

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E
MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS NO CÂNCER
DE MAMA DE GATAS**

MARIANA FERNANDES JORGE

**BOTUCATU – SP
2016**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E
MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS NO CÂNCER
DE MAMA DE GATAS**

MARIANA FERNANDES JORGE

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Botucatu - SP, para obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Clínica Médica

Orientador: Júlio Lopes Sequeira

Co-orientador: Alessandre Hataka

BOTUCATU – SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Jorge, Mariana Fernandes.

Caracterização histopatológica e marcadores
imuno-histoquímicos no câncer de mama de gatas / Mariana
Fernandes Jorge. - Botucatu, 2016

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

Orientador: Júlio Lopes Sequeira

Coorientador: Alessandre Hataka

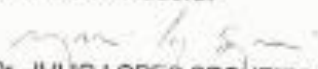
Capes: 50501062

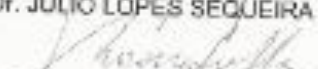
1. Mamas - Câncer. 2. Felídeo - Doenças. 3. Caderinas.
4. Imunohistoquímica. 5. Histopatologia veterinária. 6.
Índice Mitótico.

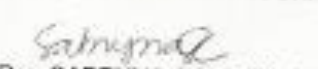
Palavras-chave: CK14; Caderinas; índice apoptótico; índice
mitótico; índice proliferativo.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARIANA FERNANDES JORGE, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA, DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA.

Aos 19 dias do mês de maio do ano de 2016, às 14:00 horas, no(a) ANFITEATRO DA PÓS GRADUAÇÃO, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. JULIO LOPES SEQUEIRA - Orientador(a) do(a) Departamento de Clínica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia UNESP/ Botucatu, Profa. Dra. NOEME SOUSA ROCHA do(a) Departamento de Clínica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP Botucatu, Profa. Dra. SABRYNA GOUVEIA CALAZANS do(a) Universidade de Franca / UNIFRAN - Franca/SP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de MARIANA FERNANDES JORGE, intitulada **CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS NO CÂNCER DE MAMA DE GATAS**. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: Aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. JULIO LOPES SEQUEIRA


Profa. Dra. NOEME SOUSA ROCHA


Profa. Dra. SABRYNA GOUVEIA CALAZANS

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Assistentes Doutores, Júlio Lopes Sequeira – orientador, e à Alessandre Hataka - co-orientador, por toda dedicação, paciência e amizade durante todo o período de produção e execução deste trabalho.

À professora Assistente Doutora Noeme Sousa Rocha, pela disponibilidade quanto a docente e também pelo auxílio com materiais. Obrigada pelas palavras de incentivo técnico e também pessoais.

À professora Assistente Doutora Renée Laufer Amorim, a qual foi solicitada em ajudar com seu conhecimento, abrindo portas para discussões com profissionais extremamente gabaritados sobre o assunto.

Ao Professor Doutor Rafael Torres que trabalhou conjuntamente comigo para padronizar e me ensinar técnicas laboratoriais.

Ao Professor Doutor Felipe Sueiro que abriu as portas de seu laboratório me permitindo acesso aos seus dados e materiais.

Aos pós-graduandos e residentes do Serviço de Patologia Veterinária, por me acolheram com carinho oferecendo auxílio sempre que necessário.

À médica veterinária Adriana Cristina Januário e toda equipe da clínica veterinária Reino Animal, pelo incentivo a minha pesquisa. Sem o auxílio e carinho de vocês não seria possível realizar esta dissertação concomitante a nossa rotina de trabalho.

E finalmente aos animais que respeitosamente permitiram este trabalho. Que as conclusões obtidas aqui possam ajudar a outros no futuro.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Graduação histopatológica segundo Elston & Ellis (1998)	17
TABELA 2 - Graduação das neoplasias malignas de mama segundo Elston & Ellis 1998	17
TABELA 3 - Painel de anticorpos utilizados nas amostras de neoplasias malignas de mama de gatas	19
TABELA 4 - Diluições, tempo de incubação e sistema de amplificação e detecção utilizados.....	19
TABELA 5 - Número e percentual de cada tipo histológico dos carcinomas mamários selecionadas para o estudo.....	22
TABELA 6 - Frequência de casos por tipo e grau histológico dos carcinomas de mama em gatas	25
TABELA 7 - Frequência de invasão vascular e tipo histológico das neoplasias mamárias malignas de gatas	25
TABELA 8 - Tipos histológico e seus respectivos índices mitóticos (IM) nos 31 casos de carcinoma mamário nas gatas.....	27
TABELA 9 - Número médio de mitoses apresentados em cada tipo histopatológico de carcinoma mamário das gatas	28
TABELA 10 - IP médio de cada grau histológico apresentado pelas gatas com carcinoma mamário.....	28
TABELA 11 - Valor Médio do IP apresentado pelas gatas com neoplasia maligna mamária segundo tipo histopatológico	29
TABELA 12 - Índice proliferativo médio observado em cada escore do índice mitótico dos carcinomas mamários das gatas.....	31
TABELA 13 - Índice apoptótico médio apresentado por cada grau histológico nas 31 amostras de carcinoma mamário de gatas.....	32
TABELA 14 - Tipos histológicos e seus respectivos índices de apoptose nas 31 amostras de carcinoma mamário em gatas	32
TABELA 15 - Tipo e grau histológico das 31 amostras de carcinoma mamário em gatas com marcação positiva para CK14.....	34

TABELA 16 - Marcação de CK14 e alfa-SMA quanto aos tipos e graduação histológicos das 31 amostras de carcinoma mamário em gatas	36
TABELA 17 - E-cad em escore e em percentual segundo a graduação da neoplasia das 31 amostras de carcinoma mamário de gatas	38
TABELA 18 - E-cad em escore e em percentual segundo tipo histológico das 31 amostras de carcinoma mamário de gatas	39
TABELA 19 - Relação da marcação positiva e negativa de E-cad e P-cad nas 31 amostras de carcinoma mamário de gatas.	41

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Fotomicrografia de carcinoma mamário túbulo-papilífero em gata. Caracterizado pelas formações de túbulos e/ou projeções papilares. Coloração de HE em objetiva de 20x	23
FIGURA 2 - Fotomicrografia de carcinoma mamário sólido em gata. Caracterizado pelo arranjo das células tumorais em lençóis, cordões ou ninhos sólidos. Coloração de HE em objetiva de 20x.....	23
FIGURA 3 -Fotomicrografia de carcinoma mamário cribriforme em gata. O tipo de arranjo sólido, com pequenas aberturas, semelhante a uma “peneira”. Este tipo é comum a espécie felina. Coloração de HE em objetiva de 20x.....	24
FIGURA 4 - Fotomicrografia de carcinoma mamário túbulo-papilífero em gata. Notar os êmbolos de células neoplásicas no interior dos vasos linfáticos (setas). HE, objetiva de 20x	26
FIGURA 5 - Fotomicrografia de carcinoma mamário sólido em gata. Notar o acentuado número de mitoses (setas) nas regiões periféricas dos acinos. HE objetiva de 40x	26
FIGURA 6 - Escore mitótico em relação ao grau das neoplasias mamárias das gatas	27
FIGURA 7 - Fotomicrografia do carcinoma túbulo-papilífero em gata, marcação para Ki-67 com baixo índice proliferativo, Novolink, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris BAR, objetiva 40x	29
FIGURA 8 - Fotomicrografia do carcinoma sólido em gata, marcação para Ki-67 com alto índice proliferativo, Novolink, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris BAR, objetiva 40x	30
FIGURA 9 - Fotomicrografia do carcinoma cribriforme em gata, marcação para Ki-67 com alto índice proliferativo, Novolink, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris BAR, objetiva 40x.	30
FIGURA 10 - Relação do índice proliferativo (IP) de acordo com os escores mitóticos apresentados pelas amostras ($p = 0,0123$).....	31
FIGURA 11 - Fotomicrografia de carcinoma túbulo-papilífero em gata, marcação de Caspase 3 com baixo índice apoptótico, Histofine, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris BAR, objetiva 40x.	33

FIGURA 12 - Fotomicrografia de carcinoma cribriforme em gata, marcação de Caspase 3, com baixo índice apoptótico, Histofine, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris BAR, objetiva 40x.	33
FIGURA 13 - Fotomicrografia de Carcinoma túbulo-papilífero em gata. Notar a marcação citoplasmática fortemente positiva para o anticorpo CK 14, Novolink, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris BAR, objetiva 40x.....	35
FIGURA 14 - Fotomicrografia de carcinoma sólido em gata. Notar a marcação citoplasmática fortemente positiva para o anticorpo CK 14 Novolink, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris BAR, objetiva 40x.	35
FIGURA 15 - Fotomicrografia de carcinoma túbulo-papilífero em gata. Ausência de marcação nas células neoplásicas para o anticorpo alfa-SMA, Histofine, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris BAR, objetiva 40x.....	37
FIGURA 16 - Fotomicrografia de carcinoma sólido em gata. Notar a ausência de marcação nas células neoplásicas e a positividade das células endoteliais para o anticorpo alfa-SMA, Histofine, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris BAR, objetiva 40x	37
FIGURA 17 - Score de E-cad apresentado em cada grau neoplásico	38
FIGURA 18 - Avaliação percentual de E-cad segundo agrupamento em três tipos histopatológicos.....	39
FIGURA 19 - Fotomicrografia de carcinoma túbulo-papilífero em gata. Notar a marcação nas células neoplásicas para o anticorpo E-cad, Novolink, DAB, contracorada com Hematoxilina de Harris BAR, objetiva de 40x.	42
FIGURA 20 - Fotomicrografia de carcinoma sólido em gata. Notar a marcação nas células neoplásicas para o anticorpo P-cad, EasyPath, DAB, contracorada com Hematoxilina de Harris BAR, objetiva de 40x.	42

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Neoplasias Mamárias na Fêmea Felina	3
2.1.1 Dados Epidemiológicos e Biologia Tumoral	3
2.1.2 Fatores Hormonais.....	4
2.1.3 Tratamento.....	6
2.2 Diagnóstico das Neoplasias Mamárias de Gatas	7
2.2.1 Estadiamento Clínico.....	7
2.2.2 Histopatologia	8
2.2.3 Graduação Histopatológica.....	8
2.2.4 Imuno-histoquímica	9
2.2.4.1 KI-67 nas neoplasias de mama	10
2.2.4.2 Caspase 3	11
2.2.4.3 Citoqueratinas e o câncer de mama.....	11
2.2.4.4 Marcador mioepitelial	12
2.2.4.5 E-caderina e P-caderina.....	13
3 OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo Geral.....	15
3.2 Objetivos Específicos.....	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Amostras utilizadas	16
4.2 Diagnóstico Histopatológico.....	16
4.3 Graduações Histopatológicas.....	16
4.4 Índice mitótico.....	17
4.5 Procedimentos de Imuno-histoquímica	17
4.6 Análise das reações.....	19
4.7 Forma de análise dos resultados	20
5 RESULTADOS	22

5.1 Dados epidemiológicos da pacientes felinas portadoras de câncer de mama	22
5.2 Classificação histopatológica.....	22
5.3 Graduação histopatológica	24
5.4 Índice mitótico	25
5.5 Índice de proliferação – KI-67	28
5.6 Correlação de índice mitótico com índice proliferativo	31
5.7 Expressão de Caspase 3 Clivada e Índice Apoptótico (IA)	32
5.8 Relação do índice proliferativo com o índice apoptótico	32
5.9 Análise das células basais CK 14.....	34
5.10 Expressão de alfa actina de músculo liso na neoplasia mamária felina.....	36
5.11 Expressão das moléculas de adesão E-caderina e P-caderina	38
6 DISCUSSÃO	43
6.1 Dados epidemiológicos	43
6.2 Tipo e graduação histológica.....	44
6.3 Índice mitótico e proliferativo	45
6.4 Índice apoptótico	47
6.5 Componentes envolvidos na neoplasia mamária	48
6.6 Moléculas de adesão	50
7 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54
ANEXOS	65
APÊNDICES	67

JORGE, M.F. **Caracterização histopatológica e marcadores imuno-histoquímicos no câncer de mama de gatas**. Botucatu, 2016. 113p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

As neoplasias mamárias das gatas frequentemente são malignas e agressivas, sendo os tipos mais comuns classificados como carcinomas tubulopapilíferos, sólidos e cribriformes. O grau histológico tem relação com o comportamento biológico desses tumores. No entanto poucos estudos tem abordado a cinética celular, a expressão de marcadores epiteliais e mioepiteliais, ou mesmo de moléculas de adesão e suas relações com a agressividade tumoral. Assim, o objetivo deste trabalho foi relacionar o tipo histológico dos carcinomas mamários das gatas e seus graus histológicos com os índices proliferativos e apoptóticos, e a expressão imuno-histoquímica de CK14, alfa-SMA, E-caderina e P-caderina. Foram utilizadas 31 amostras de carcinomas mamários de gatas. Submetidas a técnica imuno-histoquímica indireta com os anticorpos Ki-67, caspase-3-clivada, CK14, alfa-SMA, E-caderina e P-caderina. Predominaram as gatas SRD, com média de idade de 12 anos. Em frequência, o percentual dos tipos histológicos foi: 42%, 45,50% e 12,50% para os carcinomas tubulopapilíferos, sólidos e cribriforme; e foi de 9,65%, 41,95% e 48,80%, para os graus I, II e III, respectivamente. Os carcinomas tubulopapilíferos mostraram índice mitótico inferior aos carcinomas sólidos, assim como os carcinomas de grau I em relação aos de grau II e III. A característica basal (CK14 +) foi frequente nesses carcinomas. O subtipo complexo (alfa-SMA + ou alfa-SMA/CK14 +/-) é raro. Houve perda da expressão de E-caderina a medida que se torna mais agressivo. A P-caderina teve alta expressada independente do tipo histológico ou grau da neoplasia.

Palavras-chave: CK14; Caderinas; Índice Apoptótico; Índice Mitótico; Índice Proliferativo.

JORGE, M.F. **Histopathological characterization and immunohistochemical markers in cats of breast cancer.** Botucatu, 2016. 113p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Mammary tumors of the cats are often malignant and aggressive, the most common types classified as tubulopapillary, solid and cribriform carcinomas. The histological grade is related to the biological behavior of these tumors. However few studies have addressed the cell kinetics, the expression of epithelial and myoepithelial markers, or adhesion molecules and their relationship with tumor aggressiveness. The objective of this study was to correlate the histologic type of breast carcinomas of the cats and their histological grades with proliferative and apoptotic indices, and immunohistochemical expression of CK14, alpha-SMA, E-cadherin and P-cadherin. 31 samples of breast carcinomas cats were used. Subjected to indirect immunohistochemical technique with antibodies Ki-67, caspase-3, cleaved CK14, alpha-SMA, E-cadherin and P-cadherin. Predominated SRD cats, with a mean age of 12 years. In frequency, the percentage of histological types was 42%, 45.50% and 12.50% for tubulopapillary, solid and cribriform carcinomas; and it was 9.65%, 41.95% and 48.80% for grades I, II and III, respectively. The tubulopapillary carcinomas showed mitotic index lower than the solid carcinomas, as well as grade I carcinomas compared to levels II and III. The basal feature (CK14 +) was common in these carcinomas. The complex subtype (alpha-SMA + or alpha-SMA / CK14 +/-) is rare. There was a loss of E-cadherin expression as it becomes more aggressive. The P-cadherin was expressed high regardless of histological type or grade of cancer.

Key words: CK14; Cadherins; Apoptotic index; Mitotic index; Proliferative Index.

1 INTRODUÇÃO

A oncologia na Medicina Veterinária vem se tornando uma área em constante evolução. Com o avanço das técnicas diagnósticas e da terapêutica, a sobrevida dos animais é cada vez maior, a semelhança do que ocorre na Medicina Humana (BURRAI *et al*, 2010).

Na prática veterinária as neoplasias mamárias merecem destaque entre os animais de companhia (BOSTOCK, 1986) e, especificamente na espécie felina, são o terceiro tipo de neoplasia mais frequente, sendo superada somente pelos tumores de pele e do tecido hematopoiético (OVERLEY *et al*, 2005).

Historicamente, não há consenso entre os patologistas veterinários sobre os critérios diagnósticos e prognósticos das neoplasias mamárias em gatas. Como exemplo pode-se citar não mais que duas classificações oficiais ao longo de quatro décadas, com o detalhe de haver quase três décadas de diferença entre a primeira e a segunda (CASTAGNARO *et al.*, 1998).

A classificação e graduação histopatológica, associada ao estadiamento clínico, são os pilares do diagnóstico, empregados na rotina (MATOS, *et al.*, 2012).

No Brasil, especialistas em patologia veterinária e oncologistas clínicos já se reuniram por duas oportunidades com o objetivo de estabelecer um consenso no que diz respeito ao diagnóstico e ao tratamento das neoplasias mamárias caninas (CASSALI *et al.*, 2011; CASSALI *et al.*, 2012). No entanto, com relação aos tumores de mama das gatas não existem iniciativas semelhantes.

Embora haja iniciativas no sentido de atualizar e modernizar as classificações, ainda hoje a heterogeneidade de resultados observados dificulta o estabelecimento de uma nomenclatura homogênea. Essa situação causa transtornos no que diz respeito à comparação dos resultados das pesquisas e a comunicação entre os profissionais da área.

Nos últimos anos tem havido um grande interesse na utilização de técnicas imuno-histoquímicas na oncologia veterinária com o objetivo de identificar possíveis marcadores prognósticos, estabelecer parâmetros que

balizem o comportamento tumoral e orientem as medidas terapêuticas (HUGHES & DOBSON, 2012; MATOS *et al.*, 2012).

