acentuado nos tumores malignos em relação aos benignos. No entanto, estudos futuros utilizando maior número de casos se fazem necessários.

Palavras-chave: cães, tumores cutâneos, análise, imuno-histoquímica, histopatologia

ABSTRACT

The present study aimed to characterize the anatomopathological and immunohistochemical aspects of cutaneous glandular tumors in dogs. Tumours were diagnosed according to the WHO criteria for canine skin neoplasms. For the immunohistochemical characterization, the primary monoclonal antibodies anti-cytokeratin 14 (CK14), vimentin, p63, calponin, EGFR and Ki-67 were used. Males were 66.67% (18/27) and females 33.33% (9/27), 21 had a defined race and 6 were mixed breed, with ages varying from 7 to 15 years. The tumors characterized were 40.74% hepatoid (11/27), 29.63% sebaceous (8/27), 25.92% apocrine (7/27) and 3.70% Meibômio (1/27). Malignant tumors accounted for 55.56% and benign tumors 44.44%. With these results it was possible to demonstrate that tumors of cutaneous glands in dogs are frequent, with no predilection for race, sex and with an age \geq seven years. The CK 14 antibodies, p63, vimentin, and EGFR were imunoexpressed in the basal cells of the sebaceous cell differentiation and Meibomian hepatoides tumors and myoepithelial to cells. However, vimentin and EGFR did not demonstrate immunostaining for sebaceous tumors. Calponin was a good marker for myoepithelial cells. The Ki-67 index was more pronounced in malignant tumors compared to benign tumors. However, more studies are needed mainly using a higher number of tumors.

Keywords: dogs, cutaneous tumors, analysis, immunohistochemistry, histopathology

INTRODUÇÃO

Entre as dermatopatias que afetam os cães, os tumores cutâneos foram a segunda patologia mais diagnosticada, após apenas da hipersensibilidade à picada de pulga (Sischo *et al.*, 1989). O crescente aumento dos casos oncológicos em animais de companhia se deve à elevada sobrevivência destes, devido a fatores como nutrição adequada, protocolos terapêuticos eficientes, vacinação, além de uma maior dedicação dos proprietários (Withrow e Vail, 2007).

As neoplasias sebáceas ou com diferenciação sebácea são comuns no cão, variando entre 6% e 21% dos tumores cutâneos dessa espécie (Goldschmidt e Hendrick, 2002). As neoplasias das glândulas hepatoideas (perianais) (sebáceas modificadas) são consideradas as mais comuns nos canídeos (Scott *et al.*, 2001; Gross *et al.*, 2005), constituindo o terceiro tumor cutâneo mais diagnosticado nos machos (Withrow e Vail, 2007). No entanto, os tumores benignos são hormônios (estrogênios e androgênios) dependentes (Petterino *et al.*, 2004), e os carcinomas são hormônios independentes (Scott *et al.*, 2001; Kirpensteijn, 2006). Enquanto as neoplasias das glândulas de meibômio (glândulas sebáceas modificadas) apresentam uma frequência de 10% das neoplasias das glândulas de origem sebácea, as neoplasias das glândulas apócrinas correspondem de 0,7% a 2,2% de todos os tumores de pele de canídeos (Gross *et al.*, 2005).

O diagnóstico histopatológico dos tumores das glândulas cutâneas é realizado com base nas características morfológicas das células neoplásicas, em que se relacionam principalmente suas formas citoplasmáticas e nucleares, além de arranjos e estroma de sustentação (Goldschmidt e Hendrick, 2002). Muitas vezes pode ser difícil definir a origem celular e, conseqüentemente, o diagnóstico definitivo. Nesse caso, necessita-se da imuno-histoquímica para determinar a origem celular dos tumores (Polak e Van Noorden, 2003).

Estudos imuno-histoquímicos utilizando o anticorpo p63 em neoplasias de glândulas cutâneas de cães demonstraram sensibilidade e especificidade para identificação das células basais e mioepiteliais de tumores malignos

(Saraiva *et al.*, 2008). A citoqueratina 14 (CK14) e a vimentina apresentaram imunoreatividade para as células mioepiteliais. A calponina foi testada em glândulas de origem apócrina, mostrando-se reativa para as células mioepiteliais e os miofibroblastos (Saraiva, 2007). Ao avaliar a glândula hepatoide normal, Alves (1999) demonstrou que as citoqueratinas de médio e largo espectro apresentaram reatividade moderada, entretanto a citoqueratina 14 apresentou acentuada reatividade e a vimentina foi negativa para as neoplasias hepatoideas. O anticorpo Ki-67 revelou ser um marcador sensível para verificar a proliferação celular.

O diagnóstico das neoplasias de glândulas cutâneas em cães é frequente, entretanto são escassos os estudos imuno-histoquímicos das glândulas cutâneas nesses animais. Diante do exposto, o presente estudo objetivou caracterizar os aspectos anatomopatológicos e imuno-histoquímicos dos tumores de glândulas cutâneas em cães.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo, foram utilizadas 27 amostras de tumores de glândulas cutâneas, oriundas de cães atendidos em clínicas veterinárias da região metropolitana de João Pessoa, Paraíba, Brasil, e do arquivo do Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica (LHAP) da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), em Vila Real, Portugal. As fichas que acompanhavam as amostras continham, além do histórico clínico, informações sobre raça, sexo e idade, localização anatômica e características das lesões macroscópicas dos cães.

O processamento e as análises das amostras foram realizados nos laboratórios de Patologia Veterinária (LPV) do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), no Laboratório de Patologia Animal (LPA) do Centro de Saúde e de Tecnologia da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) e no Laboratório de Histologia e de Anatomia Patológica (LHAP) da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD).

As amostras utilizadas para o estudo foram coletadas por biópsias excisionais,

Caracterização anatomopatológica...

acondicionadas em solução de formalina tamponada a 10% e, depois, clivadas. Em seguida, foram processadas rotineiramente, incluídas em blocos de parafina, cortadas em espessura de 3µm para confecção de lâminas e coradas em hematoxilina e eosina. Posteriormente, foi feita a análise utilizando-se microscópio do LHAP Nikon Eclipse E-600, com câmera Nikon DS-12 acoplada, e o *software* NSI Elements da Nikon.

A caracterização morfológica dos tumores das glândulas cutâneas foi realizada com base na

classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) (Goldschmidt *et al.*, 1998). Para caracterização imuno-histoquímica, utilizaram-se secções de tecido de 3µm de espessura em lâminas silanizadas e incubadas com anticorpos monoclonais primários anticitoqueratina 14 (CK14), vimentina, gene p63 (p63), calponina, receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e Ki-67 (Tab. 1), empregando-se o sistema de detecção de polímero Novolink Novocastra (Leica Biosystems).

Tabela 1. Relação dos anticorpos e protocolos utilizados na caracterização imuno-histoquímica das neoplasias de glândulas cutâneas em cães

Anticorpo	Clone	Fabricante	Recuperação antigênica	Diluição	Incubação
CK 14	LL002	Thermo Scientific	Micro-ondas	1:800	Durante a noite; 4°C
Vimentina	NCL-L-VIM-V9	Novocastra	Micro-ondas	1:100	Durante a noite; 4°C
p63	4A4	Neomarkers	Micro-ondas	1:150	Durante a noite; 4°C
EGFR	31G7	Zymed Laboratories	Pepsina	1:50	Durante a noite; 4°C
Calponina*	CALP	DakoCytomation	Micro-ondas	1:500	2 horas; ambiente
Ki-67	MIB-1	DakoCytomation	Panela de pressão	1:100	2 horas; ambiente

*Foi utilizado apenas nas neoplasias das glândulas apócrinas.

A recuperação antigênica dos anticorpos CK14 e vimentina foi realizada com tampão citrato (pH 6,0) em um ciclo de micro-ondas 750w, por sete minutos. A recuperação do p63 foi realizada com tampão citrato (pH 6,0) em cinco ciclos de micro-ondas 750w, por cinco minutos. A recuperação da calponina foi realizada com tampão citrato (pH 6,0) em três ciclos de micro-ondas 750w, por cinco minutos, com intervalos de dois minutos. A recuperação para o EGFR foi realizada por digestão enzimática (0,4% de pepsina) (Dako, Dinamarca) em solução de HCl 0,01N (pH= 2), durante 30 minutos, a 37°C. Para o Ki-67, a recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato (pH 6,0), em panela de pressão, por dois minutos, em alta pressão.

A epiderme adjacente normal foi utilizada como controle positivo para a CK14; para a vimentina, utilizou-se a derme (fibras de colágenos e endotélio de vasos sanguíneos); para o p63, a epiderme e o folículo piloso; para o EGFR, a

epiderme; para a calponina, a derme (células mioepiteliais das glândulas apócrinas); e para o Ki-67, a epiderme.

Foram considerados positivos os cortes (amostras) que apresentaram imunomarcção para os anticorpos testados. Considerou-se positiva a imunomarcção citoplasmática para a CK14, a vimentina, o EGFR e a calponina, enquanto no caso do Ki-67 e do p63 a imunomarcção positiva foi nuclear. Para a quantificação da imunorreatividade, utilizou-se a seguinte classificação: leve, moderada e acentuada, consoante a intensidade da imunorreatividade observada. Entretanto, a quantificação da imunorreatividade para o Ki-67 foi realizada de acordo com Pena *et al.* (1998), em que o índice de proliferação foi obtido contando-se até mil células positivas e negativas de cada caso, em objetiva de 40x. O índice de 1% a 5% é considerado leve, >5% a 10% moderado e >10% acentuado.

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Federal da Paraíba, sob o parecer número 054/2015.

RESULTADOS

Dos 27 cães com nódulos cutâneos, 66,67% (18/27) eram machos e 33,33% (9/27) fêmeas. Vinte e um eram de raça definida e seis sem raça definida (SRD); a idade variou de sete a 15 anos,

com uma média de 9,8 anos. A raça, o sexo, a idade, a localização anatômica e o diagnóstico morfológico dos cães com tumores das glândulas cutâneas estão distribuídos de acordo com a Tab. 2. As únicas lesões macroscópicas observadas foram nódulos subcutâneos em todos os casos, sendo quatro deles ulcerados (03, 12, 18 e 21). O tamanho dos nódulos variou de 0,3 a 5,0cm de diâmetro.

Tabela 2. Relação de sexo, raça, idade, localização anatômica e diagnóstico morfológico de cães com neoplasias de glândulas cutâneas

Nº do caso	Sexo	Raça	Idade	Distribuição anatômica nódulos	Diagnóstico morfológico
01	F	Poodle	10 anos	Cervical dorsal	Adenoma da glândula sebácea
02	M	SRD	13 anos	Perianal	Carcinoma de glândula hepatoide
03	M	Poodle	3 anos	Flanco direito	Carcinoma ductal das glândulas apócrinas com focos de diferenciação escamosa
04	F	SRD	---	Perianal	Carcinoma de glândula hepatoide
05	F	Poodle	7 anos	Lombossacra	Adenoma da glândula sebácea
06	F	Shi Tzu	9 anos	Lombar	Adenoma da glândula sebácea
07	M	Mestiço de Labrador	10 anos	Perianal	Carcinoma de glândula hepatoide
08	F	Poodle	15 anos	Flanco esquerdo	Carcinoma de glândulas apócrina
09	F	Poodle	10 anos	Dorso do tórax	Carcinoma ductal das glândulas apócrinas com focos de diferenciação escamosa
10	M	Pequinês	8 anos	Perianal	Adenoma de glândula hepatoide
11	M	Husky Siberiano	10 anos	Perianal	Adenoma de glândula hepatoide
12	M	SRD	10 anos	Perineal	Adenoma de glândulas hepatoide
13	M	Shi Tzu	12 anos	Perianal	Adenoma da glândula hepatoide
14	M	Terrier	10 anos	Cervical ventral	Carcinoma papilar da glândula apócrina
15	M	Akita	8 anos	Base da cauda	Adenoma cístico da glândula apócrina
16	M	Poodle	14 anos	Perianal	Adenoma de glândula hepatoide
17	M	SRD	11 anos	Perianal	Epitelioma da glândula hepatoide
18	M	Beagle	9 anos	Face	Epitelioma da glândula sebácea
19	F	Poodle	12 anos	Pálpebra	Epitelioma da glândula de meibômio
20	F	Yorkshire Terrier	15 anos	Cervical ventral	Epitelioma da glândula sebácea
21	M	SRD	13 anos	Cervical ventral	Adenoma cístico da glândula apócrina
22	M	Perdigueiro	11 anos	Base da cauda	Adenoma da glândula hepatoide
23	M	Spitz Alemão	5 anos	Base da cauda	Carcinoma da glândula hepatoide
24	M	Cocker Spaniel	9 anos	Membro torácico esquerdo	Carcinoma misto de glândula apócrina
25	M	Golden Retriever	---	Cervical dorsal	Carcinoma de glândulas sebáceas
26	F	Poodle	---	Face	Hiperplasia da glândula sebácea
27	M	Serra da Estrela	12 anos	Pavilhão auricular	Epitelioma da glândula sebácea

F = fêmea; M = macho e SRD = sem raça definida.

Os tumores das glândulas hepatoides foram os mais frequentes, diagnosticados em 40,74% (11/27) dos cães acometidos. Nódulos subcutâneos foram as lesões macroscópicas observadas. Em seguida, com 29,63% (8/27), os tumores das glândulas sebáceas. As principais lesões macroscópicas foram nódulos subcutâneos (100% – 8/8), no entanto dois deles encontravam-se ulcerados (25,00% – 2/8). A neoplasia da glândula de meibômio foi observada em 3,70% (1/27) dos cães e clinicamente o animal apresentava um pequeno nódulo multilobulado na região palpebral. As neoplasias das glândulas sudoríparas apócrinas representaram 25,92% (7/27) dos casos. A macroscopia foi caracterizada por nódulos subcutâneos 100% (7/7), entretanto dois deles encontravam-se ulcerados 28,58% (2/7).

Caracterização anatomopatológica...

Dos tumores das glândulas hepatoides, 54,55% (6/11) eram benignos e 45,45% (5/11), malignos. Entre os tumores das glândulas sebáceas, 50,00% (4/8) eram benignos e 50,00% (4/8), malignos. O tumor diagnosticado na glândula de meibômio era maligno. Os tumores benignos e malignos das glândulas sudoríparas apócrinas representaram 28,57% (2/7) e 71,43% (5/7), respectivamente (Fig. 1).