Quanto ao diagnóstico morfológico e às características imunofenóticas, fica claro que as neoplasias mamárias felinas ainda possuem diversos pontos a serem investigados. Um fator prognóstico já bem estabelecido no câncer de mama em mulheres é o índice proliferativo, obtido pela marcação bem diferenciada do antígeno Ki-67, expressa em qualquer fase do ciclo celular, com exceção da fase repouso (G0) (SOARES *et al.*, 2015).

A morte celular programada (apoptose) acontece toda vez que se é identificado dano no DNA. Através da expressão do anticorpo caspase-3-clivada se chega ao índice apoptótico, o qual pode ter relação com a agressividade e a progressão do tumor (KUMARAGURUPARAN *et al.*, 2006).

As citoqueratinas, como a CK14, são moléculas expressadas pelas células neoplásicas do tecido mamário que permitem melhor diferenciar a origem tumoral, se epitelial ou mioepitelial (PENÃ *et al.*, 2014). Em cadelas, o subtipo complexo é relacionado a melhor prognóstico, enquanto nas gatas a diferenciação morfológica pode não ser fidedigna. Assim o uso do marcador de musculatura lisa alfa-SMA corresponde a uma ferramenta auxiliar (SEIXAS *et al.*, 2008).

A perda da expressão de moléculas de adesão da família das caderinas tem relação ao potencial metastático (ZAPPULLI *et al.*, 2012).

O objetivo desse trabalho é avaliar nos carcinomas mamários das gatas a proliferação celular, a apoptose, as características mioepiteliais, e a expressão de moléculas de adesão. Em seguida relacionar: o índice mitótico com o proliferativo; o índice proliferativo com o apoptótico; a expressão de CK-14 e alfa-SMA; e a expressão de E-caderina e P-caderina. - tipo histopatológico e graduação.

A intenção de melhor elucidar o comportamento biológico dos carcinomas mamários das gatas a fim de estabelecer ligação entre tipo e graus histológicos com critérios de malignidade e agressividade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neoplasias Mamárias na Fêmea Felina

2.1.1 Dados Epidemiológicos e Biologia Tumoral

Nos felinos, as neoplasias mamárias são as mais frequentes, ultrapassadas apenas pelas neoplasias tegumentares e do tecido linfohematopoiético, sendo a mais comum entre as fêmeas desta espécie (HAYES *et al.*, 1981; AMORIM *et al.*, 2006; MISDORP, 2008; SÁ, 2008; MacEWEN & WITHROW, 2013).

Quando se analisa a ocorrência das neoplasias mamárias das gatas se observa que entre 80 e 96% dos casos são considerados malignos e altamente agressivos (MISDORP, 2008; MacEWEN & WITHROW, 2013; SHAFIEE *et al.*, 2013).

Levantamento recente de felinas com desenvolvimento espontâneo da doença aponta como nove meses a idade mínima e a máxima de 20 anos, com média de oito anos e seis meses. Nas gatas jovens a maioria das lesões são de natureza não neoplásicas, com cerca de 11% de lesões malignas (TOGNI *et al.*, 2013). Outros autores apresentam resultados semelhantes estabelecendo a faixa entre nove meses e de 23 anos de idade com média de 11 anos (ZAPPULLI *et al.*, 2005). O maior risco de aparecimento da neoplasia se dá após os seis anos de idade, alcança seu “plateau” entre 10 e 11 anos, decaindo a frequência drasticamente nos animais acima desta faixa etária (SORENMO *et al.*, 2013).

As fêmeas da raça Siamês têm risco duas vezes maior de desenvolver neoplasias mamárias do que as demais raças (GIMENEZ *et al.*, 2010). De forma semelhante, esses tumores também são observados com maior frequência nos animais de pelo curto (HAYES *et al.*, 1981; MOULTON, 1990; AMORIM *et al.*, 2006; KUSTRITZ, 2007; SÁ, 2008; GIMENEZ *et al.*, 2010). Diferenças regionais também foram identificadas, como por exemplo, o maior acometimento de fêmeas que vivem no ambiente doméstico no Japão (ITO *et al.*, 1996).

O comportamento maligno dos tumores de mama das gatas tem como característica a infiltração local e dos tecidos adjacentes. Esta agressividade se reflete na probabilidade de ocorrerem metástase em cerca de 80% dos casos (LANA *et al.*, 2007). Quando isso ocorre, os locais de eleição são linfonodos regionais e pulmões, embora pleura, fígado, glândula adrenal e rins também possam ser acometidos (MORRIS *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2015).

O tempo médio de sobrevivência das gatas com neoplasia maligna de mama é inferior a um ano, sendo a graduação o maior indicador prognóstico (SEIXAS *et al.*, 2011). A semelhança do que acontece com outros tumores malignos, o tamanho tumoral é considerado um fator prognóstico importante (OVERLEY *et al.*, 2005).

2.1.2 Fatores Hormonais

Por medidas de controle populacional, a esterilização das gatas é recomendada. Gatas submetidas à ovariossalpingohisterectomia (OSH) antes de um ano de idade têm menor risco de desenvolver a neoplasia mamária (OVERLEY *et al.*, 2005), enquanto gatas inteiras, ou seja não submetidas a este procedimento, possuem probabilidade sete vezes superior de desenvolver a doença (MORRIS *et al.*, 2013). Isto se deve a influência hormonal que estimula a liberação de fatores de crescimento no parênquima mamário (GIMENEZ *et al.*, 2010; SORENMO *et al.*, 2013).

Alguns autores relatam que as gatas submetidas a OSH até os seis meses de idade têm aproximadamente 9% de probabilidade de desenvolver a patologia, enquanto que naquelas submetidas até um ano de idade o risco sobe para 14% (OVERLEY *et al.*, 2005). Outros autores afirmam que 17% das gatas castradas entre os oito e 11 meses de idade desenvolveram carcinomas de mama (HAYES & MOONEY, 1985).

A ação dos hormônios sexuais femininos pode levar ao desenvolvimento tumoral. O estrógeno e a progesterona possuem papel fundamental na etiopatogenia do carcinoma mamário, porém o mecanismo exato ainda é desconhecido (OVERLEY *et al.*, 2005). A influência da idade em que foi realizada a esterilização, o fato de haver gestado, e a exposição a

progestágenos são considerados fatores de risco para as gatas (OVERLEY *et al.*, 2005).

A utilização como método anticoncepcional de uma única aplicação de progestágeno possui a capacidade de induzir hiperplasia mamária na gata, enquanto o uso prolongado por anos, de altas doses, com grande intervalo de tempo entre elas (três a quatro meses), pode levar ao desenvolvimento de carcinoma mamário (ROMAGNOLI, 2015).

O uso regular de progestágenos sintéticos aumenta o risco de desenvolver a doença (MISDORP *et al.*, 1992). Vários estudos relataram a forte relação entre o uso deste tipo de medicação e o desenvolvimento de tumores de mama em gatas (TOMLINSON *et al.*, 1984; HAYES & MOONEY, 1985; MISDORP *et al.*, 1991; MISDORP *et al.*, 1992; TAMADA *et al.*, 2003; AMORIM *et al.*, 2006). Este potencial de aumento de risco foi enfatizado ao tratar gatos machos castrados com doses contínuas e repetitivas, observando que todos os três animais desenvolveram carcinomas mamários (JACOBS *et al.*, 2010).

A função hormonal, ou seja, a influência do estrógeno, da progesterona, da prolactina e de hormônios do crescimento, afeta o crescimento do tecido da mama normal, assim como do tecido neoplásico. Isto é comprovado em diversas espécies. Devido a indução à proliferação das células epiteliais glandulares, gerada pela exposição prolongada e repetitiva aos esteroides sexuais, a acumulação de erros genéticos é facilitada, o que pode resultar no desenvolvimento de um processo neoplásico. Desta forma, a hiperplasia inicial progride para o estágio pré-neoplásico, que com a contínua influência de fatores de crescimento, pode vir a desenvolver o fenótipo mais agressivo do carcinoma invasivo (OVERLEY *et al.*, 2005).

As técnicas imuno-histoquímicas têm sido empregadas, com o objetivo de elucidar a influência hormonal sobre o desenvolvimento das neoplasias mamárias em felinos. Através desta técnica, verificou-se que não houve relação entre a expressão de receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP) com o tipo histológico, tanto em cadelas, quanto em gatas. Estes mesmos autores verificaram que em gatas a alta expressão de RE e RP é esperada nos carcinomas bem diferenciados e nos tubulopapilíferos (MILLANTA *et al.*; 2006).

A baixa expressão de RE é observada em carcinomas invasivos, os quais apresentaram êmbolos nos vasos linfáticos. O aumento progressivo na

expressão de RP ocorreu do tecido normal para o neoplásico, no entanto nos carcinomas invasivos foram identificados os maiores percentuais de marcação. Esta característica de expressão hormonal é muito semelhante aos cânceres de mama do tipo hormônio-independentes das mulheres (DE LAS MULAS *et al.*, 2002). Com relação a receptores para progesterona, eles foram encontrados em 100% (n=7) dos tumores avaliados (JOHNSTON *et al.*, 1984). Outros autores também afirmam que tanto o comportamento clínico como o biológico das neoplasias mamárias nas gatas é bem semelhante ao apresentado em mulheres com tumores do tipo basal e triplo negativo (BRUNETTI *et al.*, 2013).

Em outro estudo, os RP foram detectados em 37% dos casos analisados, enquanto que os RE foram encontrados em 50% dos casos positivos para RP (DE LAS MULAS *et al.*, 2002). A perda da expressão dos receptores de estrógeno é observada à medida que a lesão progride de benigna para maligna (MILLANTA *et al.*, 2006; CALIARI, *et al.*, 2014). A expressão dos receptores de progesterona esta aumentada nos carcinomas “in situ”, quando comparados com o tecido saudável, e nos tipos neoplásicos mais agressivos se observou as maiores taxas de expressão de RP (MILLANTA *et al.*, 2006). A dificuldade em estabelecer uma padronização para marcadores hormonais nas gatas vem do fato da grande maioria delas já ter sido submetida a esterilização quando desenvolve a neoplasia (DE LAS MULAS *et al.*, 2002).

2.1.3 Tratamento

Atualmente, o tratamento mais efetivo para as neoplasias mamárias nas gatas, é a remoção cirúrgica do tumor, que esta associada a maior probabilidade de cura, na dependência do tipo e do estágio da doença (WALDRON, 2001; NOVOSAD, 2003; CASSALI *et al.*, 2011).

A técnica preconizada é a mastectomia radical total, com remoção dos linfonodos axilares e inguinais. Embora ainda haja necessidade de maiores estudos sobre os atuais protocolos quimioterápicos para os cânceres de mama na cadela e na gata, a quimioterapia adjuvante à cirurgia têm sido preconizada em determinados casos de carcinoma (SORENMO *et al.*, 2003; CASSALI *et al.*, 2011; CAMPOS *et al.*, 2011).

Os protocolos que empregam a doxorrubicina como agente único, ou em associação com a ciclofosfamida são citados na literatura (SORENMO *et al.*, 2013). Como o componente inflamatório em felinos é importante e estes carcinomas normalmente apresentam alta expressão de COX-2, protocolo utilizando doxorrubicina associado a AINEs também é indicado (SORENMO *et al.*, 2013). Outro protocolo, recomendado é o que utiliza a carboplatina (CAMPOS *et al.*, 2015). No entanto, nenhum destes trabalhos concluiu que a taxa de sobrevida dos animais foi alterada com uso do tratamento adjuvante.

2.2 Diagnóstico das Neoplasias Mamárias de Gatas

2.2.1 Estadiamento Clínico

Após 6 anos da OMS padronizar as neoplasias mamárias da gata com critérios morfológicos, foi estabelecido o segundo ponto de classificação, o estadiamento clínico ou método TNM (T - tamanho tumoral; N – linfonodos regionais acometidos; e M – metástase) (MATOS *et al.*, 2012). O tumor medido em cm com auxílio de paquímetro e exame cito e/ou histológico para avaliar linfonodos e metástase. Padronizando assim para as felinas: tamanho do tumor primário - T1<1 cm, T2 de 1-3 cm, T3 >3cm; ausência de invasão em linfonodos regionais N0, e quando acometido N1; e ausência de metástase M0, ou a presença de metástase a distancia M1. Com esses dados, chegamos ao final do estadiamento, onde T1N0M0 = I; T2N0M0 = II; T3N0M0 = III; qualquer TN1M0 = IV; e por fim qualquer TN0M1 = V (LANA *et al.*, 2007).

O tamanho do tumor primário tem influência direta sobre o prognóstico, sendo que os tumores menores a 3cm estão associados a maior taxa de sobrevida quando comparados aos tumores com mais de 3 cm (MORRIS *et al.*, 2013). Mais de um quarto das gatas com carcinoma mamário apresentam acometimento de linfonodo regional no momento do diagnóstico, estando os axilares e os inguinais envolvidos em 80% dos casos, e de forma menos frequente, os linfonodos esternais em cerca de 30% delas (WEIJER & HART, 1983).

2.2.2 Histopatologia

O exame histopatológico é o método padrão para o diagnóstico definitivo das neoplasias. Esta técnica permite não só o diagnóstico definitivo como também possibilita a tipificação morfológica, graduação da neoplasia, avaliação das margens cirúrgicas, detecção do envolvimento de linfonodos regionais e facilita o emprego de marcadores imuno-histoquímicos (MISDORP *et al.*, 1999; MISDORP, 2008; GOLDSCHMIDT *et al.*, 2011; SORENMO *et al.*, 2011; MATOS *et al.*, 2012; MILLS *et al.*, 2015).

A primeira classificação histológica internacional de tumores de animais domésticos foi proposta por Hampe & Misdorp, 1974 denominava as lesões como adenomas ou adenocarcinomas, por serem derivados do epitélio glandular, sendo esta classificação baseada principalmente na morfologia descritiva e não na histogênese da neoplasia (HAMPE & MISDORP, 1974). Posteriormente, as classificações foram propostas para as cadelas passaram a incluir padrões que se correlacionam com o prognóstico, enquanto que para os felinos, por falta de dados que permitissem o mesmo tipo de abordagem, os padrões morfológicos continuaram prevalecendo (MISDORP *et al.*, 1999). O principal tipo histológico é o carcinoma simples, derivado de epitélio luminal dos ductos e alvéolos mamários. O subtipo complexo, frequente nas cadelas, é extremamente raro nas gatas, e quando observado esta relacionado com menor agressividade e melhor prognóstico (ZAPPULLI *et al.*, 2013). De forma geral, os carcinomas mamários nas gatas são classificados em túbulo-papilífero, sólido, e cribriforme. O carcinoma inflamatório é pouco frequente e está associado com o carcinoma papilar (MORRIS *et al.*, 2013).

2.2.3 Graduação Histopatológica

O grau de diferenciação histopatológico reflete a semelhança das células do tumor com o tecido original. Esta avaliação é feita considerando-se as características histológicas da lesão, o grau de diferenciação celular, o número e o aspecto das figuras de mitose, e a infiltração vascular e/ou linfática. Nesta classificação o grau I representa o tumor mais diferenciado, o grau II o tumor

moderadamente diferenciado e o III o pouco diferenciado (ELSTON & ELLIS, 1998; YAMAGAMI *et al.*, 1996; MISDORP, 2008; GOLDSCHMIDT *et al.*, 2011).

A determinação da graduação da neoplasia guarda relação com o prognóstico. O grau nuclear é baseado na aparência do núcleo, não levando em consideração o padrão de crescimento do tumor. A avaliação quando feita por patologista experiente, se mostra um método auxiliar de grande valor em doença mamária (ELSTON & ELLIS, 1998; SORENMO *et al.*, 2011; BETZ *et al.*, 2012; MILLS *et al.*, 2015).

Tanto para cadelas como para gatas, a disseminação da neoplasia é evidenciada pela invasão dos vasos sanguíneos ou linfáticos por células tumorais, bem como pelo comprometimento de linfonodos regionais (YAMAGAMI *et al.*, 1996; MISDORP, 2008; GOLDSCHMIDT *et al.*, 2011; SORENMO *et al.*, 2011; BETZ *et al.*, 2012; MATOS *et al.*, 2012). Literaturas recentes incluem a invasão vascular como critério para graduação (MILLS *et al.*, 2015).

Especificamente para as gatas, o tempo de sobrevivência e o prognóstico está relacionado com o tamanho tumoral do sítio primário, o acometimento ou não dos linfonodos, o estadiamento clínico (OMS), a extensão da cirurgia e a graduação histopatológica (MILLS *et al.*, 2015).

2.2.4 Imuno-histoquímica

A evolução do diagnóstico anatomopatológico levou ao surgimento de procedimentos técnicos modernos que facilitaram o diagnóstico de doenças infecciosas e neoplásicas do homem e dos animais domésticos. Entre esses procedimentos encontra-se a técnica de imuno-histoquímica, que tem sido empregada no diagnóstico e no estabelecimento do prognóstico das neoplasias mamárias em cadelas e gatas (RAMOS-VARA, 2005; RAMOS-VARA *et al.*, 2008; NOWAK *et al.*, 2008; ZUCCARI *et al.*, 2008; WEBSTER *et al.*, 2009; MATOS *et al.*, 2012).

Os painéis imuno-histoquímicos propostos para o estabelecimento do fenótipo tumoral que se relacione com o comportamento da neoplasia mamária na gata, baseiam-se na análise comparativa entre a expressão molecular do tumor primário e as metástases e o linfonodo sentinela. Desta forma, procura-

se obter dados que permitam o diagnóstico mais fidedigno, assim como novas perspectivas para o tratamento direcionado (BEHA *et al.*, 2014; BRUNETTI *et al.*, 2013; MUSCATELLO *et al.*, 2015).

2.2.4.1 KI-67 nas neoplasias de mama

O KI-67 é um marcador de proliferação utilizado no estabelecimento do prognóstico de pacientes com câncer de mama (SOARES *et al.*, 2015). É uma proteína expressa em todas as fases do ciclo celular, com exceção de G0 (DOWSETT *et al.*, 2011).