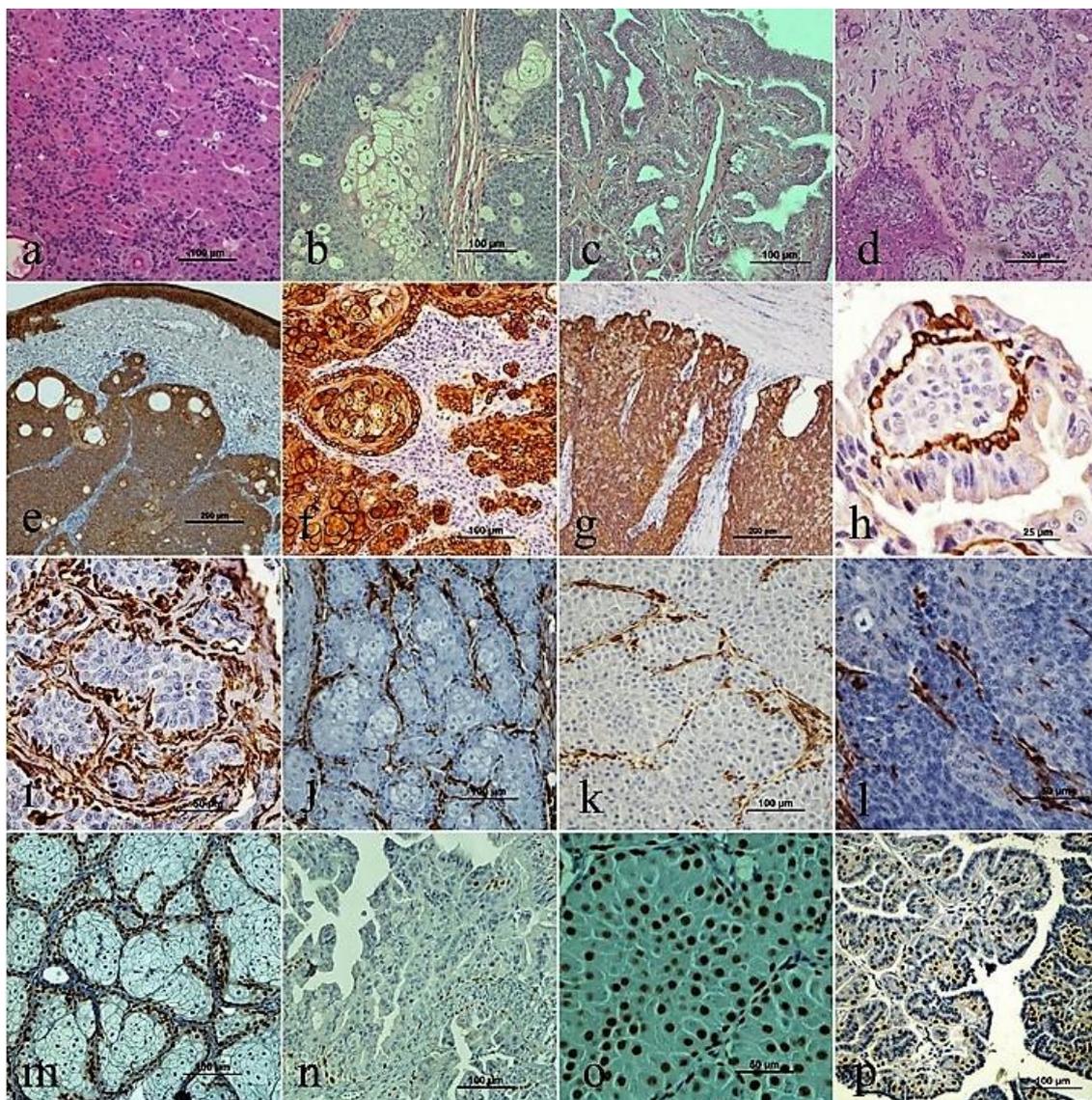


Figura 1. Tumores das glândulas cutâneas em cães: aspectos morfológicos e expressão imuno-histoquímica de CK14, vimentina e p63. a) Carcinoma da glândula hepatoide, HE 20x. Caso 4. b) Epitelioma da glândula sebácea, HE. 20x. Caso 20. c) Carcinoma da glândula apócrina com focos de diferenciação escamosa, HE 20x. Caso 9. d) Carcinoma misto da glândula apócrina, HE 10x. Caso 24. e) Epitelioma da glândula sebácea, positivo para CK14. 10x. Caso 27. f) Adenoma da glândula sebácea, positivo para CK14. Caso 6. g) Carcinoma da glândula hepatoide, positivo para CK14. 10x. Caso 7. h) Carcinoma papilar da glândula apócrina, positivo para CK14. 60x. Caso 14. i) Carcinoma de glândulas apócrina, positivo para vimentina. 40x. j) Adenoma da glândula sebácea, positivo para vimentina. 20x. Caso 6. k) Epitelioma da glândula hepatoide, positivo para vimentina. 20x. Caso 22. l) Epitelioma da glândula sebácea, positivo para vimentina. 40x. Caso 18. m) Hiperplasia da glândula sebácea, positiva para p63. 20x. Caso 26. n) Carcinoma misto da glândula apócrina, positivo para vimentina. 20x. Caso 24. o) Carcinoma da glândula hepatoide, positivo para p63. 20x. Caso 23. p) Adenoma cístico da glândula sudorípara apócrina, positivo para p63. 20x. Caso 15.

Na histologia, os tumores das glândulas hepatoides foram adenomas das glândulas hepatoides, os quais se caracterizaram pela proliferação de células hepatoides bem diferenciadas, exibindo leve pleomorfismo celular e nuclear. As células continham núcleos que variaram de arredondados a ovalados hiper cromáticos e citoplasma abundante eosinofílico, arranjadas em ninhos entremeados por moderado estroma fibrovascular. Foi possível observar raras figuras de mitose por campo de grande aumento (objetiva de 40x), epitelomas das glândulas hepatoides pela proliferação de células basaloides e algumas células com diferenciação hepatoide. As células basaloides de reserva apresentaram elevada atividade mitótica, associada a discreta atipia nuclear. Os carcinomas das glândulas hepatoides caracterizaram-se pela ausência de padrão lobular, no entanto apresentaram invasão periférica. As células basaloides exibiram pleomorfismo nuclear e hiper cromatismo. As células que exibiram diferenciação hepatoide possuíam citoplasma vacuolado descorado ou fracamente eosinofílico, pleomorfismo nuclear e nucléolos proeminentes. Figuras de mitose foram encontradas nas células basaloides de reserva e nas células diferenciadas.

Os tumores das glândulas sebáceas foram hiperplasia sebácea e se caracterizaram por serem nódulos bem diferenciados com proliferação de células basaloides de reserva e de células de diferenciação sebáceas sem alterações neoplásicas. Os adenomas sebáceos caracterizaram-se por serem massas intradérmicas bem demarcadas. Em alguns casos, a massa estendeu-se da interface dermoepidérmica para o subcutâneo, formando lóbulos discretos de vários tamanhos. Na periferia desses lóbulos, as células basaloides encontravam-se variando o arranjo de uma camada a várias camadas de espessura variável. No interior dos tumores, predominou a presença de sebócitos. Os epitelomas sebáceos apresentaram células de reservas de citoplasmas escassos e núcleos ovoides hiper cromáticos, constituindo massa neoplásica. Os núcleos das células neoplásicas diferenciadas eram grandes e vesiculosos, observando-se até três nucléolos. Também foi possível observar até três mitoses por campo de aumento em objetiva de 40x. Enquanto os carcinomas sebáceos apresentaram células em moderado grau de diferenciação

sebácea, formando múltiplos lóbulos, compostos de células tumorais exibindo um grau variável de alterações citoplasmáticas, as células tumorais apresentaram pleomorfismo nuclear, associado a hiper cromasia e moderada atividade mitótica. As características histológicas do carcinoma de meibômio são semelhantes aos carcinomas das glândulas sebáceas.

Os tumores das glândulas sudoríparas apócrinas foram adenomas císticos, os quais foram caracterizados por apresentarem lúmen dilatado com secreção, proliferação de células epiteliais cuboides com citoplasma eosinofílico granular abundante e nucléolo localizado basalmente e podendo exibir secreção de decapitação. Os carcinomas das glândulas sudoríparas apócrinas foram tumores bem diferenciados, compostos de células com citoplasma eosinofílico e abundante, núcleo largo e ovoide com nucléolo proeminente. Exibiram leve pleomorfismo nuclear e celular e baixa atividade mitótica. Os carcinomas mistos das glândulas sudoríparas apócrinas foram caracterizados por apresentarem proliferações malignas de células glandulares acompanhadas de proliferação de células mioepiteliais. Também se observaram alterações metaplásicas do mioepitélio para tecidos ósseo e cartilaginoso. Os carcinomas papilares eram bem diferenciados, compostos de células com citoplasma eosinofílico e abundante, núcleo grande e ovoide com nucléolo proeminente, leve pleomorfismo nuclear e celular e baixa atividade mitótica. Também foi possível observar papilares do epitélio no lúmen, as quais são sustentadas por estroma fibrovascular, enquanto os carcinomas ductais com diferenciação escamosa foram caracterizados por possuírem lumens dispostos em dupla camada de células epiteliais e contendo secreção eosinofílica. As células exibiram moderado pleomorfismo nuclear, hiper cromasia e leve atividade mitótica, associado à presença de focos de diferenciação escamosa.

Os tumores das glândulas hepatoides representaram 40,74% (11/27) dos tumores cutâneos em cães. A positividade e a imreatividade à CK14, à vimentina, ao p63, ao EGRF e ao índice Ki-67 estão distribuídas na Tab. 3. No entanto, nos tumores benignos, o índice de Ki-67 foi leve em 16,67% (1/6), moderado em 33,33% (2/6) e acentuado em 50,00% (3/6). Os tumores malignos

Caracterização anatomopatológica...

apresentaram proliferação Ki-67 acentuada em 100,0% (5/5) dos casos (Fig. 1 e 2).

Os tumores das glândulas sebáceas representaram 29,63% (8/27) dos casos. A positividade e a imureatividade à CK14, à vimentina, ao p63, ao EGRF e ao índice Ki-67 estão distribuídas na Tab. 4. O índice Ki-67 foi leve em 50,00% (2/4), moderado em 25,00% (1/4) e acentuado em 25,00% (1/4) dos tumores benignos. No entanto, nos tumores malignos, o índice de Ki-67 foi acentuado em 100,0% (4/4) dos casos (Fig. 1 e 2).

O tumor da glândula de meibômio representou 3,70% (1/27) dos casos. A positividade e a

imureatividade à CK14, à vimentina, ao p63, ao EGRF e ao índice Ki-67 estão distribuídas na Tab. 5. O Ki-67 foi positivo, apresentando um índice de Ki-67 acentuado (Fig. 1 e 2).

Os tumores das glândulas sudoríparas apócrinas representaram 25,92% (7/27) dos casos. A positividade e a imureatividade à CK14, à vimentina, ao p63, à calponina, ao EGRF e ao índice Ki-67 estão distribuídas na Tab. 6. Os tumores benignos apresentaram índice de Ki-67 moderado em 50,00% (1/2) e acentuado em 50,00% (1/2). Nos tumores malignos, o índice de Ki-67 apresentou-se acentuado em 100,0% (4/4) dos casos (Fig. 1 e 2).

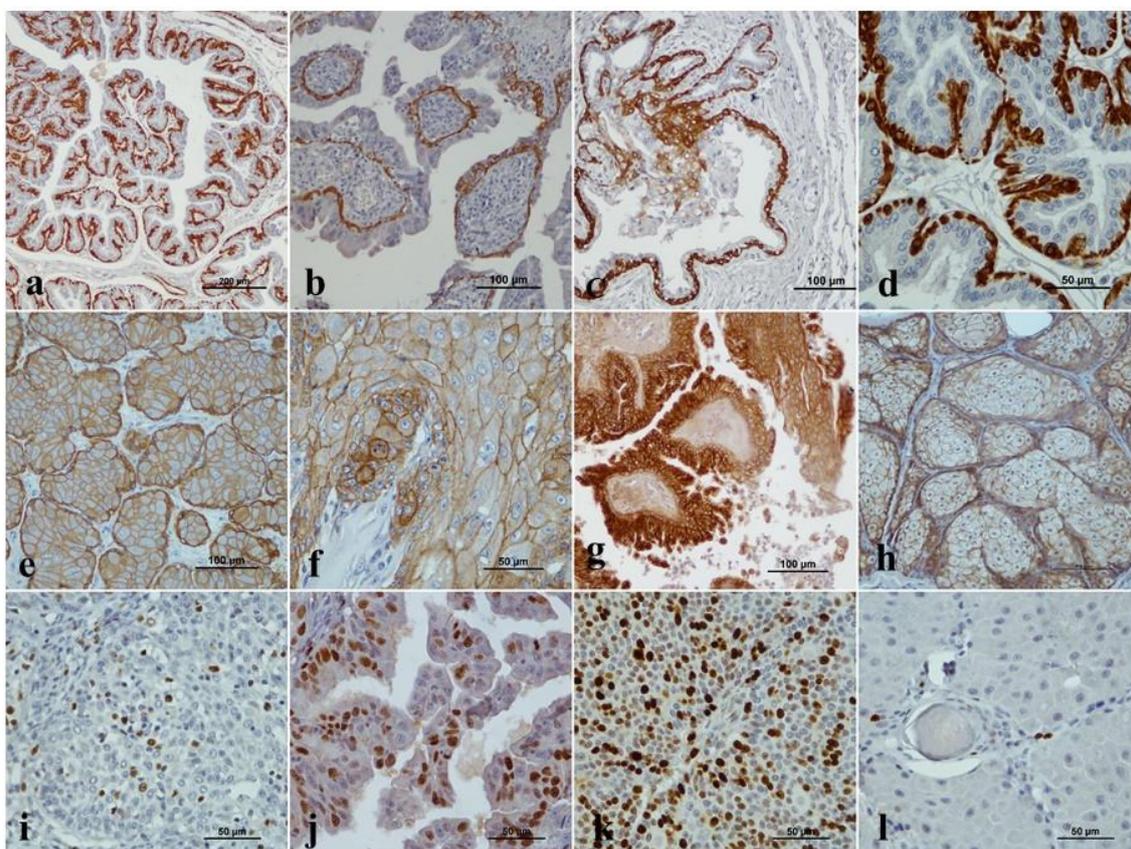


Figura 2. Tumores das glândulas cutâneas em cães: expressão imuno-histoquímica de calponina, EGFR e Ki-67. a) Adenoma quístico da glândula apócrina, positivo para calponina. 10x. Caso 15. b) Carcinoma papilar da glândula apócrina, positivo para calponina. 20x. Caso 14. c) Carcinoma ductal da glândula apócrina com focos de diferenciação escamosa, positivo para calponina. 20x. Caso 3. d) Adenoma cístico da glândula sudorípara apócrina, positivo para calponina. 40x. Caso 15. e) Adenoma da glândula hepatoide, positivo para EGFR. 20x. Caso 11. f) Carcinoma da glândula hepatoide, positivo para EGFR. 40x. Caso 7. g) Carcinoma ductal das glândulas sudoríparas apócrinas com focos de diferenciação escamosa, positivo para EGFR. 20x. Caso 9. h) Hiperplasia da glândula sebácea, positiva para EGFR. 20x. Caso 26. i) Carcinoma da glândula sebácea, positivo para Ki-67. 40x. Caso 25. j) Carcinoma papilar da glândula sudorípara apócrina, positivo para Ki-67. 40x. Caso 14. k) Eitelioma da glândula sebácea, positivo para Ki-67. 40x. Caso 20. l) Hiperplasia da glândula hepatoide, positiva para Ki-67. 40x. Caso 23.