Nos carcinoma de mama em humanos o índice de proliferação baseado na expressão de KI-67 e pelo antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) têm importância prognóstica (LEONARDI *et al.*, 1992). Em cães ainda é controverso seu uso quanto a fator prognóstico das neoplasias mamárias (PENÃ *et al.*, 2014). Em gatas a positivamente ao marcador é maior em lesões malignas quando comparado a benignas e dentre os carcinomas, é mais alta nos tipos de maior grau (HUGHES & DOBSON, 2012).

Para os carcinomas mamários felinos são poucos os estudos que buscam correlacionar o índice proliferativo com redução do tempo de sobrevivência (PREZIOSI *et al.*, 2002; MILLANTA *et al.*, 2006; SEIXAS *et al.*, 2011). Rasotto *et al.*, 2011 em seu estudo, chegaram ao índice proliferativo médio de 29,8%. Em trabalho de pesquisa recente foi sugerido o valor de 14% como ponto de corte nos carcinomas mamários felinos, já que este índice estava associado com o tempo de sobrevivência do grupo de animais avaliados (SOARES *et al.*, 2015). Além disso, a expressão desta proteína tem relação com o grau da neoplasia e serve como parâmetro para avaliação da progressão da doença (CAMPOS *et al.*, 2014).

Com relação aos dados apresentados acima, fica claro que embora muitos estudos estejam sendo realizados, ainda não há um consenso referente a padronização do índice proliferativo na neoplasia mamária das gatas.

2.2.4.2 Caspase 3

As caspases são proteases com um papel bem definido na apoptose. caspase-3 tem um papel importante na diferenciação dos tecidos, regeneração e desenvolvimento neural em maneiras que são distintas e não envolvem qualquer atividade apoptótica. Aumento dos níveis de caspase-3 nas células tumorais provoca a secreção de factores parácrinos que promovem a proliferação compensatória em tecidos normais circundantes e a repopulação de células do tumor, o que propicia a seleção de clones resistentes, gerando uma barreira para estratégias terapêuticas eficazes (SHALINI *et al.*, 2015).

A apoptose é um fenômeno celular que esta relacionada com a morte celular, que tem um papel importante no controle de células infectadas por vírus e/ou com lesão permanente no DNA. Nas neoplasias de mama das mulheres e das cadelas parece haver uma correlação entre a menor expressão de caspase 3 com a agressividade e a progressão do tumor (KUMARAGURUPARAN *et al.*, 2006). Um dos mecanismos propostos para a progressão tumoral seria a evasão a apoptose que manteria as células neoplásicas viáveis e com capacidade de proliferar (VINOTHINI *et al.*, 2009). Para os felinos se desconhece dados relativos a importância da expressão de caspase por células tumorais da mama.

2.2.4.3 Citoqueratinas e o câncer de mama

No parênquima mamário observam-se basicamente dois tipos celulares, as células epiteliais luminais e basais que compõe os alvéolos e ductos, e as células mioepiteliais. Na gata à semelhança da mulher, as neoplasias podem surgir tanto a partir das células epiteliais como das mioepiteliais e dependendo do tipo histológico e da graduação, o prognóstico da paciente pode ser melhor ou pior (BHARGAVA *et al.*, 2008).

O citoesqueleto das células epiteliais é formado por proteínas de filamentos intermediários que são as citoqueratinas, cujo grupo é formado por cerca de 20 subtipos diferentes (BURKITT *et al.*, 1994).

Na mulher e na cadela as citoqueratinas 8/18 e 19 são utilizadas para identificar as células epiteliais luminais. Enquanto as citoqueratinas 5, 5/6 e 14

são usadas para marcar as células epiteliais basais (PENÃ *et al.*, 2014). Na espécie felina, no entanto, a expressão das citoqueratinas na neoplasia maligna de mama ainda é pouco conhecida (BHARGAVA *et al.*, 2008).

Nas neoplasias mamárias das mulheres, o emprego da avaliação dos receptores hormonais é utilizado para tipificar as células luminais em luminal A, luminal B, basal e triplo negativo. Este painel também vem sendo utilizado nas neoplasias mamárias felinas (BEHA *et al.*, 2014). Nos casos onde a expressão de RP, RE e de fator de crescimento epidermal (Her-2) é negativa, as células são denominadas de triplo negativo. Nestes casos, a expressão das citoqueratinas é fundamental para caracterizar a neoplasia (MUSCATELLO *et al.*, 2015).

A caracterização imuno-histoquímica da porção mioepitelial pode ser avaliada pela expressão de marcadores como alfa-actina de músculo liso (alfa-SMA), de p63 e de calponin (PENÃ *et al.*, 2014). Assim tumores de células basais mostram ausência de expressão de receptores hormonais e características mioepiteliais basais que são identificadas pela marcação positiva para CK14 e alfa-SMA (RASOTTO *et al.*, 2014).

Em cadelas já estão identificadas características bifásicas, com o envolvimento do componente mioepitelial. A histogênese dos tumores mamários das gatas ainda não é bem definida (RASOTTO *et al.*, 2014). Em contrapartida, outros autores consideram esta origem já estabelecida (HUGHES & DOBSON, 2012).

Estes marcadores são importantes para diferenciar o fenótipo chamado de triplo-negativo. Na espécie felina tal fenótipo responde por aproximadamente 70% das neoplasias mamárias, uma incidência bem maior que a registrada em medicina humana (NGUYEN *et al.*, 2012).

2.2.4.4 Marcador mioepitelial

As células mioepiteliais possuem morfologia fusiforme ou estrelada nas cadelas portanto, podem ser identificadas no exame histopatológico de rotina permitindo o diagnóstico dos carcinomas complexos. Nas gatas, de 10% a 11% dos carcinomas são complexos, sendo que na grande maioria das vezes as células mioepiteliais não apresentam características morfológicas que

possibilitem sua identificação sem a utilização de métodos imuno-histoquímicos (ZAPPULLI *et al.*, 2013).

O carcinoma mamário complexo é diagnosticado quando além do componente epitelial, as células do estroma de sustentação da glândula mamária também se encontram alteradas, ou seja, já ocorreu a metaplasia dos componentes mioepiteliais da mama. Este subtipo é raro nos tumores de mama das gatas quando comparado às cadelas, com uma incidência de 7,5% dentre as neoplasias. Os tipos sólidos e tubulares apresentam maior chance de apresentar tal alteração. Estudos prévios revelam que os tumores apresentam marcação mioepitelial, indicando assim que as neoplasias complexas podem não estar sendo diagnosticadas (SEIXAS *et al.*, 2008).

Na cadela e na gata, as células mioepiteliais, podem ser identificadas utilizando-se a expressão de alfa-SMA (YOSHIMURA *et al.*, 2011; RASOTTO *et al.*, 2014). A verificação e avaliação da presença deste tipo celular nas neoplasias felinas pode permitir uma melhor caracterização morfológica dos tumores mamários nesta espécie.

2.2.4.5 E-caderina e P-caderina

As caderinas são glicoproteínas cálcio-dependentes localizadas na membrana citoplasmática com a função de manter a coesão entre as células. Embora sejam conhecidas mais de 40 tipos de caderinas, algumas delas vêm despertado maior interesse na oncologia veterinária, como a E-caderina, relacionadas à união entre as células epiteliais e a P-caderina relacionadas às células mioepiteliais (FIGUEIRA *et al.*, 2015).

São escassos os trabalhos que estudam a expressão destas moléculas de adesão no carcinoma mamário felino. Estudos mostram que em lesões tumorais benignas, como adenomas, a expressão destas moléculas esta normal (DIAS PEREIRA *et al.*, 2004), enquanto em lesões malignas, quando comparado o sitio primário com o foco metastático em linfonodos regionais, a expressão está diminuída em ambos, comprovando a baixa ou nula expressão como fator prognóstico desfavorável, ou seja alta chance de metástase ou curta sobrevida (TAKAUJI *et al.*, 2007).

Nas neoplasias mamárias o papel da E-caderina ainda carece de maiores estudos, pois embora sua menor expressão pareça estar relacionada a um maior potencial metastático não parece haver relação com a sobrevida da paciente (BRUNETTI *et al.*, 2005; ZAPPULLI *et al.*, 2012).

A P-caderina é uma clássica molécula de adesão célula-a-célula, com funções homeostáticas em diversos tecidos e que no tecido neoplásico atua de forma variável, dependendo do microambiente. No tecido mamário normal a P-caderina está presente e se relaciona ao fenótipo basal (VIEIRA & PAREDES, 2015).

Estas duas moléculas não podem ser analisadas em separado, já que estudos recentes indicam que a E-caderina pode representar a função de supressor tumoral quando a P-caderina apresenta perda ou ausência de expressão (FIGUEIRA *et al.*, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é analisar o comportamento biológico dos carcinomas mamários das gatas por meio da avaliação da proliferação celular, da apoptose, das características mioepiteliais, e da expressão de moléculas de adesão perante cada um tipos e graus histopatológicos.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar a taxa de proliferação das neoplasias mamárias pela expressão imuno-histoquímica de Ki-67 (MIB-1).

Avaliar o índice apoptótico das neoplasias mamárias utilizando a expressão imuno-histoquímica de Caspase-3.

Caracterizar os componentes celulares das neoplasias mamárias por meio da expressão de CK14 e alfa-SMA.

Avaliar a expressão de moléculas de adesão por meio da expressão de E-caderina e P-caderina.

Relacionar os índices proliferativo e apoptótico, a expressão de CK-14, alfa-SMA, E-caderina e P-caderina com a graduação histopatológica nos diferentes tipos de carcinoma mamário.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras utilizadas

O presente trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ sob número de protocolo 46/2014 - CEUA (Anexo 1).

Estudo retrospectivo, com amostras obtidas entre 2000 e 2015, utilizando apenas animais da espécie felina, fêmeas. Não houve critério de exclusão quanto a idade ou raça. Todas com lesões malignas.

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas 31 amostras de neoplasias malignas da glândula mamária de gatas de aparecimento espontâneo oriundas de 31 gatas diferentes, obtidas dos arquivos de dois laboratórios privados localizados nos municípios de Campinas-SP e Marília-SP.

A partir dos blocos de parafina foram confeccionadas lâminas histológicas para a coloração de Hematoxilina e Eosina e também para a técnica de imuno-histoquímica, com cortes de três μm de espessura.

4.2 Diagnóstico Histopatológico

A partir das lâminas coradas pela técnica de hematoxilina e eosina realizou-se o diagnóstico histopatológico com base na classificação da Organização Mundial da Saúde (MISDORP *et al.*, 1999; MISDORP, 2008).

Os carcinomas foram subdivididos em três grupos: G1 – túbulo-papilífero (n=13); G2 – sólido (n=14); e G3 – cribriforme (n=quatro).

Não foi adotado o laudo já estabelecido como diagnóstico anterior. Houve a reclassificação por dois patologistas diferentes de todas as amostras.

4.3 Graduações Histopatológicas

A graduação das lesões foi determinada de acordo com sistema de classificação de Elston & Ellis (1998), levando em consideração formação tubular, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica (Tabela 1 e 2).

TABELA 1 - Graduação histopatológica segundo Elston & Ellis (1998)

Crítérios histológicos	Escore
Formação de túbulos	
Abrange a maior parte do tumor (>75%)	1
Moderado grau de acometimento (de 10 a 75%)	2
Pouco ou ausente (menor que 10%)	3
Pleomorfismo nuclear	
Núcleo pequeno, regular e uniforme	1
Aumento moderado de tamanho, vesiculação e variabilidade	2
Cromatina vesicular com acentuada variação de tamanho e forma	3
Contagem Mitótica	
0 – 8	1
9 – 16	2
≥ 17	3

TABELA 2 - Graduação das neoplasias malignas de mama segundo Elston & Ellis 1998

Pontuação final	Grau	Comentário
3-5	I	Bem diferenciado
6-7	II	Moderadamente diferenciado
8-9	III	Pouco diferenciado

4.4 Índice mitótico

Para a obtenção do índice mitótico realizou-se a contagem de todas as figuras de mitose observadas em 10 campos aleatórios com objetiva de 40x aumento (Tabela 1).

4.5 Procedimentos de Imuno-histoquímica

Cortes das neoplasias mamárias foram posicionados em lâminas eletrostáticas (ImmunoSlide, EasyPath) e mantidas em estufa a 60°C por 18 horas.

Reações de controle positivo foram incluídas nas baterias de lâminas, conforme indicação do fabricante dos anticorpos. O controle negativo foi produzido sem a adição do anticorpo primário em corte de neoplasia mamária, sendo incubado somente o diluente.

Todas as 31 amostras foram processadas segundo o protocolo do Laboratório de Imuno-histoquímica do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ, Unesp Botucatu/SP.

A metodologia utilizada foi a técnica de imuno-histoquímica indireta. Cada anticorpo primário foi padronizado para o tecido mamário da gata junto a outro tecido como controle positivo.

Os cortes nas lâminas permaneceram em estufa a 60 graus Celsius por 12 horas, em seguida foram desparafinizadas e hidratadas.

A recuperação antigênica ocorreu na câmara de pressão microprocessada a 125°C por 30 minutos (Pascal, DakoCytomation) com tampão Citrato pH6,0. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio com dois banhos, cada um de 10 minutos. O bloqueio da proteína endógena foi feito numa solução leite desnatado por uma hora. Todos os anticorpos foram incubados overnight (18 horas) a quatro graus Celsius. As lavagens a partir deste ponto foram realizadas com solução TRIS tamponada com ph 7,4.

Foram utilizados três tipos de kits de anticorpos secundários para amplificação e detecção, o Novolink (Leika biosystems, Polymer Detection System, anti-mouse - rabbit), o Histofine (Nichirei Biosciences, Simple Stain Max PO - multi, Universal Immuno-peroxidase Polymer Anti-mouse and – rabbit), e o EasyLink One (EasyPath - EP-12-20504, anti-mouse – rabbit) (dependendo do tipo de anticorpo (Tabela 3).

O Novolink consiste na aplicação do anticorpo secundário (Novocastra Post Primary), o qual permaneceu 30 minutos sobre as amostras, seguido por lavagem com TRIS, e aplicação do polímero (Novolink Polymer) o qual permaneceu por mais 30 minutos.

Já o sistema Histofine e o EasyLink One possuem o amplificador e o polímero associados no mesmo reagente, assim após a lavagem com TRIS deu-se a aplicação deste que permaneceu por 30 minutos.

Para finalizar a técnica de marcação, a aplicação do Cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Novocastra), do kit Novolink, foi o mesmo utilizado para todos os anticorpos. Sua diluição ocorreu 15 minutos antes do seu uso. A concentração usada foi de 50 µl do cromógeno para cada mL de diluente (Novolink, DAB Substrate Buffer). Em seguida, os cortes foram mantido em

Hematoxilina de Harris por quatro minutos, passado para água por 10 minutos para posterior montagem.

Os anticorpos, as concentrações, de incubação e kit de reagente utilizados neste projeto podem ser vistos nas Tabelas 3 e 4.

TABELA 3 - Pannel de anticorpos utilizados nas amostras de neoplasias malignas de mama de gatas

Anticorpo	Clone	Fabricante	Código
Alfa-SMA	1 A 4	Dako	M0851
CK 14	MU146-UC	BioGenex	MU146-UC
E-Caderina	NCH-38	Leica	6003646
P-Cadherin	56C1	Neomarkers	MS-1741-S
Ki-67	MIB-1	Dako	M7240
Caspase-3 clivada	policlonal	Cell Signaling Technology	9661

TABELA 4 – Diluições, tempo de incubação e sistema de amplificação e detecção utilizados.

Anticorpo	Diluição	Incubação	Kit Detecção/Ac* secundário
Alfa-SMA	1:1250	Overnight	Histofine
CK14	1:300	Overnight	Novolink
E-Caderina	1:50	Overnight	Novolink
P-Caderina	1:100	Overnight	EasyLink One
Ki-67	1:100	Overnight	Novolink
Caspase -3 clivada	1:300	Overnight	Histofine

*Ac = anticorpo

4.6 Análise das reações

A avaliação da reação de imuno-histoquímica foi realizada com auxílio de um microscópio acoplado a câmera digital (Carl Zeiss – AX10, imager. A1; AxioCam MRc – 60 N-C 2/3” 0,63x) do programa de análise de imagens AxioVision Rel. 4,6, considerando-se a intensidade de marcação (intensa, moderada e fraca) assim como localização morfológica de tal marcação (membranosa, nuclear ou citoplasmática).

Para o anticorpo Ki-67 e caspase-3 clivada a reação imuno-histoquímica foi estimada pela marcação positiva das células neoplásicas. A contagem 100 células em cada um dos dez campos aleatórios, foi a metodologia utilizada.

Estes valores foram transformados em percentual de células positivas e submetidos à análise estatística.

Para as reações imuno-histoquímicas dos marcadores; CK 14, alfa SMA, E-caderina e P-caderina se considerou como positivas somente as células com marcação citoplasmática. A localização dentro do tumor, sendo esta periférica ou central e a sua intensidade também foi considerada. Os marcadores estruturais CK14 e alfa-SMA foram analisados de acordo com a distribuição e marcação positiva ou negativa das células neoplásicas. Para ambos os anticorpos o resultado positivo foi dado àquelas amostras com marcação superior a 1% (RASOTTO *et al.*, 2014; MUSCATELLO *et al.*, 2015)

Tanto para E-caderina como para P-caderina se obteve escore através da contagem de 100 células neoplásicas em 10 campos aleatórios em objetiva de maior aumento (40x). Para E-caderina o *score* respeitou a seguinte classificação: 0 a 25% = 0; 25 a 50% = 1; 51 a 75% = 2 e maior que 75% = 3. Já para P-caderina: 0 a 10% = 0; 10 a 25% = 1; 26 a 50% = 2; e maior que 50% = 3. Para permitir a comparação entre estes dois anticorpos, adotou-se como positivo para E-caderina aqueles com expressão superior a dez por cento e P-caderina foram considerados positivos aqueles com expressão maior ou igual a 75% (FIGUEIRA *et al.*, 2015).