Tabela 3. Expressão dos anticorpos CK14, vimentina, p63, EGRF e índice Ki-67 em tumores das glândulas hepatoides em cães

Nº dos casos*	Anticorpos									
	CK14		Vimentina		p63		EGFR		Ki-67 (índice)	
	CEB	CDS	CEB	CDS	CEB	CDS	CEB	CDS		
02	+++	+++	+++	---	+++	+	+++	+++	+++	
04	+++	+++	+	---	+++	++	+++	+++	+++	
07	+++	+++	+++	---	+++	++	+++	+++	+++	
10	+++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	
11	+++	+	+++	---	+++	++	++	+++	+++	
12	+++	+++	+++	---	+++	+	+++	+++	+++	
13	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	
16	+++	+	+++	+	+++	++	+++	+++	++	
17	+++	+++	+++	+	+++	+	+++	+++	+++	
22	+++	+++	+++	+	+++	+	+++	+++	++	
23	+++	++	++	+	+++	+	+	+++	+	
Total/positivos (%/nº)	100,0 (11/11)	100,0 (11/11)	100,0 (11/11)	54,54 (6/11)	100,0 (11/11)	100,0 (11/11)	100,0 (11/11)	100,0 (11/11)	100,0 (11/11)	
	Imunorreatividade (%/nº)									
(+++)	100,0 (11/11)	72,72 (8/11)	72,72% (8/11)	----	100,0 (11/11)	----	81,82 (9/11)	90,91 (10/11)	72,72 (8/11)	
(++)	----	9,09 (1/11)	18,18 (2/11)	33,33 (2/6)	----	54,54 (6/11)	9,09 (1/11)	9,09 (1/11)	18,18 (2/11)	
(+)	----	18,18 (2/11)	9,09 (1/11)	66,67 (4/6)	----	45,46 (5/11)	9,09 (1/11)	----	9,10 (1/11)	
		(2/11)	(1/11)	(4/6)		(5/11)	(1/11)		(1/11)	

CEB = células epiteliais basais; CDS = células de diferenciação sebácea; +++ = acentuada; ++ = moderada; + = leve.

Tabela 4. Expressão dos anticorpos CK14, vimentina, p63, EGRF e índice Ki-67 em tumores das glândulas sebáceas em cães

Nº dos casos*	Anticorpos									
	CK14		Vimentina		p63		EGFR		Ki-67 (índice)	
	CEB	CDS	CEB	CDS	CEB	CDS	CEB	CDS		
01	+++	+++	---	---	+++	---	++	---	+	
05	+++	+++	---	---	---	---	---	+++	+	
06	+++	++	---	---	+++	---	+++	+++	+++	
18	+++	+	++	---	+++	+	+++	---	+++	
20	+++	+++	+++	---	+++	+	+++	+++	+++	
25	+++	++	+++	---	+++	+++	+++	+++	+++	
26	+++	+++	---	---	++	---	+++	+++	++	
27	+++	+++	+++	---	+++	---	+++	+	+++	
Total/ Posit. ^b (%/nº)	100,0 (8/8)	100,0 (8/8)	50,0 (4/8)	----	87,50 (7/8)	37,50 (3/8)	87,50 (7/8)	75,00 (6/8)	100,0 (8/8)	
	Imunorreatividade (%/nº)									
(+++)	100,0 (11/11)	62,50 (8/11)	75,00 (3/4)	----	85,71 (6/7)	33,33 (1/3)	85,71 (6/7)	83,33 (5/6)	62,50 (5/8)	
(++)	----	12,50 (1/11)	25,00 (1/4)	----	14,29 (1/7)	----	14,29 (1/7)	----	12,50 (1/8)	
(+)	----	25,00 (2/11)	----	---	----	66,67 (2/3)	----	16,67 (1/6)	25,00 (2/8)	
		(2/8)				(2/3)		(1/6)	(2/8)	

CEB = células epiteliais basais; CDS = células de diferenciação sebácea; (+++) = acentuada; (++) = moderada; (+) = leve.

Caracterização anatomopatológica...

Tabela 5. Expressão dos anticorpos CK14, vimentina, p63, EGFR e índice Ki-67 em tumor da glândula de meibômio em cães

Nº dos Casos ^a	Anticorpos									
	CK14		Vimentina		p63		EGFR		Ki-67	
	CEB	CDS	CEB	CDS	CEB	CDS	CEB	CDS	(índice)	
19	+++	+++	+++	+	+++	+	+++	++	+++	
Total/Posit. ^b (%/nº)	100,0 (1/1)	100,0 (1/1)	100,0 (1/1)	100,0 (1/1)	100,0 (1/1)	100,0 (1/1)	100,0 (1/1)	100,0 (1/1)	100,0 (1/1)	100,0 (1/1)
Imunoreatividade (%/nº)										
(+++)	100,0 (11/11) (1/1)	100,0 (1/1) (1/1)	100,0 (1/1) (1/1)	----	100,0 (1/1) (1/1)	----	100,0 (1/1) (1/1)	----	100,0 (1/1) (1/1)	100,0 (1/1) (1/1)
(++)	----	----	----	----	----	----	----	100,0 (1/1) (1/1)	----	----
(+)	----	----	----	100,0 (1/1) (1/1)	----	100,0 (1/1) (1/1)	----	----	----	----

CEB = células epiteliais basais; CDS = células de diferenciação sebácea; +++ = acentuada; ++ = moderada; + = leve.

Tabela 6. Expressão dos anticorpos CK14, vimentina, p63, calponina, vimentina, EGFR e índice Ki-67 em tumores das glândulas sudoríparas apócrinas em cães

Nº dos casos ^a	Anticorpos										
	CK14		Vimentina		p63		Calponina		EGFR		Ki-67
	CM	CL	CM	CL	CM	CL	CM	CL	CM	CL	(índice)
03	+++	+	+++	---	+++	---	+++	----	+++	+++	+++
08	+++	---	+++	---	+++	---	+++	----	+++	+++	---- ^a
09	+++	---	+++	+	+++	---	+++	----	+	+++	+++
14	+++	---	+++	---	+++	---	+++	----	+++	+	+++
15	+++	+	+++	---	+++	---	+++	----	+++	---	+++
21	+++	++	+++	---	+++	---	+++	----	++	++	++
24	+++	+	+++	+	+++	---	+++	----	+++	---	+++
Total/Posit. ^b (%/nº)	100,0 (7/7)	57,14 (4/7)	100,0 (7/7)	28,57 (2/7)	100,0 (7/7)	----	100 (7/7)	----	100 (7/7)	71,43 (5/7)	87,50 (7/8)
Imunoreatividade (%/nº)											
(+++)	100,00 (7/7) (7/7)	---	100,0 (7/7) (7/7)	----	100,0 (7/7)	----	100 (7/7) (7/7)	----	71,42 (5/7) (5/7)	60,00 (3/5) (3/5)	83,33 (5/6) (5/6)
(++)	----	25,00 (1/4) (1/4)	----	----	----	----	----	----	14,29 (1/7) (1/7)	20,00 (1/5) (1/5)	16,67 (1/6) (1/6)
(+)	----	75,00 (3/4) (3/4)	----	100,0 (2/2) (2/2)	----	----	----	----	14,29 (1/7) (1/7)	20,00 (1/5) (1/5)	----

CM = células mioepiteliais; CL = células luminais; (p/n) = positivo/negativo; +++ = acentuada; ++ = moderada; + = leve; ^a(índice excluído devido à negatividade na epiderme, o qual funciona como controle positivo interno) e ^bpositivos.