4.7 Forma de análise dos resultados

Inicialmente a distribuição das variáveis graduação histopatológica, Ki-67 e caspase 3 clivada foram avaliadas e, posteriormente, estatísticas descritivas foram produzidas. A comparação entre as médias de Ki-67, bem como de caspase 3, ambas por tipo tumoral, índice mitótico e grau foi realizada por meio de análise de variância (anova), seguida por pós-teste de Tukey. A correlação do índice proliferativo com o índice apoptótico foi verificada pelo cálculo do coeficiente de correlação linear de Person.

Para análise de E-cad e P-cad para cada tipo e grau, foi utilizado teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn's.

A associação entre a marcação positiva de CK14 e alfa-SMA de acordo com a classificação histopatológica e grau foi verificada através do teste de Fisher.

As análises estatísticas, e as representações gráficas, foram realizados com o software estatístico GraphPad 5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA), sendo consideradas diferenças estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Dados epidemiológicos da pacientes felinas portadoras de câncer de mama

Dos 31 animais acometidos por câncer de mama analisados neste trabalho 21 gatas (68,00%) não tinham raça definida (SRD), sete (22,50%) eram da raça Siamês e três (9,50%) da raça Persa.

A idade mínima foi de 5 anos, a máxima de 20 anos e a média de 12 anos

5.2 Classificação histopatológica

As 31 amostras de tecido neoplásico mamário, foram classificadas e agrupadas de acordo com a seguinte relação: carcinoma túbulo-papilífero simples (Figura 1) com 13 amostras (42%); carcinoma sólido simples (Figura 2) com 14 amostras (45,50%) e carcinoma cribriforme (Figura 3)(Tabela 5).

TABELA 5 – Número e percentual de cada tipo histológico dos carcinomas mamários selecionadas para o estudo.

Carcinomas	N	Percentual
Carcinoma Tubulo-papilífero Simples	13	42,00%
Carcinoma Sólido Simples	14	45,50%
Carcinoma Cribriforme	4	12,50%
Total	31	100%

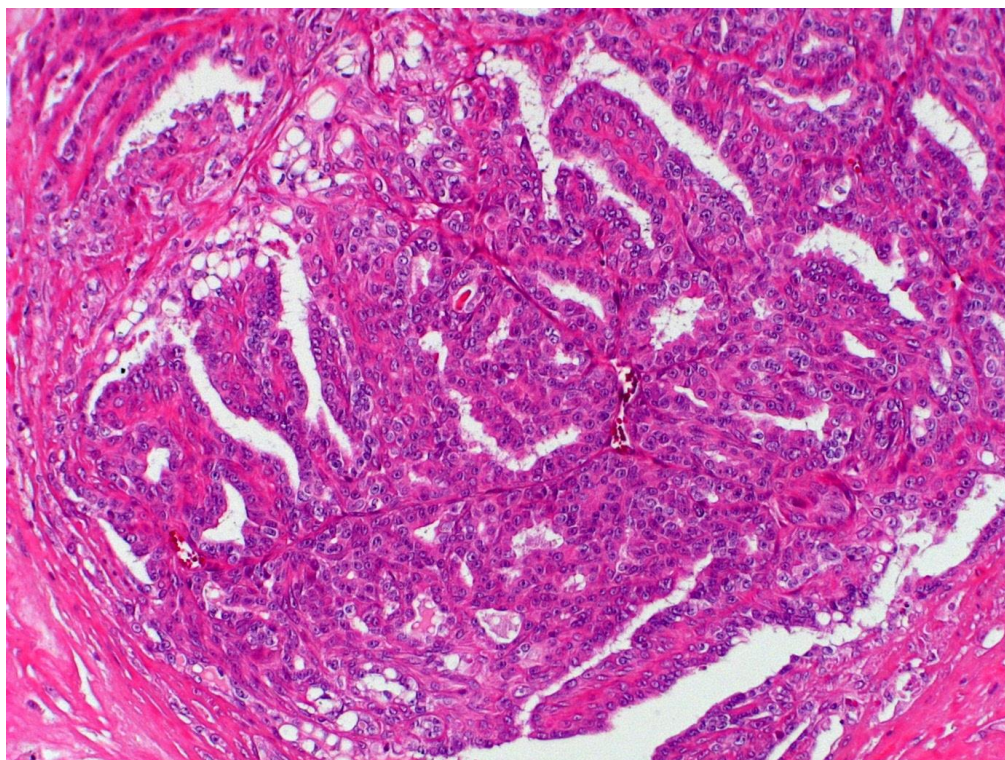


FIGURA 1 – Fotomicrografia de carcinoma mamário túbulo-papilífero em gata. Caracterizado pelas formações de túbulos e/ou projeções papilares. Coloração de HE em objetiva de 20x

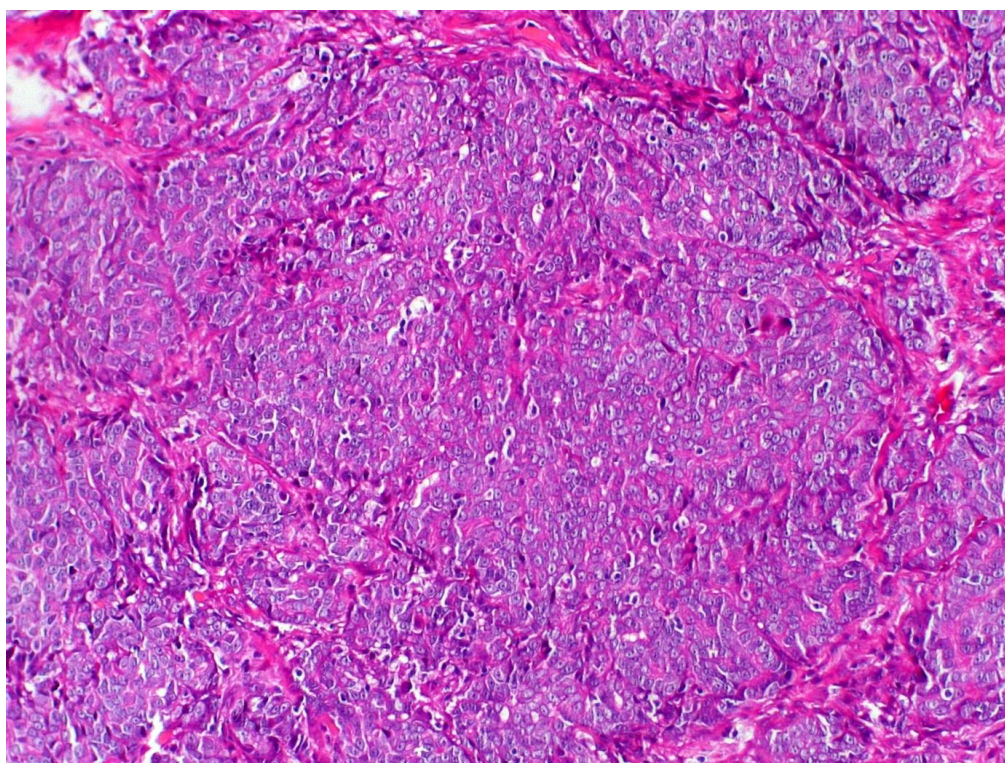


FIGURA 2 - Fotomicrografia de carcinoma mamário sólido em gata. Caracterizado pelo arranjo das células tumorais em lençóis, cordões ou ninhos sólidos. Coloração de HE em objetiva de 20x.

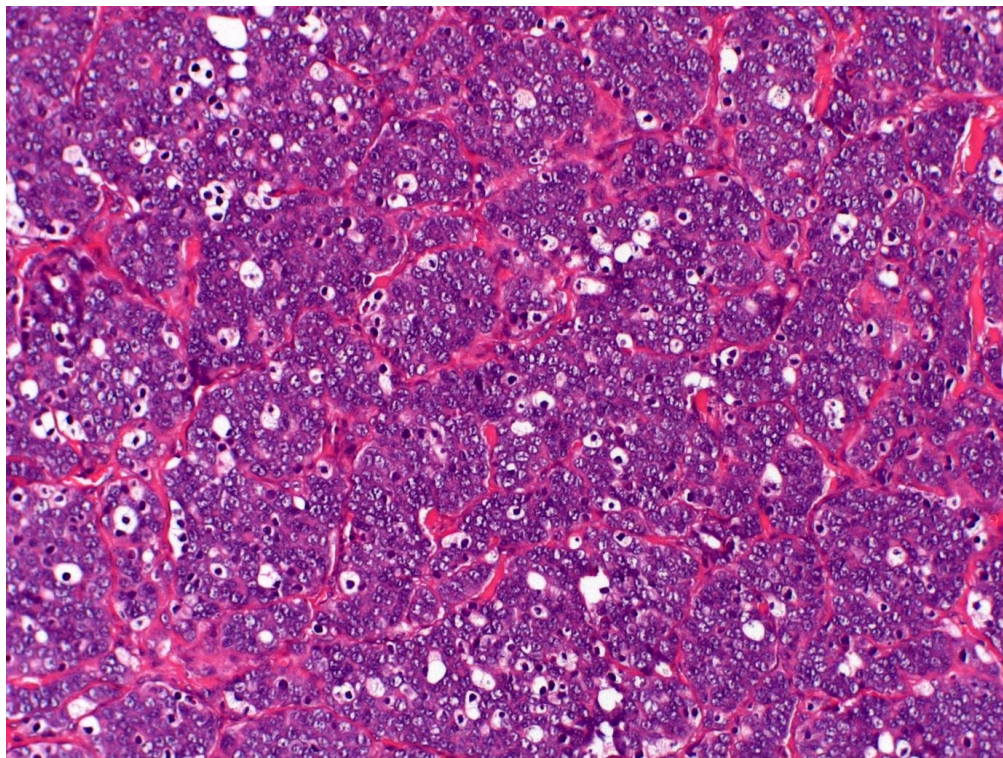


FIGURA 3 - Fotomicrografia de carcinoma mamário cribriforme em gata. O tipo de arranjo sólido, com pequenas aberturas, semelhante a uma “peneira”. Este tipo é comum a espécie felina. Coloração de HE em objetiva de 20x

5.3 Graduação histopatológica

Com relação à graduação histopatológica sem se levar em conta o tipo de carcinoma obteve-se os seguintes resultados para as graduações I, II e III, três (10,00%); 13 (42,00%) e 15 (48,00%) casos respectivamente.

Dos casos de carcinoma túbulo-papilífero; três (23%) foram classificados como de grau I e 10 (77%) como de grau II.

Para os 14 casos de carcinoma sólido dois (14%) foram classificados como de grau II e 12 (86%) como de grau III.

E finalmente, dos quatro carcinomas do tipo cribriforme, um (25%) foi classificado com de grau II e três (75%) como de grau III.

A Tabela 6. apresenta esses dados.

TABELA 6 – Frequência de casos por tipo e grau histológico dos carcinomas de mama em gatas.

Tipo	Grau I	Grau II	Grau III	Total
Tubulo-papilífero	3 (23%)	10 (77%)	0	13 (42%)
Sólido	0	2 (14%)	12 (86%)	14 (45%)
Cribriforme	0	1 (25%)	3 (75%)	4 (13%)
Total	3 (10%)	13 (42%)	15 (48%)	31 (100%)

Sem se levar em conta o tipo histopatológico, dos 31 casos, observou-se invasão vascular linfática e/ou sanguínea em 11 amostras (35,50%) (Figura 4). Levando em consideração os tipos histopatológicos, obtivemos: cinco túbulo-papilíferos (45,50%); cinco (45,50%) sólidos; e apenas um (9,00%) do tipo cribriforme (Tabela 7).

TABELA 7 - Frequência de invasão vascular e tipo histológico das neoplasias mamárias malignas de gatas.

Tipo	Não	Sim
Túbulo-papilífero	8 (40,00%)	5 (45,50%)
Sólido	9 (45,00%)	5 (45,50%)
Cribriforme	3 (15,00%)	1 (9,00%)
Carcinoma Mamário	20 (100%)	11 (100%)

5.4 Índice mitótico

Em números absolutos, a contagem de mitoses variou de 6 até 86. Sendo de 33 o valor médio. Considerando-se os escores propostos, quatro animais (12,90%) apresentaram escore 1; dois (6,45%) escore 2; e 25 (80,65%) escore 3 (Tabela 8).

As figuras de mitose estão identificadas com setas na figura 5.

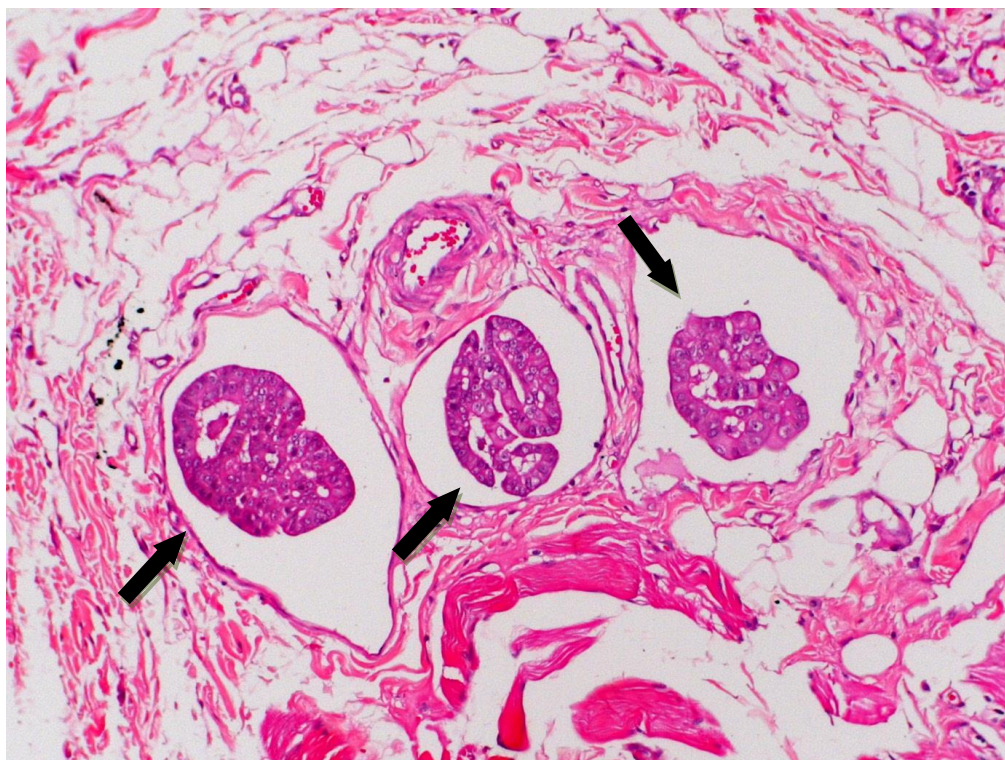


FIGURA 4 - Fotomicrografia de carcinoma mamário túbulo-papilífero em gata. Notar os êmbolos de células neoplásicas no interior dos vasos linfáticos (setas). HE, objetiva de 20x

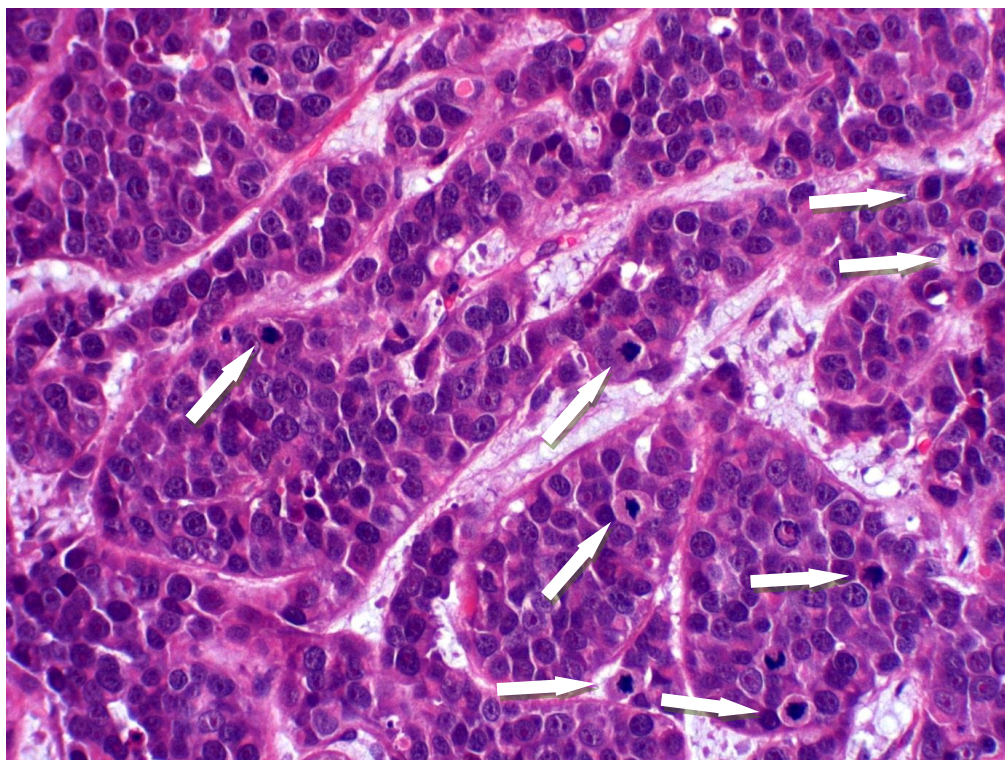


FIGURA 5 - Fotomicrografia de carcinoma mamário sólido em gata. Notar o acentuado número de mitoses (setas) nas regiões periféricas dos acinos. HE objetiva de 40x

Os três (100%) carcinomas mamários de grau I obtiveram índice mitótico 1; dos 13 de grau II, um (8%) com escore 1, dois (15%) com escore 3 e dez (77%) com escore 3; e dos 15 carcinomas grau III, todos (100%) com escore 3. A relação entre os grupos, considerando as contagens de figuras mitóticas, ao compararmos com o grau, houve diferença significativa entre os I e II, e também entre I e III ($p=0,0002$) (Figura 6).