DISCUSSÃO

No presente estudo, os tumores de glândulas cutâneas de origem sebácea foram superiores aos de origem apócrina. Resultados semelhantes foram observados por Saraiva (2007), que realizaram um estudo retrospectivo coletando

dados por um período de 10 anos. No entanto, o número de amostras no presente estudo foi menor, não sendo diagnosticados casos de tumores apócrinos modificados. Não se verificou predisposição racial, devido ao fato de a maioria dos cães não ter raça definida e ao reduzido número de casos estudados. No entanto, estudos

citam algumas raças, como Cocker Spaniel Inglês, Cocker Spaniel, Poodle, Beagle, Samoieda, Husky Siberiano, Malamute do Alasca, West Highland White Terrier, Cairn Terrier, Dachshund, Kerry Blue Terrier, Schnauzer, Boston Terrier e Shih-Tzu, com elevado risco para desenvolver esses tumores e outras descritas com baixo risco de desenvolvimento dos mesmos tumores (Thomas e Fox, 1998; Scott *et al.*, 2001; Goldschmidt e Hendrick, 2002; Gross *et al.*, 2005).

Clinicamente, os tumores apresentavam-se como lesões nodulares cutâneas ulceradas e não ulceradas, distribuídas em vários sítios anatômicos, variando o tamanho de milímetros a centímetros (Goldschmidt e Hendrick, 2002; Gross *et al.*, 2005). A distribuição anatômica dos tumores no presente estudo foi semelhante à observada por Saraiva (2007), entretanto há autores que relatam que a localização preferencial desses tumores é as regiões axilar e inguinal (Goldschmidt e Hendrick, 2002) e os membros (Gross *et al.*, 2005). Outros estudos, porém, apontam que eles ocorrem em qualquer localização (Pulley e Stannard, 1990; Kalaher *et al.*, 1990 e Simko *et al.*, 2003).

A avaliação imuno-histoquímica permitiu a obtenção de resultados descritivos dos 27 tumores estudados, com uma melhor caracterização e interpretação dos elementos capazes de favorecer um diagnóstico mais preciso. Todavia, nem sempre esses resultados são específicos ou conclusivos. No presente estudo, o anticorpo antiqueratina 14 (CK14) foi positivo em todos os tumores das glândulas sebáceas e sebáceas modificadas (hepatoides e meibômio) com imunomarcagem das células epiteliais basais e das células de diferenciação sebácea. Esses resultados assemelham-se aos descritos na literatura (Walter, 2000; Vos *et al.*, 1993 e Saraiva, 2007). No entanto, as células de diferenciação sebácea do tumor da glândula de meibômio (caso 19) foram acentuadamente mais imunorreativas. Esse fato provavelmente se deve a características próprias do tumor e/ou a modificações fenotípicas em células basaloideas. Nos tumores das glândulas sudoríparas apócrinas, o anticorpo CK14 foi positivo em todos os casos estudados, apresentando positividade para as células mioepiteliais e as epiteliais luminais (secretoras). Em outros estudos, entretanto, a imunomarcagem das células

luminais (secretoras) não foi observada, tanto no homem quanto no cão e no gato (Espinosa de Los Monteros *et al.*, 2002; Gama *et al.*, 2003; Araújo *et al.*, 2006; Faustino e Dias Pereira, 2007). A marcação das células luminais (secretoras) está associada a modificações fenotípicas de tumores apócrinos. O mesmo fato ocorreu em células epiteliais luminais de carcinomas complexos da mama de gatas (Seixas *et al.*, 2008).

A vimentina é expressa nas glândulas hepatoides normais e em outras glândulas sebáceas modificadas (Vos *et al.*, 1993). Essa característica foi demonstrada no presente estudo com a positividade em 100% dos tumores hepatoides, que, além do estroma, também apresentaram imunorreatividade nas células epiteliais basais e nas células de diferenciação sebácea. Resultados semelhantes foram descritos por Alves (1999) e Saraiva (2007). No presente trabalho, os tumores sebáceos foram positivos em 50,00% dos casos (nos casos 18, 20, 25 e 27), apresentando imunomarcagem nas células epiteliais basais e não expressando a vimentina nas células de diferenciação sebácea. No entanto, a imunomarcagem se deu apenas nos tumores malignos. Esse fato é consequência da modificação fenotípica epitelial mesenquimal que ocorre em adenocarcinomas sebáceos, tanto em animais quanto em seres humanos (Saraiva, 2007; Shinozak *et al.*, 2008).

No presente estudo, o epiteloma da glândula de meibômio (caso 19) expressou a vimentina, mantendo o mesmo padrão e as características descritas por Vos *et al.* (1993). Os mesmos resultados não foram observados em estudos com carcinomas de glândulas sebáceas modificadas, adenocarcinomas de meibômio em cães (Varga *et al.*, 2000) e carcinoma sebáceo mamário de mulher (Yuan *et al.*, 2008).

Todos os tumores apócrinos demonstraram-se positivos à vimentina com imunomarcagem das células mioepiteliais em todos os casos, porém em apenas dois casos (casos 08 e 24) houve imunomarcagem das células epiteliais luminais. Em relação à imunomarcagem das células mioepiteliais, esses resultados corroboram os descritos em glândulas mamárias de cadelas (Gärtner *et al.*, 1999 e Gama *et al.*, 2003) e em tumores das glândulas apócrinas de cães (Ferrer *et al.*, 1990; Nibe *et al.*, 2005 e Saraiva, 2007).

Em um estudo com carcinomas complexos da glândula mamária de gatas, há referência à imunomarcção em células epiteliais luminais pela vimentina (Seixas *et al.*, 2008). A marcação das células epiteliais luminais pela vimentina pode estar associada à transição epitelial-mesenquimatosa, à histogênese mioepitelial e à histogênese a partir de células com potencial de diferenciação bilinear (Korsching *et al.*, 2005). No entanto, não há dados que fundamentem a origem das células epiteliais positivas para a vimentina nos adenocarcinomas cutâneos do cão.

O gene p63 é expresso nas células basais estaminais de vários órgãos epiteliais, desempenhando uma função importante na manutenção do compartimento das células estaminais nesses órgãos (Barbareschi *et al.*, 2001). No presente estudo, a expressão do p63 nos tumores das glândulas sebáceas, hepatoides e de meibômio ocorreu em todos os casos estudados, marcando as células epiteliais basais e as células de diferenciação sebácea. Resultados semelhantes foram observados por Saraiva (2007) em tumores malignos sebáceos e hepatoides e em carcinomas sebáceos no homem (Qureshi *et al.*, 2004).

Nos tumores apócrinos, a imunexpressão do p63 ocorreu em todos os casos, entretanto só as células mioepiteliais foram positivas. Esses resultados mantêm o mesmo padrão e as características do anticorpo em relação às glândulas apócrinas e às glândulas apócrinas modificadas descritas na literatura (Barbareschi *et al.*, 2001). Resultados semelhantes foram encontrados em tumores de glândula mamária de cadela (Gama *et al.*, 2003), em tumores malignos de glândulas apócrinas cutâneas (Saraiva, 2007) e em tumores apócrinos no homem (Qureshi *et al.*, 2004; Ivan *et al.*, 2005).