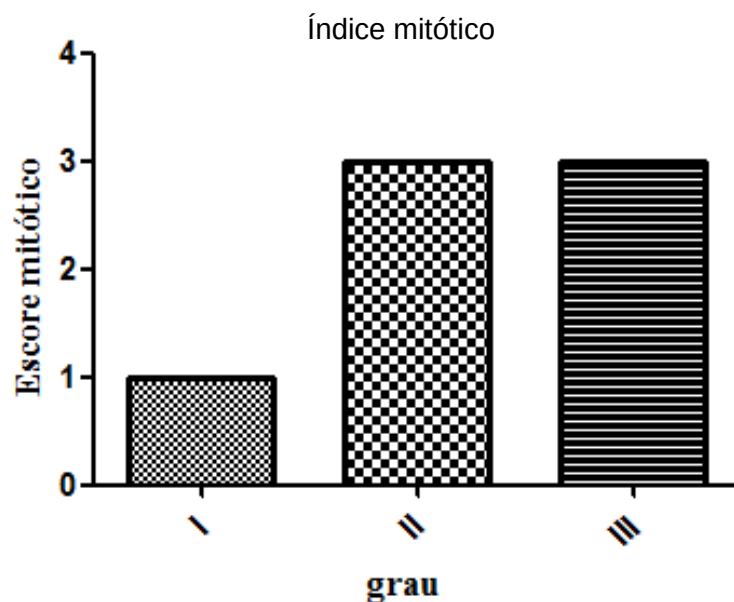


FIGURA 6 - Escore mitótico em relação ao grau das neoplasias mamárias das gatas

Levando-se em consideração os tipos histológicos dos carcinomas e seus escores, entre as amostras de carcinomas túbulo-papilíferos, obtivemos quatro (30,50%) escore 1, dois (15,50%) escore 2 e sete (54,00%) escores 3.

As 14 amostras de carcinoma sólido todas (100%) foram de escore 3; e as quatro (100%) amostras de carcinoma cribriforme apresentaram escore 3 (Tabela 8).

TABELA 8 - Tipos histológico e seus respectivos índices mitóticos (IM) nos 31 casos de carcinoma mamário nas gatas.

Tipo histológico	IM 1	IM 2	IM 3	N
Túbulo-papilífero	4	2	7	13
Sólido	0	0	14	14
Cribriforme	0	0	4	4
Total	4	2	25	31

O valor médio do número de mitoses para cada tipo foi: túbulo-papilífero – 19,90; sólido – 39,50; e cribriforme – 50,50. Em relação a contagens de figuras mitóticas, comparando os três grupos histopatológicos, houve diferença significativa entre os túbulo-papilífero e sólido ($p = 0,0072$) (Tabela 9).

TABELA 9 - Número médio de mitoses apresentados em cada tipo histopatológico de carcinoma mamário das gatas

Tipo	Número de mitoses
Túbulo-papilífero	19,90 a
Sólido	39,50 b
Cribriforme	50,50 a

*letras iguais representam que não houve diferença estatística entre os grupos comparados pelo teste de Kruskal-Wallis onde $p < 0,05$.

5.5 Índice de proliferação Ki-67

Para o índice de proliferação (IP), o valor mínimo observado foi de 10%, o médio 36%, e o máximo 67% de células marcadas.

A média relacionada à graduação histopatológica foi de 23,33% para GI; 38,54% para GII e 36,00% para GIII. A correlação do IP foi realizada quanto a graduação histopatológica e não houve diferença estatística entre eles ($p = 0,2129$; $r = 0,1046$) (Tabela 10).

TABELA 10 - IP médio de cada grau histológico apresentado pelas gatas com carcinoma mamário.

Grau	N	IP
I	3	23,33%
II	13	38,54%
III	15	36,00%

Já a média estabelecida para o índice de proliferação para cada um dos tipos histológicos foi de túbulo-papilífero – 32,54%; sólido – 38,26%; e cribriforme – 38,00%. Não houve diferença significativa em relação aos três grupos histopatológicos ($p = 0,5229$; $r = 0,04525$) (Tabela 11).

TABELA 11 - Valor Médio do IP apresentado pelas gatas com neoplasia maligna mamária segundo tipo histopatológico

Tipo	N	IP
Túbulo-papilífero	13	32,54%
Sólido	14	38,26%
Cribriforme	4	38,00%

As marcações para o anticorpo Ki-67 podem ser observados nas figuras 7, 8 e 9.

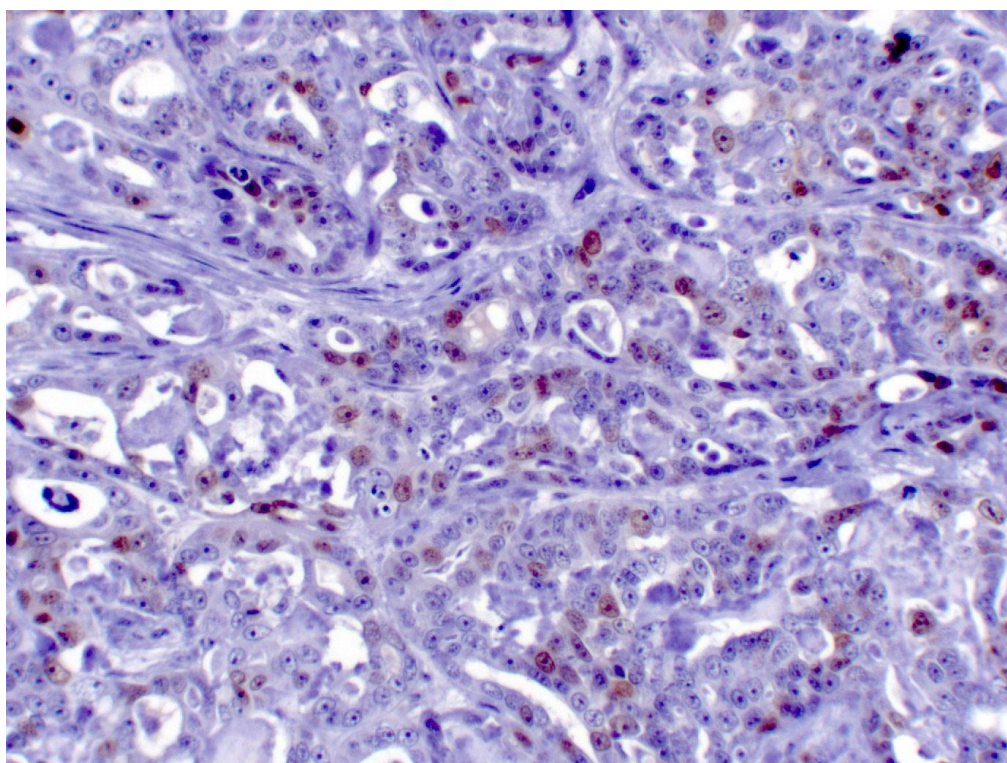


FIGURA 7 – Fotomicrografia do carcinoma túbulo-papilífero em gata, marcação para Ki-67 com baixo índice proliferativo, Novolink, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris BAR, objetiva 40x.

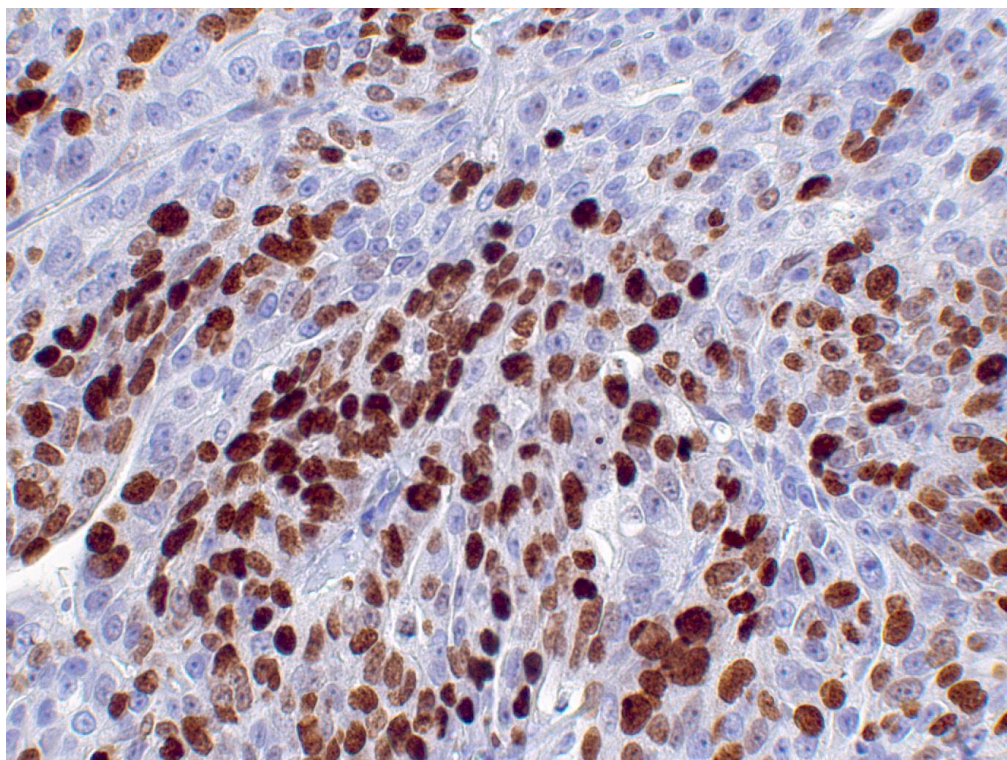


FIGURA 8 - Fotomicrografia do carcinoma sólido em gata, marcação para Ki-67 com alto índice proliferativo, Novolink, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris BAR, objetiva 40x.

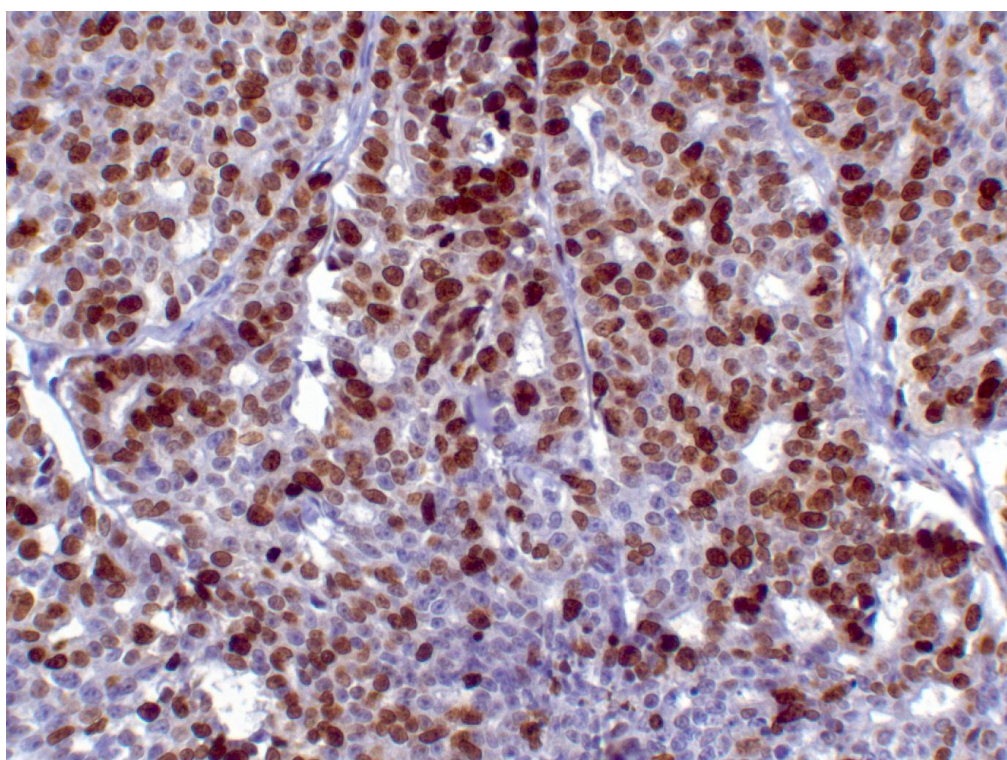


FIGURA 9 - Fotomicrografia do carcinoma cribriforme em gata, marcação para Ki-67 com alto índice proliferativo, Novolink, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris BAR, objetiva 40x.

5.6 Correlação de índice mitótico com índice proliferativo

Foram comparados os índices mitóticos e proliferativos. Sendo que o agrupamento respeita os escores já estabelecidos de índice mitótico. Assim sendo a média obtida para os escores IM1, IM2 e IM3 foram de 23,25%, 26,00%, e 38,54% respectivamente (Tabela 12).

TABELA 12 - Índice proliferativo médio observado em cada escore do índice mitótico dos carcinomas mamários das gatas.

	IM1	IM2	IM3
IP médio	23,25% a	26,00% ab	38,54% b
N	3	13	15

*letras iguais na mesma linha representam que não houve diferença estatística entre os grupos comparados pelo teste de Kruskal-Wallis onde $p < 0,05$.

Conforme observado na figura 10, houve diferença significativa do índice proliferativo entre os escores 1 e 3 ($p = 0,0123$).

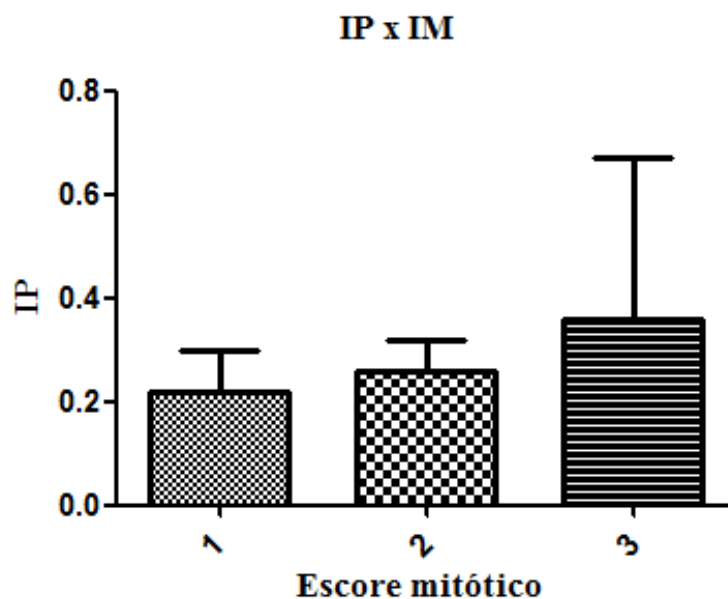


FIGURA 10 - Relação do índice proliferativo (IP) de acordo com os escores mitóticos apresentados pelas amostras ($p = 0,0123$).

5.7 Expressão de Caspase 3 Clivada e Índice Apoptótico (IA)

No que diz respeito ao índice apoptótico o valor mínimo observado foi de 2%; o médio 13% e o máximo 27%.

A média relacionada à graduação histopatológica foi de 13% para GI; 15% para GII e 11% para GIII. Não Houve diferença significativa quanto a graduação histopatológica ($P = 0,1500$; $r = 0,1408$) (Tabela 13).

TABELA 13 - Índice apoptótico médio apresentado por cada grau histológico nas 31 amostras de carcinoma mamário de gatas.

Grau	N	IA
I	3	13%
II	13	15%
III	15	11%

A média estabelecida para o índice apoptótico para cada um dos tipos histológicos foi de 15% para os carcinomas túbulo-papilíferos; 11% para os carcinomas sólidos e 16% para os carcinomas cribriforme. Referente aos tipos histopatológicos também não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,1363$; $r = 0,2025$) (Tabela 14).

TABELA 14 - Tipos histológicos e seus respectivos índices de apoptose nas 31 amostras de carcinoma mamário em gatas.

Tipo	N	IA
Túbulo-papilífero	13	15%
Sólido	14	11%
Cribriforme	4	16%

A marcação positiva do anticorpo caspase-3 clivada, pode ser observada nas figuras 11 e 12.

5.8 Relação do índice proliferativo com o índice apoptótico

Comparando a taxa proliferativa com a apoptótica, não houve diferença significativa quanto aos graus, nem mesmo quanto aos tipos histopatológicos ($p = 0,7027$; $r = 0,005099$).