A calponina é uma proteína que interage na contração da musculatura lisa, sendo expressa nas células mioepiteliais. No presente estudo, a calponina foi utilizada apenas nos tumores apócrinos, sendo expressa nas células mioepiteliais de todos os casos. No entanto, além da imunomarcção dos tumores apócrinos, a calponina também foi evidenciada em áreas de diferenciação escamosa, em células vasculares no estroma e em proliferações sólidas de células mioepiteliais. Essas características se devem à capacidade de diferenciação epitelial-mioepilial,

que pode ocorrer em tumores apócrinos malignos (Gimona *et al.*, 1990). Em outros estudos foram verificadas as mesmas características, em que a calponina foi expressa em tumores mamários complexos e mistos de cadelas e em tumores malignos de glândulas apócrinas e ceruminosas de cães (Espinosa de Los Monteros *et al.*, 2002; Saraiva *et al.*, 2008).

Não foi encontrado nenhum trabalho sobre avaliação da expressão do EGFR em glândulas cutâneas de animais, por isso considera-se este o primeiro trabalho nesse sentido. O EGFR foi positivo em todos os tumores das glândulas hepatoides, sebáceas e de meibômio, apresentando imunomarcção tanto nos tumores malignos quanto nos benignos. A distribuição da imunomarcção pelo EGFR ocorreu nas células epiteliais basais e nas células de diferenciação sebácea. Entretanto, em dois casos (01 e 18) de tumores sebáceos, não houve imunomarcção das células de diferenciação sebácea. Em estudo com tumores sebáceos benignos e malignos, a imunomarcção ocorreu tanto nas células epiteliais basais quanto nas de diferenciação sebácea. No entanto, a imunomarcção foi mais intensa nos tumores malignos em relação aos benignos (Matias e Orentreich, 1983). No presente estudo, porém, não se verificou essa relação. Tal fato provavelmente esteja relacionado a características próprias dos tumores estudados e ao pequeno número de casos. Os tumores das glândulas apócrinas foram positivos ao EGFR em todos os casos, ocorrendo imunomarcção das células mioepiteliais e das células epiteliais luminais (secretoras), no entanto, em dois casos (21 e 24), foram negativos para as células epiteliais luminais. Provavelmente essa negatividade esteja associada à inatividade da tirosina quinase nos dois casos, consequentemente, faltam receptores para o EGFR desempenhar sua função (Bhargava *et al.*, 2005). Gama *et al.* (2009) estudaram a expressão do EGFR na glândula mamária de cadelas (hiperplasia, tumores benignos e malignos) e encontraram resultados semelhantes aos do presente estudo.

Os índices proliferativos elevados, obtidos pela imunexpressão do anticorpo anti-Ki-67, estão associados ao comportamento biológico do tumor, ao comportamento clinicopatológico maligno e a um pior prognóstico de vários tumores nos animais domésticos (Gerald *et al.*,

2000). Na avaliação do índice Ki-67, foi possível observar que a imunomarcagem comportou-se da mesma forma em todos os grupos de tumores estudados. Nos tumores malignos, o índice de Ki-67 foi acentuado em todos os casos. Nos tumores benignos, o índice Ki-67 variou de leve, moderado a acentuado. Outros estudos obtiveram resultados semelhantes em tumores de glândulas hepatóides e em epitelomas sebáceos de cães (Alves, 1999; Yoon e Park, 2016). Em tumores mamários caninos, os índices de proliferação usando a detecção imuno-histoquímica do Ki-67 foram mais intensos nos tumores malignos em relação aos benignos (Peña *et al.*, 1998). No entanto, em tumores hepatóide caninos, aspectos como infiltração, invasão e perda da lobulação influenciaram para o índice de Ki-67 elevado (Alves, 1999). Peña *et al.* (1998) observaram que valores altos do índice de Ki-67 estavam diretamente relacionados com fatores como metástases, morte por neoplasia, baixas taxas de sobrevivência livres de doença e, em geral, com baixas taxas de sobrevivência. Entretanto, no presente estudo, devido ao número reduzido das amostras, não se fez estudo estatístico dos aspectos clínicos ou morfológicos, detendo-se apenas na caracterização histológica e imuno-histoquímica.

CONCLUSÕES

Conclui-se que os tumores das glândulas cutâneas afetam cães de qualquer raça e não apresentam predisposição por sexo. Porém, os cães com idade igual ou superior a sete anos são mais afetados. Entre os tipos de tumores glandulares cutâneos, os mais frequentes foram os tumores das glândulas hepatóides, seguidos dos tumores sebáceos, tumores apócrinos e tumores da glândula de meibômio. Todos esses tumores tiveram apresentação nodular subcutânea, com superfície ulcerada ou não. O painel imuno-histoquímico variou entre os diferentes tipos de tumores. O anticorpo anti-CK14 foi expresso de forma acentuada nas células basais, células de diferenciação sebácea e células mioepiteliais, porém não apresentou marcação exclusiva. A vimentina marca satisfatoriamente as células basais dos tumores das glândulas hepatóides e de meibômio, mas o mesmo fato não ocorre nos tumores sebáceos. Nos tumores das glândulas apócrinas, esse anticorpo é um marcador sensível para as células mioepiteliais. O anticorpo p63 é um marcador

sensível e específico de células basais e de células mioepiteliais dos tumores de glândulas cutâneas. A calponina marca as células mioepiteliais das glândulas apócrinas. O anticorpo EGFR é sensível para as células basais e de diferenciação sebácea dos tumores das glândulas hepatóides e de meibômio, mas a mesma sensibilidade não ocorre nos tumores sebáceos. Nos tumores apócrinos, esse marcador é sensível para as células mioepiteliais, no entanto, nas células epiteliais luminais, não foi observada a mesma sensibilidade. O índice de marcação de Ki-67 foi mais acentuado nos tumores malignos em todos os grupos de tumores de glândulas cutâneas estudados. Estudos futuros com maior número de casos, correlacionando dados epidemiológicos, clínicos, dermatológicos, patológicos (macroscopia e microscopia) e imuno-histoquímicos, fazem-se necessários.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos; ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV); ao Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica (LHAP) da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro – Vila Real, Portugal; e à Lígia Lourenço, técnica em anatomia patológica. Ao CNPq, pela Bolsa de Produtividade do Orientador (Processo nº 302082/2014-0).

REFERÊNCIAS

- ALVES, A.G.A. *Estudo histológico e imuno-histoquímico dos tumores das glândulas hepatóides caninas: marcadores celulares, fracção do crescimento, gene supressor p53 e hormonodependência. Relação com os aspectos clínicos.* 1999. 234f. Tese (Doutoramento em Medicina Veterinária) - Centro de Ciência Anima e Veterinária - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, POR.
- ARAÚJO, VC.; ALTEMANI, A.; FURUSE, C. *et al.* Immunoprofile of reactive salivary myoepithelial cells in intraductal areas of carcinoma ex-pleomorphic adenoma. *Oral Oncol.*, v.42, p.1011-1016, 2006.