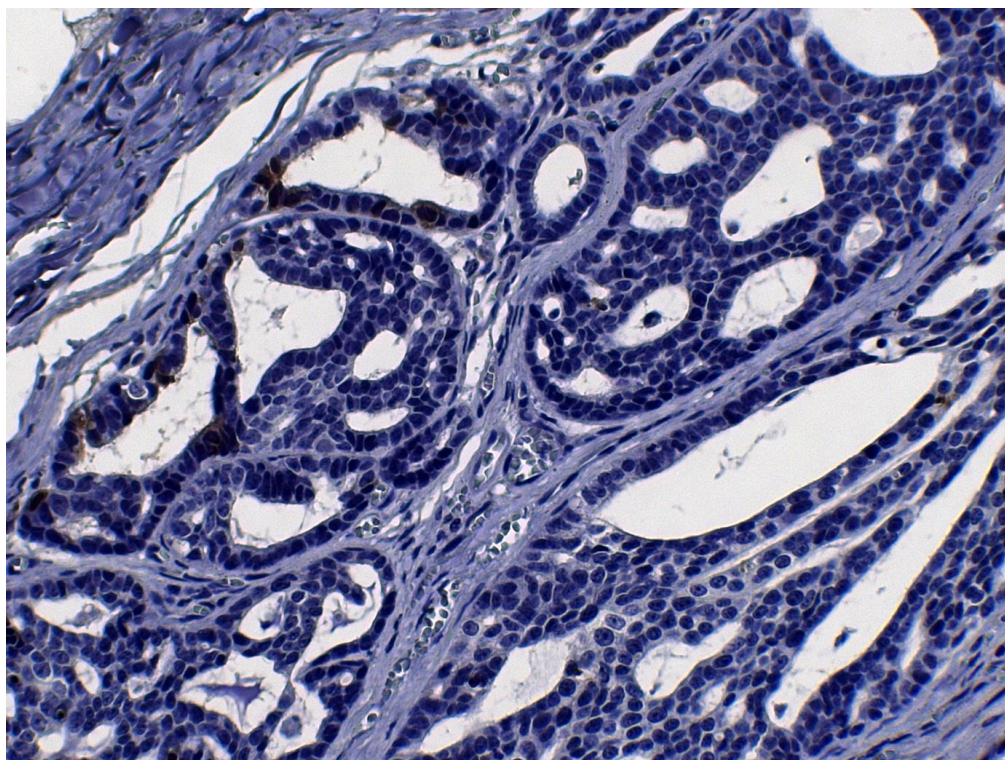


FIGURA 11 – Fotomicrografia de carcinoma túbulo-papilífero em gata, marcação de Caspase 3 com baixo índice apoptótico, Histofine, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris BAR, objetiva 40x.

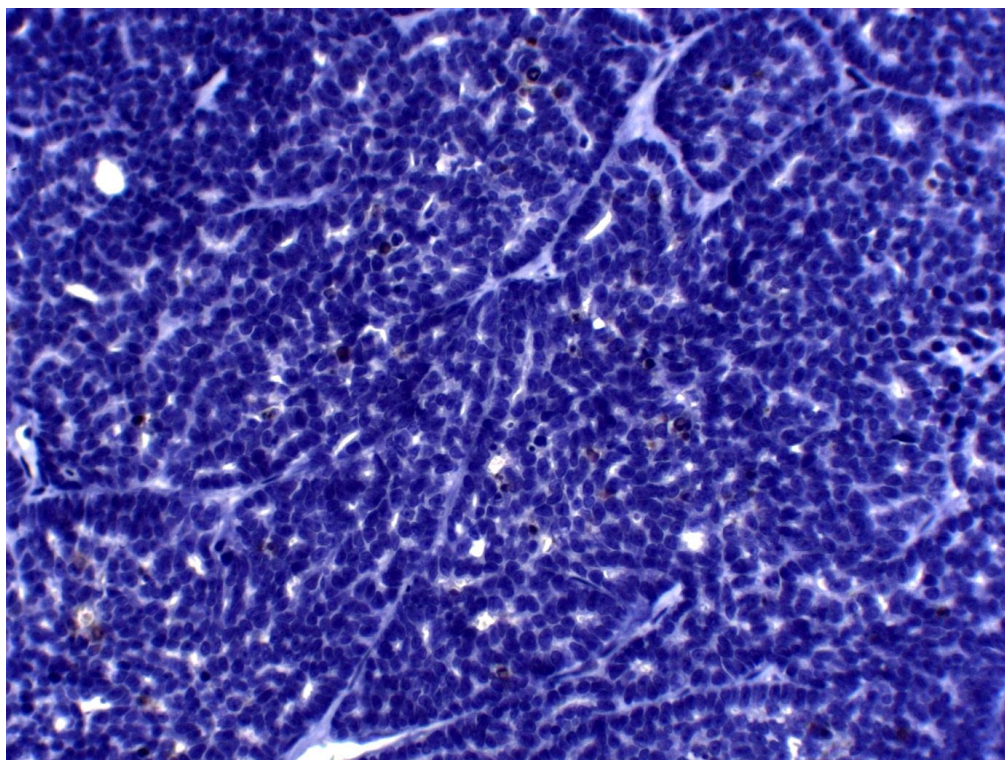


FIGURA 12 – Fotomicrografia de carcinoma cribriforme em gata, marcação de Caspase 3, com baixo índice apoptótico, Histofine, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris BAR, objetiva 40x.

5.9 Análise das células basais CK 14

A marcação das células mioepiteliais/basais foi evidente para o anticorpo CK14 em quase todas as amostras (Figura 13 e 14).

Dez amostras foram negativas para expressão de CK 14 sendo um carcinoma papilífero grau II; um carcinoma sólido grau II; seis carcinomas sólidos grau III; um carcinoma cribriforme grau II e por fim um carcinoma cribriforme grau III.

Segundo análise estatística, não houve diferença significativa entre os grupos quanto aos tipos histopatológicos ($p = 0,06$), nem mesmo quanto ao grau ($p = 0,24$) para expressão de CK 14 (Tabela 15).

TABELA 15 – Tipo e grau histológico das 31 amostras de carcinoma mamário em gatas com marcação positiva para CK14.

Tipo	I	II	III
Túbulo-papilífero	3	9	0
Sólido	0	1	6
Cribriforme	0	0	2

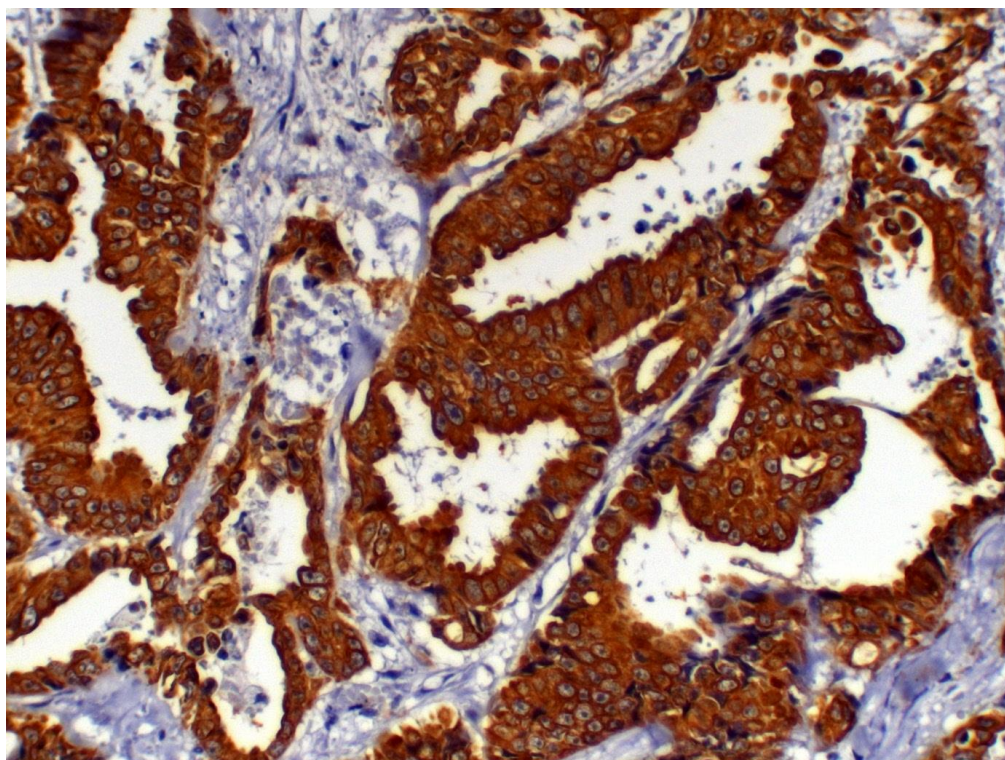


FIGURA 13 - Fotomicrografia de Carcinoma túbulo-papilífero em gata. Notar a marcação citoplasmática fortemente positiva para o anticorpo CK 14, Novolink, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris BAR, objetiva 40x.

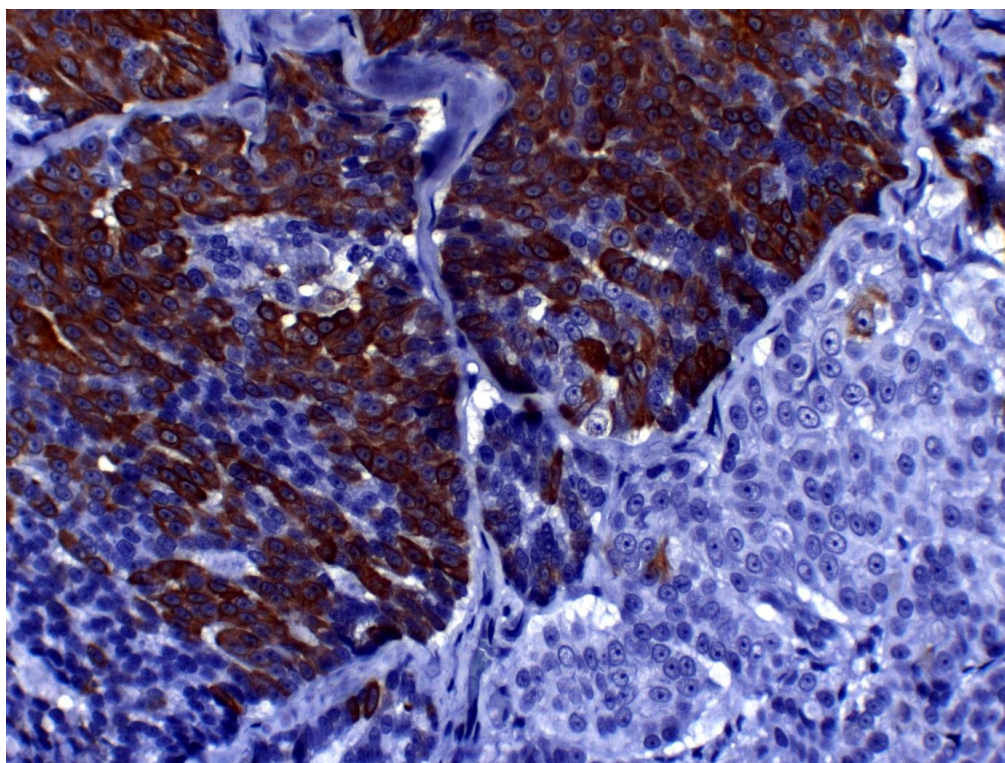


FIGURA 14 - Fotomicrografia de carcinoma sólido em gata. Notar a marcação citoplasmática fortemente positiva para o anticorpo CK 14 Novolink, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris BAR, objetiva 40x.

5.10 Expressão de alfa actina de músculo liso na neoplasia mamária felina

Na quase totalidade das amostras não ocorreu marcação positiva nas células neoplásicas para alfa actina de músculo liso, ficando esta marcação restrita ao tecido de sustentação estromal, assim como às fibras musculares lisas que compõem a parede das artérias e arteríolas (Figuras 15 e 16).

De todos os tecidos analisados, apenas três mostraram expressão positiva para alfa-SMA pelas células neoplásicas. Este número corresponde a 9,70% das amostras analisadas. Destes três, um era carcinoma papilífero de grau I e dois carcinomas sólidos de grau III (Tabela 16).

Pela análise estatística, não houve diferença significativa entre os grupos quanto aos tipos histopatológicos ($p = 1,00$), nem mesmo quanto ao grau ($p = 0,20$) (Tabela 16). Das três amostras com marcação positiva para alfa-SMA, um carcinoma sólido grau III apresentou marcação positiva para CK14. As outras duas amostras foram positivas para alfa-SMA e negativas para CK14, sendo um carcinoma túbulo-papilífero grau I e a outra um carcinoma sólido grau III.

TABELA 16 - Marcação de CK14 e alfa-SMA quanto aos tipos e graduação histológicos das 31 amostras de carcinoma mamário em gatas.

	NEGATIVOS	POSITIVOS	TOTAL
CK14			
Tipo			
Cribriforme	1 (33,30%)	2 (66,70%)	3
Sólido	8 (53,30%)	7 (46,70%)	15
Túbulo-Papilífero	1 (7,70%)	12 (92,30%)	13
Grau			
I	0 (0,00%)	3 (100%)	3
II	3 (23,08%)	10 (76,92%)	13
III	7 (46,66%)	8 (53,33%)	15
Total Geral	10 (32,25%)	21 (67,75%)	31
alfa-SMA			
Tipo			
Cribriforme	3 (100,00%)	0 (0,00%)	3
Sólido	13 (86,67%)	2 (13,33%)	15
Túbulo-Papilífero	12 (92,30%)	1 (7,70%)	13
Grau			
I	2 (66,77%)	1 (33,33%)	3
II	13 (100%)	0 (0,00%)	13
III	13 (86,67%)	2 (13,33%)	15
Total Geral	28 (90,32%)	3 (9,68%)	31

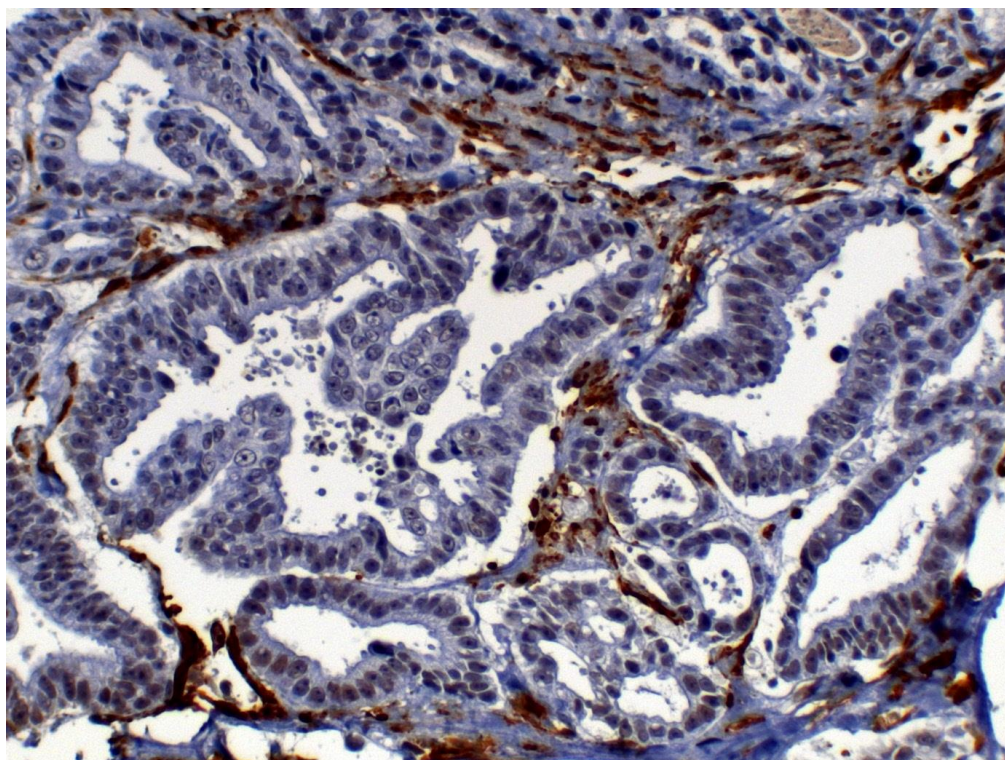


FIGURA 15 - Fotomicrografia de carcinoma túbulo-papilífero em gata. Ausência de marcação nas células neoplásicas para o anticorpo alfa-SMA, Histofine, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris BAR, objetiva 40x.

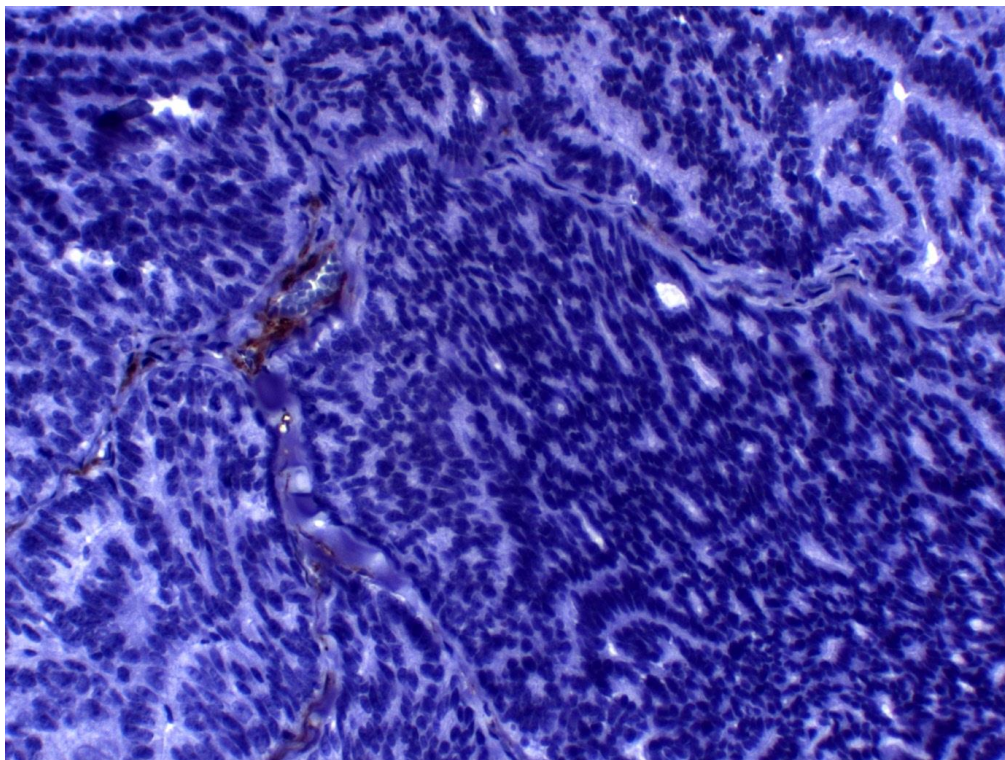


FIGURA 16 - Fotomicrografia de carcinoma sólido em gata. Notar a ausência de marcação nas células neoplásicas e a positividade das células endoteliais para o anticorpo alfa-SMA, Histofine, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris BAR, objetiva 40x.