- BARBARESCHI, M.; PECCIARINI, L.; CANGI, M.G. *et al.* p63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast. *Am. J. Surg. Pathol.*, v.25, p.1054-1060, 2001.
- BHARGAVA, R.; GERALD, W.L.; LI, A.R. *et al.* EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR activating mutations. *Modern Pathol.*, v.18, p.1027-1033, 2005.
- ESPINOSA DE LOS MONTEROS, A.; MILLÁN, M.Y.; ORDÁS, J. *et al.* Immunolocalization of the smooth muscle-specific protein calponin in complex and mixed tumors of the mammary gland of the dog: assessment of the morphogenetic role of the myoepithelium. *Vet. Pathol.*, v.39, p.247-256, 2002.
- FAUSTINO, A.M.; DIAS PEREIRA, P.A. Salivary malignant myoepithelioma in a dog. *Vet. J.*, v.173, p.225-228, 2007.
- FERRER, L.; RABANAL, R.M.; FONDEVILA, D. Immunocytochemical demonstration of intermediate filament proteins, S-100 protein and CEA in apocrine sweat glands and apocrine gland derived lesions of the dog. *J. Vet. Med.*, v.37, p.569-576, 1990.
- GAMA, A.; ALVES, A.; GÄRTNER, F. *et al.* p63: a novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues. *Vet. Pathol.*, v.40, p.412-420, 2003.
- GAMA, A.; GÄRTNER, F.; ALVES, A. *et al.* Immunohistochemical expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Res. Vet. Sci.*, v.87, p.432-437, 2009.
- GÄRTNER, F.; GERALDES, M.; CASSALI, G. *et al.* Measurement and immunohistochemical characterization of epithelial and mesenchymal cells in canine mixed mammary tumours: putative evidence for a common histogenesis. *Vet. J.*, v.158, p.39-47, 1999.
- GERALDES, M.; GÄRTNER, F.; SCHMITT, F. Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. *Vet. Rec.*, v.146, p.403-406, 2000.
- GIMONA, M.; HERZOG, M.; VANCEKERCKHOVE, J. *et al.* Smooth muscle specific expression of calponin. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.*, v.274, p.159-162, 1990.
- GOLDSCHMID, T.M.H.; DUNSTAN, R.W.; STANNARD, A.A. *et al.* *Histological classification of epithelial and melanocytic tumors of the skin 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 on Comparative Oncology. Washington: Armed, 1998. p.105.
- GOLDSCHMIDT, M.H.; HENDRICK, M.J. Tumors of the skin and soft tissues. In: MEUTEN, D.J. 4.ed. *Tumors in domestic animals.* Ames: Wiley Blackwell, 2002. cap.2, p.45-74.
- GROSS, T.L.; IHRKE, P.J.; WALDER, E.J. *et al.* Epithelial neoplasms and other tumors. Sebaceous tumors. Sweat gland tumors. In: GROSS T.L. *Skin diseases of the dog and cat.* Clinical and histopathologic diagnosis. 2.ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. p.641-689.
- IVAN, D.; DIWAN, A.H.; PRIETO, V.G. Expression of p63 in primary cutaneous adnexal neoplasms and adenocarcinoma metastatic to the skin. *Modern Pathol.*, v.18, p.137-142, 2005.
- KALAHAR, K.M.; ANDERSON, W.I.; SCOTT, D.W. Neoplasms of the apocrine sweat glands in 44 dogs and 10 cats. *Vet. Rec.*, v.127, p.400-403, 1990.
- KIRPENSTEIJN, J. Treatment of aural neoplasia in dogs and cats. In: PROCEEDINGS OF THE NORTH AMERICAN VETERINARY CONFERENCE, 20., 2006, Orlando. *Proceedings...* Orlando: [s.n.], 2006. p.793-796.
- MATIAS; J.R.; ORENTREICH, N. Stimulation of hamster sebaceous glands by epidermal growth factor. *J. Invest. Dermatol.*, v.80, p.516, 1983.
- NIBE, K.; UCHIDA, K.; ITOH, T. *et al.* A case of canine apocrine sweat gland adenoma, clear cell variant. *Vet. Pathol.*, v.42, p.215-218, 2005.
- PENÃ, L.L.; NIETO, A.I.; PÉREZ-ALENZA, D. *et al.* Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.10, p.237-246, 1998.

- PETTERINO, C.; MARTINI, M.; CASTAGNARO, M. Immunohistochemical detection of growth hormone (GH) in canine hepatoid gland tumors. *J. Vet. Med. Sci.*, v.66, p.569-572, 2004.
- POLAK, J.M.; VAN NOORDEN, S. Introduction to immunocytochemistry. *J. Anat.*, v.202, p.176, 2003.
- PULLEY, L.T.; STANNARD, A. Tumors of the skin and soft tissues. In: MOULTON, J.E. *Tumors in domestic animals*. 3.ed. Berkeley and Los Angeles: University of California Press, 1990. p.23-72.
- QURESHI, H.S.; ORMSBY, A.H.; LEE, M.W. et al. The diagnostic utility of p63, CK5/6, CK7, and CK20 in distinguishing primary cutaneous adnexal neoplasms from metastatic carcinomas. *J. Cutan. Pathol.*, v.31, p.145-152, 2004.
- SARAIVA, A.L. *Contribuição para o estudo da biopatologia dos adenocarcinomas cutâneos em canídeos*. 2007. 98f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, POR.
- SARAIVA, A.L.; GÄRTNER, F.; PIRES, M.A. Expression of p63 normal canine skin and primary cutaneous glandular carcinoma. *Vet. J.*, v.177, p.136-140, 2008.
- SCOTT, D.W.; MILLER J.R.; W.H.; GRIFFIN, C.E. Neoplastic and non-neoplastic tumors. In: KERSEY, R. *Muller & Kirk's small animal dermatology*. 6.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001. p.1-70.
- SEIXAS, F.; PIRES, M.A.; LOPES, C.A. Complex carcinomas of the mammary gland in cats: Pathological and immunohistochemical features. *Vet. J.*, v.176, p.210-215, 2008.
- SHINOZAK, A.; NAGAO, T.; ENDO, H. et al. Sebaceous epithelial-myoepithelial carcinoma of the salivary gland: clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 6 cases of a new histologic variant. *Am. J. Surg. Pathol.*, v.32, p.913-926, 2008.
- SIMKO, E.; WILCOCK B.P.; YAGER, J.A. A retrospective study of 44 canine apocrine sweat gland adenocarcinomas. *Can. Vet. J.*, v.44, p.38-42, 2003.
- SISCHO, W.M.; IHRKE, P.J.E.; FRANTI, C.E. Regional distribution of 10 common skin diseases in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.195, p.752-756, 1989.
- THOMAS, C.; FOX, L.E. Tumors of the skin and subcutis. In: Morrison, W.B. *Cancer in dogs and cats – medical and surgical management*. [Jackson]: Teton New Media, 1998. p.489-499.
- VARGA, Z.; KOLB, S.A.; FLURY, R. et al. Sebaceous carcinoma of the breast. *Pathol. Int.*, v.50, p.63-66, 2000.
- VOS, J.H.; TSGAM VAN DEN, I.; RAMAEKERS, F.C.S. et al. The expression of keratins, vimentin, neurofilament proteins, smooth muscle actin, neuron-specific enolase, and synaptophysin in tumors of the specific glands in the canine anal region. *Vet. Pathol.*, v.30, p.352-361, 1993.
- WALTER, J.A. Cytokeratin profile of canine epithelial skin tumours. *J. Comp. Pathol.*, v.122, p.278-287, 2000.
- WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. Tumors of skin and subcutaneous tissues. In: WITHROW & MECEWEN'S. *Small Animal Clinical Oncology*. 4.ed. Missouri: Saunders. 2007.p.401-475.
- YOON, J.S.; PARK, J. Immunohistochemical characterization of sebaceous epithelioma in two dogs. *Iran. J. Vet. Res.*, v.17, p.134-136, 2016.
- YUAN, D.; GOO, M.; YANG, H. et al. Adeno carcinoma of meibomian glands and moll in the eyelid of canine. *J. Lif. Sci.*, v.18. p.414-417, 2008.