5.11 Expressão das moléculas de adesão E-caderina e P-caderina

Para a expressão de E-caderina (E-cad) foi observada marcação positiva em 72% das amostras de grau I com escore 2 de marcação, em 42% das amostras de grau II com escore de marcação 1 e em 27% das amostras de grau III com escore de marcação 1. Houve diferença significativa entre grau I e III quando analisados os percentuais de marcação ($p = 0,0324$) (Figura 17) (tabela 17).

TABELA 17 - E-cad em escore e em percentual segundo a graduação da neoplasia das 31 amostras de carcinoma mamário de gatas.

	I	II	III
Escore	2 a	1 ab	1 b
Porcentagem	72% a	42% ab	27% b

* letras iguais na mesma linha representam que não houve diferença estatística entre os grupos comparados pelo teste de Kruskal-Wallis onde $p < 0,05$.

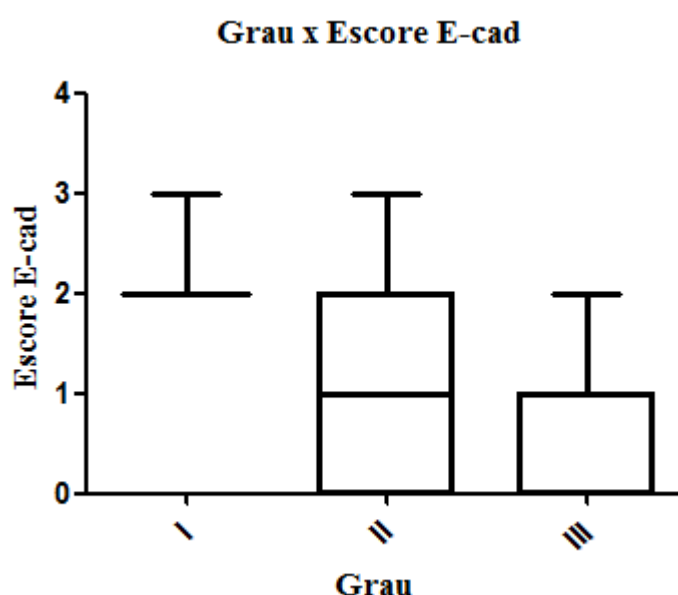


FIGURA 17 - Escore de E-cad apresentado em cada grau neoplásico

Quando foram considerados os tipos histológicos foi observada positividade em 38% dos carcinomas túbulo-papilíferos com escore 1 de marcação, 28% dos carcinomas sólidos com escore 1 de marcação e 28% dos

carcinomas cribriformes com escore 1 de marcação. Os tipos histopatológicos apresentaram diferença relevante entre túbulo-papilíferos e sólidos quando analisados perante percentual de marcação ($p = 0,0418$) (Figura 18) (Tabela 18).

TABELA 18 - E-cad em escore e em percentual segundo tipo histológico das 31 amostras de carcinoma mamário de gatas.

	Túbulo-papilífero	Sólido	Cribriforme
Escore	1 a	1 a	1 a
Porcentagem	38% a	28% b	28% a

* letras iguais na mesma linha representam que não houve diferença estatística entre os grupos comparados.

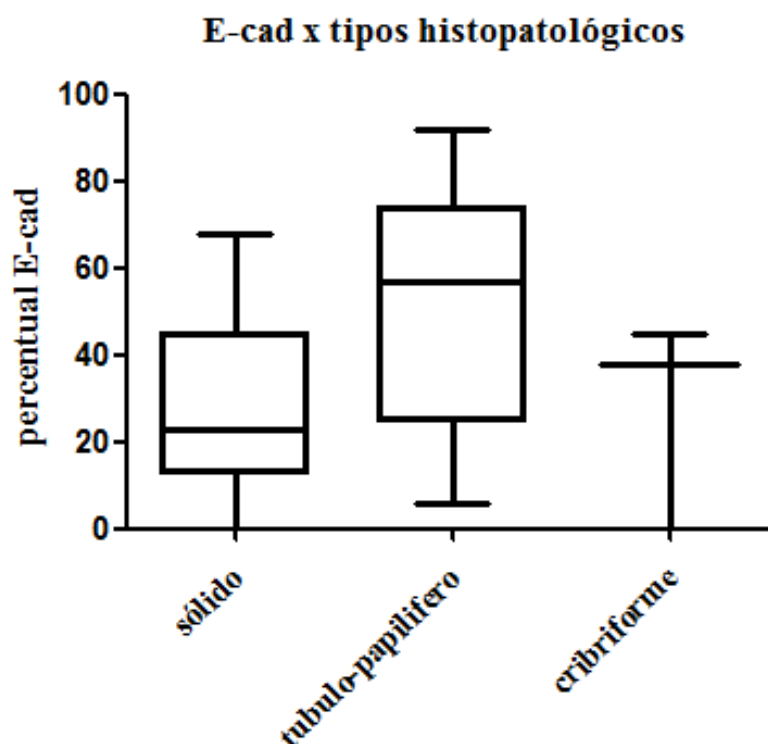


FIGURA 18 - Avaliação percentual de E-cad segundo agrupamento em três tipos histopatológicos

Para a expressão de P-cad foi observada marcação positiva em 60% das amostras de grau 1 com escore de marcação 3, em 49% das amostras de grau II com escore de marcação 2 e 62% das amostras de grau III com escore de marcação 3.

Quando foram considerados os tipos histológicos foi observada positividade em 50% dos carcinomas tubulares, 51% dos carcinomas papilíferos, 58% dos carcinomas sólidos e 73% dos carcinomas cribriformes. O escore 3 de marcação foi atribuído a todas as amostras, independentemente do tipo histológico do tumor.

Não houve diferença estatística significativa para nenhum dos parâmetros considerados.

A única amostra que foi negativa para ambos foi um sólido grau III, o qual apresentou expressão nula de E-cad e apenas 8% para P-cad, o que classificou ambos como negativo (Tabela 19).

Ao comparar os resultado de E-cad com P-cad, não houve diferença significativa ($p = 1,00$).

As figuras 19 e 20 são referentes respectivamente a marcação observada em E-cad e P-cad.

TABELA 19 - Relação da marcação positiva e negativa de E-cad e P-cad nas 31 amostras de carcinoma mamário de gatas.

N	E-cad	P-cad	E-cad/P-cad
1	-	+	-/+
2	+	+	+/+
3	-	+	-/+
4	-	+	-/+
5	-	+	-/+
6	+	+	+/+
7	-	+	-/+
8	+	+	+/+
9	-	+	-/+
10	-	+	-/+
11	-	+	-/+
12	-	+	-/+
13	-	+	-/+
14	-	+	-/+
15	-	+	-/+
16	-	+	-/+
17	-	+	-/+
18	-	+	-/+
19	-	+	-/+
20	-	+	-/+
21	-	-	-/-
22	-	+	-/+
23	-	+	-/+
24	-	+	-/+
25	-	+	-/+
26	-	+	-/+
27	-	+	-/+
28	-	+	-/+
29	-	+	-/+
30	-	+	-/+
31	-	+	-/+

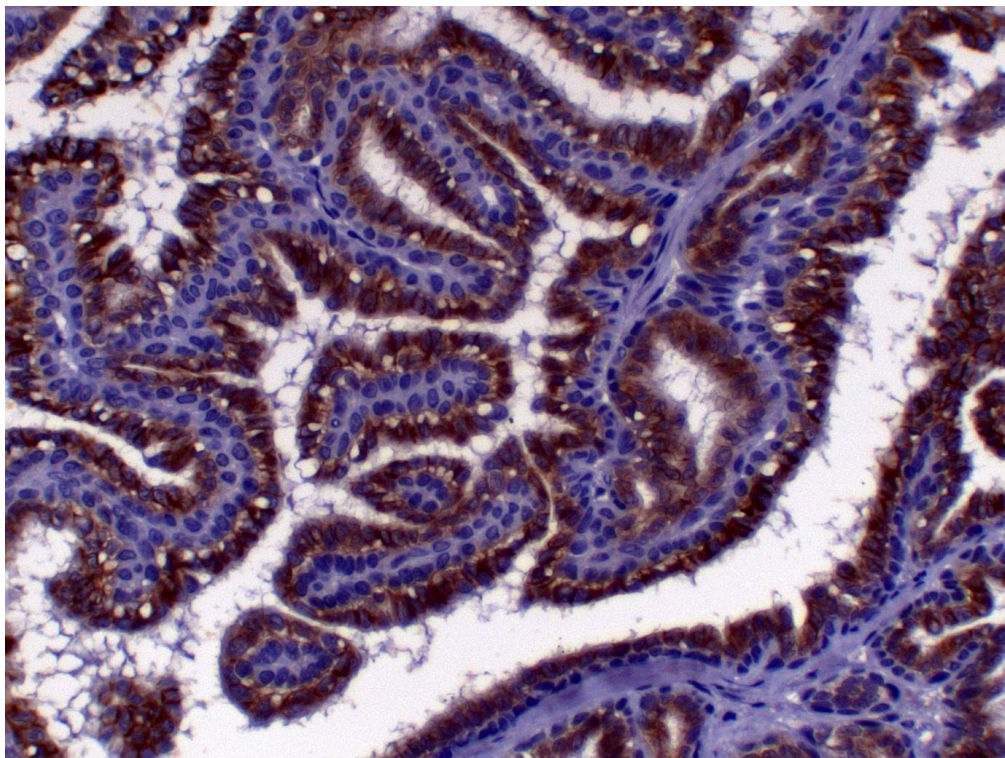


FIGURA 19 - Fotomicrografia de carcinoma túbulo-papilífero em gata. Notar a marcação nas células neoplásicas para o anticorpo E-cad, Novolink, DAB, contracorada com Hematoxilina de Harris BAR, objetiva de 40x.

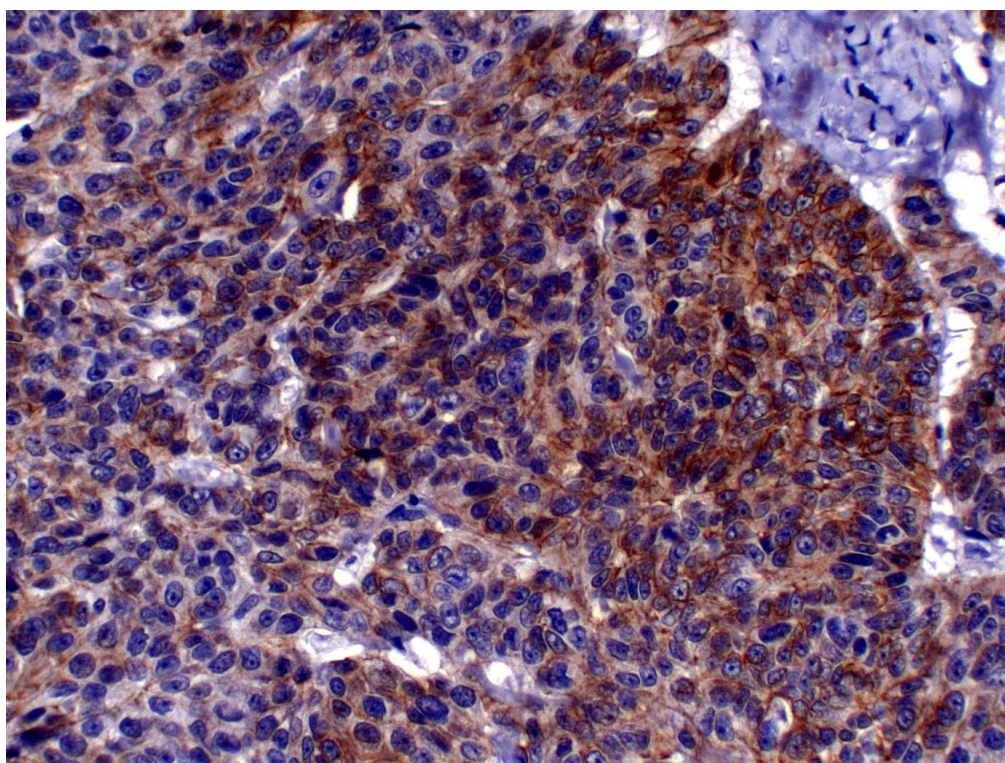


FIGURA 20 - Fotomicrografia de carcinoma sólido em gata. Notar a marcação nas células neoplásicas para o anticorpo P-cad, EasyPath, DAB, contracorada com Hematoxilina de Harris BAR, objetiva de 40x.

6 DISCUSSÃO

6.1 Dados epidemiológicos

Recentemente no Brasil ocorreu uma difusão maior dos gatos como animais de estimação ou “pets”, mostrando esta população felina grande heterogeneidade. A maior parte destes animais são considerados como sem raça definida (SRD). Na América do Norte, a incidência da neoplasia mamária nas gatas é duas vezes maior nas fêmeas da raça Siamês (HAYES *et al*, 1981). As gatas de pelo curto assim como as persas também apresentam maior propensão a desenvolver a doença (SHAFIEE *et al*, 2013). Em outras localidades, a raça Siamês também é frequentemente afetada, além da gata doméstico no Japão (ITO *et al*, 1996). Os dados obtidos no presente trabalho concordam em parte com a literatura, já que a maior frequência encontrada foi em gatas SRDs, vindo em sequência a raça Siamês (predisposição racial), seguida da raça Persa. A maior incidência encontrada em gatas SRD, provavelmente se deve ao fato das raças felinas serem ainda pouco difundidas no Brasil.

Dentre as amostras analisadas, a faixa etária variou entre cinco e 20 anos, sendo estabelecida a média de 12 anos, o que está de acordo com a literatura consultada (ZAPPULLI *et al*, 2005; De NARDI *et al*, 2009; RUTTEMAN *et al.*, 2013). Nas gatas mais jovens, ou seja até 10 anos de idade, os tipos histopatológicos mais frequentes foram aqueles mais diferenciados, ou seja os carcinomas túbulo-papilíferos que possuíam graduação histológica I ou II. Já nas gatas acima de 10 anos, os tipos predominantes foram os carcinomas sólidos e cribriformes de alto grau. Isto pode ser justificado pelo tempo, que leva ao acúmulo de erros no DNA, gerando a instabilidade genômica. Assim a chance de ser mais agressivo e menos diferenciado é nas gatas com mais idade (SORENMO *et al.*, 2013). Geralmente em animais acima de 12 anos as lesões observadas são de graduação III (SEIXAS *et al*, 2011).

6.2 Tipo e graduação histológica

Das nossas amostras, o tipo histopatológico mais frequente foi o sólido, seguido do túbulo-papilífero e cribriforme. Os dados da literatura no que diz respeito a este aspecto são conflitantes. Tumores túbulo-papilíferos são apontados como os mais comuns por alguns autores, sendo sua frequência estabelecida entre 46,5% (SILVA *et al*, 2016) e 50% (DIAS PEREIRA *et al*, 2004). Porém, outro estudo corrobora nossos achados, indicando os carcinomas sólidos como os mais frequentes com 39%, embora cite como segundo em frequência, com 34% os tumores de morfologia mista, que não foram encontrados em nosso estudo (SEIXAS *et al.*, 2011). A desuniformidade de critérios e denominações nas classificações, dificultando a comparação de resultados. Alguns autores incluem tipos denominados como carcinomas micropapilares ou mesmo de morfologia mista que não foram considerados neste estudo (SEIXAS *et al.*, 2008; SEIXAS *et al.*, 2011).

O sistema de graduação das neoplasias empregado neste estudo (ELSTON & ELLIS, 1998), embora elaborado para os tumores das mulheres, tem sido utilizado nos carcinomas mamários felinos (SEIXAS *et al.*, 2011). Estudos recentes propõe um novo sistema de graduação das neoplasias de mama da gata, estes novos critérios incorporam a detecção de embolia neoplásica e as alterações da morfologia nuclear (MILLS *et al.*, 2015). Deve-se ressaltar que os critérios nucleares adotados neste novo sistema, embora não tão detalhados, já estavam incorporados ao sistema anterior.

Considerando-se as amostras deste estudo, menos de 10% das nossas amostras apresentaram grau I, 42 % delas grau II e 48% de grau III. Esta frequência de graduação está de acordo com os dados da literatura, que apontam 5% para o grau I, 47% para o II e 48% para o grau III (SEIXAS *et al.*, 2011).

Os tumores do tipo túbulopapilífero, foram os únicos que apresentaram graduação I, o que também foi observado por pesquisas anteriores (SEIXAS *et al*, 2011; MILLS *et al*, 2015). O grau II também se concentrou nos tipos tubulopapilíferos, porém a dois carcinomas do tipo sólido e um cribriforme também foi atribuído este grau. A predominância do grau III ocorreu nos grupos dos carcinomas sólidos (86%) e dos cribriformes (75%). O grau das neoplasias

de mama da gata tem sido relacionados com a agressividade do tumor e a sobrevida dos animais (SEIXAS *et al*, 2011; MILLS *et al*, 2015).

Já foi relatado que em gatas acompanhadas por um ano após o tratamento cirúrgico, não houve óbito entre aquelas que apresentaram neoplasias de grau I, enquanto que para as portadoras de tumores de grau II e grau III a taxa de mortalidade em um ano foi de 42,4% e 100%, respectivamente (ZAPPULLI *et al*, 2014). Além disso, o tempo médio livre da doença foi de 4 meses e o de sobrevida foi de 6 meses para gatas com tumores de graduação III, enquanto aquelas com neoplasias de graduação I apresentaram 36 meses de sobrevida com 31 meses livres da doença (SEIXAS *et al.*, 2011).

Não foi possível estabelecer relação entre a presença de embolia neoplásica e a graduação histológica. No entanto, o valor prognóstico deste achado tem sido considerado como fatores prognósticos independentes (CASTAGNARO *et al*, 1998; MILLS *et al.*, 2015).

6.3 Índice mitótico e proliferativo

Nossos resultados demonstram que carcinomas tubulopapilíferos apresentam índice mitótico inferior aos carcinomas sólidos. Este parâmetro também mostrou valores maiores para os tumores de grau II e III, quando comparados com os de grau I. A contagem de figuras de mitose é um tipo de avaliação que já foi incorporado aos sistemas de graduação das neoplasias mamárias, inclusive nas gatas (ELSTON & ELLIS, 1998). O índice mitótico tem sido relacionado ao tempo médio de sobrevida (ZAPPULLI *et al*, 2014) e ao tempo livre da doença (SARLI *et al*, 2003). Deve-se ressaltar, que as figuras de mitoses são contadas no corte histológico empregando-se colorações de rotina, o que torna este tipo de avaliação muito utilizado na rotina de diagnóstico, por ser também pouco dispendioso.

Uma das críticas que se faz a utilização da contagem de figuras de mitose é o de não permitir uma avaliação fidedigna do compartimento proliferativo da neoplasia, já que o período de mitose é muito curto dentro do ciclo celular, sendo a proliferação celular subestimada (GRIFFEY *et al.*, 1999).

Já a proteína Ki-67, apresenta expressão positiva nas células que estão em qualquer fase do ciclo celular (G1; S; G2; e M), não sendo expressa em células quiescentes (fase G0) (DIAS PEREIRA *et al*, 2004).

O índice proliferativo é correlacionado com o grau histopatológico. Assim já é sabido que quanto maior o grau da neoplasia mamária, maior será a quantidade de células marcadas com Ki-67. Em estudo com gatas que tiveram como conduta terapêutica a mastectomia em isolado, o IP foi instituído como indicativo de sobrevida, podendo ser superior ou inferior a uma ano (HUGHES & DOBSON, 2012). Outros autores indicam o índice mitótico e proliferativo como fator prognóstico (CASTAGNARO *et al.*, 1998; PREZIOSI, *et al.*, 2002; SEIXAS, *et al.*, 2011).

Espera-se que a marcação das células neoplásicas seja menor que 50%. Estudos recentes comprovam que a marcação é mais acentuada em tumores malignos quando comparado a benignos. E dentre os malignos, um valor interessante como nota de corte seria menor que 20%, o que já implica pior prognóstico e sobrevida inferior a um ano (MORRIS *et al.*, 2008). Outro estudo com mesmo tempo de acompanhamento, estipula como ponto de corte do índice proliferativo de 25%, sendo que valores abaixo deste foram relacionados com melhor prognóstico (ZAPPULLI *et al*, 2014). Resultados similares foram obtidos por outros autores (29,8%) (RASOTTO *et al*, 2012).

Quanto ao tempo livre sem doença, depois de dois anos de acompanhamento, conclui-se que não houve diferença significativa com base no índice proliferativo (SEIXAS *et al*, 2011). O valor médio estabelecido neste trabalho para os carcinomas mamários nas gatas foi de 35%, superior a todas as literaturas descritas, sendo que a metodologia empregada foi a mesma aplicada pelos autores. Embora os trabalhos relacionem a marcação do Ki 67 com a graduação e não entre os tipos histopatológicos (BARBIERI *et al*, 2012), não obtivemos diferença significativa nem entre os diferentes tipos e nem mesmo entre a graduação. Houve uma discrepância nos dados, uma vez que os índices proliferativos foram maiores no grupo sólido (38,26%), seguido por cribriforme (38,00%), túbulo-papilífero (32,54%). Quanto a graduação, maior percentual ao grau II (38,54%), seguido pelo grau III (36,00%) e grau I (23,33%).

O índice proliferativo, obtido como resultado, em ordem de melhor para pior prognóstico: túbulo-papilífero seguido por cribriforme e sólido praticamente iguais.

Comparando o índice mitótico com o índice proliferativo, nosso critério foi separar em grupos de acordo com escore mitótico, uma vez que não há padronização de nota de corte para o IP. Sendo assim, houve diferença significativa entre o escore 1 e 3 em relação aos seus IPs. Desta forma, quanto maior a proliferação, maior a agressividade tumoral, ou seja, o IP foi maior nos carcinomas mamários com maior graduação. Como o índice mitótico está diretamente relacionada com a graduação. Porém estamos subestimando a proliferação celular do tumor, na medida em que as células que não se encontram na fase M do ciclo celular não são identificadas.

6.4 Índice apoptótico

A morte celular programada, também chamada de apoptose, pode ser detectada nas células neoplásicas pela expressão das caspases, enzimas que participam das vias envolvidas neste mecanismo. Neste trabalho, utilizamos a expressão de Caspase 3 clivada para a identificação do fenômeno.

Nossos resultados mostraram que o maior índice apoptótico foi observado nos carcinomas tubulopapilíferos e o menor nos carcinomas sólidos, ficando os carcinomas cribriformes com o valor intermediário. Embora estes resultados possam sugerir a preservação do mecanismo de apoptose nos tumores mais diferenciados, como mecanismo de evasão tumoral, não houve diferença estatística entre tipos e grau histológicos. A variação no percentual de células apoptóticas marcadas entre os três graus histológicos foi muito discreta.

Desta forma não é possível afirmar que haja relação entre o tipo e o grau histológico das neoplasias e o fenômeno apoptótico. Os dados que constam da literatura quanto a este aspecto são conflitantes. Nas mulheres a supressão da apoptose esta relacionada a iniciação e a progressão das neoplasias de mama, sendo também relacionado aos mecanismos de resistência aos agentes antineoplásicos (O'DONOVAN *et al*, 2003). Já para os tumores mamários das gatas o índice apoptótico parece não desempenhar função importante na progressão tumoral. Ele não se relaciona com a aquisição da capacidade

invasiva ou com o aumento da atividade proliferativa, provavelmente devido a perda precoce dos receptores hormonais durante o desenvolvimento neoplásico (SARLI *et al*, 2003). Em contrapartida, nas neoplasias mamárias da mulher não foi encontrada relação entre o aumento do índice apoptótico e a expressão de receptores hormonais.

Níveis elevados da caspase-3 foram encontrados em neoplasias invasivas e em tecidos hiperplásicos ou normais, sugerindo que a provavelmente o fenômeno apoptótico é alterado não pela proteína caspase-3, mas sim por seus precursores (O'DONOVAN *et al*, 2003). Deve-se acrescentar que embora não tenha sido encontrada diferença significativa entre o índice apoptótico e o índice proliferativo, altas taxas de proliferação e a baixas taxas apoptóticas foram encontradas nos carcinomas mamários felinos de maneira representativa, semelhante ao observado em mulheres (SILVA *et al*, 2016). Uma possível explicação está na relação entre a indiferenciação dos carcinomas mais invasivos da mulher, com a supressão do fenômeno apoptótico associada a manutenção da proliferação, o que pode contribuir para o processo de carcinogênese e para a progressão tumoral (MOMMERS *et al*, 1999).

6.5 Componentes envolvidos na neoplasia mamária

Os tumores benignos de mama, como os adenomas, têm como componente celular original a hiperplasia ductal. Já entre as neoplasias malignas, o carcinoma tubulopapilífero tem origem na hiperplasia lobular; o carcinoma sólido tem início na hiperplasia epitelial; e o carcinoma cribriforme é decorrente de processo proliferativo dos lóbulos, que tendem a crescer não só em tamanho como também em volume (adenosis) (HUGHES & DOBSON, 2012).

Nos tumores de alto grau, a indiferenciação tecidual dificulta o diagnóstico histopatológico. O emprego das técnicas imuno-histoquímicas permitem um diagnóstico mais preciso, minimizando os riscos de erros de classificação (BEHA *et al*, 2014).

No presente trabalho foi utilizada expressão de CK14 para a identificação das células epiteliais basais. Já para identificação das células mioepiteliais foi utilizada a expressão de alfa-actina de músculo liso (alfa-SMA).

A expressão de moléculas que permitam a identificação da origem da neoplasia é fundamental para o estabelecimento dos subtipos neoplásicos. Assim, à semelhança do que já está estabelecido para os tumores da mulher, o perfil imunofenotípico vem sendo explorado com a intenção de aprimorar o conhecimento sobre o prognóstico das neoplasias mamárias nas gatas e cadelas (SORLIE *et al*, 2003). A semelhança entre o carcinoma mamário das gatas e o tipo basal da mulher, fortalece a ideia da utilização da neoplasia das gatas como modelo para o estudo comparativo para os carcinomas mamários das mulheres (BRUNETTI *et al*, 2013; CALIARI *et al*, 2014).

O esperado é que o carcinoma do tipo basal expresse marcação positiva para citoqueratinas como CK14 (PRAT *et al*, 2010). Nas cadelas, assim como nas gatas frequentemente há a expressão de vários marcadores basais concomitantes, sendo que nas felinas o perfil celular é mais indiferenciado (GAMA *et al.*, 2008; BRUNETTI *et al.*, 2013). Nos carcinomas sem origem ductal a CK14 mostrou um aumento difuso de marcação, chegando sua frequência a 91% (CALIARI *et al*, 2014).

Os tipos de carcinomas mamários mais agressivos nas mulheres são um grupo heterogêneo, o qual é subdividido em triplo negativo e em tipo basal. O tipo basal expressa marcação positiva para citoqueratinas como CK5/6, CK17, e/ou CK14; receptor para o fator de crescimento epidermal (EGFR); e alta frequência de mutação em p53 (PRAT *et al*, 2010). Nas gatas, à semelhança da cadela (GAMA *et al.*, 2008), frequentemente há a expressão de vários marcadores basais concomitantes, sendo que nas felinas o perfil é mais indiferenciado (BRUNETTI *et al.*, 2013).

A avaliação da expressão de CK14 no presente estudo considerou como amostras positivas somente aquelas com mais de 1% de células marcadas, conforme protocolos citados pelos trabalhos mais recentes realizados em cadelas e gatas (RASOTTO *et al.*, 2014; MUSCATELLO *et al.*, 2015) e que se baseiam em metodologia estabelecida para as neoplasias mamárias das mulheres.

Em 21 amostras as células neoplásicas mostraram expressão de CK14, sendo predominantes entre estas amostras os carcinomas tubulopapilíferos e os graus I e III. Dessa forma, pode-se afirmar que o fenótipo basal é relativamente frequente nas neoplasias mamárias das gatas. Porém, a expressão de CK14 também está incluída no perfil imunofenotípico das células mioepiteliais (RASOTTO *et al.*, 2014). Deve-se ressaltar que esta expressão foi frequente em todos os tipos histológicos e graus. A relevância da expressão de CK14 ainda é controversa, pois apesar de ser mais frequente em neoplasias bem diferenciadas, é apontada tanto como fator favorável (SEIXAS *et al.*, 2008) quanto desfavorável (CALIARI *et al.*, 2014) em relação ao prognóstico.

Nas cadelas o carcinoma complexo é observado com grande frequência e seu diagnóstico é possível pela avaliação histopatológica de rotina. Este tipo é raro nas gatas, porém alguns carcinomas podem estar sendo classificados erroneamente como tubulopapilíferos e sólidos, pois quando se empregam técnicas imuno-histoquímicas são identificados componentes mioepiteliais que expressam alfa-SMA (SEIXAS *et al.*, 2008).

A expressão positiva de alfa-SMA está relacionada a menor agressividade tumoral e melhor prognóstico (ZAPPULLI, *et al.*, 2013). Em estudo prévio verificou-se que o percentual de carcinomas complexos foi de 7% e que a expressão de alfa-SMA estava relacionada a neoplasias tubulopapilíferas de grau 1 e que afetam fêmeas jovens (SEIXAS *et al.*, 2011). Nossos resultados mostraram que dentre as nossas amostras 9,7% delas eram positivas para alfa-SMA, no entanto esta expressão foi observada tanto em neoplasias túbulopapilíferas de grau I, quanto em carcinomas sólidos de grau III. Desta forma, embora o número de amostras positivas seja reduzido, não pudemos verificar qualquer tipo de associação com o grau da neoplasia.

Neoplasias que expressaram CK14 e alfa-SMA não foram frequentes. Apenas duas entre as 31 amostras, sendo um carcinoma tubulopapilífero e um carcinoma sólido.

6.6 Moléculas de adesão

A expressão aberrante das caderinas é relacionada com tumores de alta graduação (GAMA *et al.*, 2008; FIGUEIRA *et al.*, 2015). Esta aberração é mais

perceptível nas porções periféricas, nos *clusters* invasivos, nas áreas tubulopapilíferas, nas células mais atípicas, e nas células basais mais indiferenciadas dos carcinomas mamários das gatas (FIGUEIRA *et al.*, 2015). Cerca de 60% dos tumores benignos apresentam expressão de caderinas semelhantes, enquanto que os carcinomas apresentam uma sub-expressão, indicando o desenvolvimento do fenótipo maligno através da perda da coesão intercelular possibilitando o desarranjo da arquitetura do parênquima mamário (FIGUEIRA *et al.*, 2015). Outros autores citam que a superexpressão na glândula mamária da mulher promove a motilidade celular, a migração celular bem como a capacidade de invasão através da matrigel (RIBEIRO *et al.*, 2010).

Nas gatas, assim como na mulher, a expressão de P-caderina é esperada no tecido glandular mamário normal, nas células da lâmina basal, no componente mioepitelial e pelas células progenitoras. A interação célula a célula desta proteína funciona como regulador para o crescimento e maturação das células epiteliais luminais. Desta forma sua expressão é fundamental para manter a arquitetura normal da glândula (ZAPPULLI *et al.*, 2012). No tecido normal, a E-caderina é expressada pelas células luminais epiteliais (FIGUEIRA, *et al.*, 2014).

Nas nossas amostras obtivemos baixa positividade para expressão de E-cad, já que em apenas três carcinomas ela foi detectada. Foi possível verificar maior percentual de expressão de E-cad nos tumores de grau I quando comparados aos tumores de grau III. Da mesma forma, os carcinomas tubulopapilíferos também mostraram percentual de expressão de E-cad maior do que os carcinomas sólidos. Apenas uma amostra de carcinoma sólido de grau III foi negativa – menos de 10% de células marcadas – E-cad e P-cad. Estes resultados reforçam a ideia de que a perda da expressão da molécula de adesão está relacionada com o fenótipo mais agressivo e com a progressão tumoral.

Outros autores relatam resultados semelhantes, sem no entanto conseguirem correlacionar a expressão de E-caderina com a graduação histológica (PEÑAFIEL-VERDU *et al.*, 2012).

A expressão de P-cad foi frequente, pois só não foi detectada em uma amostra, e mostrou escores altos. Nas amostras positivas a expressão foi muito semelhante, não havendo diferença nem quanto ao tipo histológico nem

quanto ao grau da neoplasia. A P-cad demonstrou escore três em todos os tipos histopatológicos, porém apresentou score dois nas neoplasias de grau II, sendo as de grau I e III com escore igual a três.

A co-expressão de P-caderina e E-caderina é associada a um pior prognóstico e menor taxa de sobrevida (PAREDES *et al*, 2008). Em mulheres a determinação da expressão de P-caderina por si só não é suficiente para determinar a agressividade tumoral, pois quando expressadas isoladamente P-caderina ou E-caderina, ativam vias alternativas e acabam por atuar como supressores tumorais (SARRIO *et al*, 2009). A maior agressividade das neoplasias mamárias guarda relação com a expressão de ambas as proteínas E-cad e P-cad (VIEIRA & PAREDES, 2015). Assim a correlação esperada é que quanto maior a agressividade, maior é a expressão de P-cad e menor ou até mesmo nula a expressão de E-cad, sendo a expressão anormal de P-caderina um melhor indicador da agressividade tumoral que a baixa expressão de E-caderina (FIGUEIRA *et al*, 2015). Entre as nossas amostras foram positivas para ambas as caderinas três carcinomas tubulopapilíferos, sendo dois de grau II e um de grau I. No entanto, a expressão de E-cad foi menos frequente do que a de P-cad, confirmando a natureza agressiva dos carcinomas mamários das gatas.

A diminuição da expressão da P-caderina na mama normal pode causar a ruptura da lâmina basal mioepitelial, constituindo uma lesão pré-maligna. Em contrapartida a superexpressão é observada nas neoplasias de alta graduação histopatológica. Em tumores do tipo triplo negativo e do tipo basal a superexpressão está relacionada com a supressão apoptótica (VIEIRA & PAREDES, 2015). Quanto à E-caderina, a baixa expressão ou a anormalidade da mesma, está relacionada com maior capacidade de invasão das estruturas adjacentes, favorecendo a disseminação e progressão tumoral. Já a P-caderina quando superexpressada está relacionada com aumento da proliferação celular, mobilidade, invasão e progressão metastática (FIGUEIRA *et al.*, 2014).

7 CONCLUSÃO

Os carcinomas tubulopapilíferos mostraram índice mitótico inferior ao carcinomas sólidos, assim como os carcinomas de grau I em relação aos carcinomas de grau II e III.

O índice proliferativo é uma ferramenta diagnóstica que deve ser mais estudada para gerar uma padronização. O índice mitótico auxilia, porém a proliferação não pode ser analisada só pela contagem de figuras mitóticas.

O imunofenótipo basal - células CK14 positivas - é frequente nos carcinomas mamários das gatas.

O componente mioepitelial – células alfa-SMA positivas ou alfa-SMA/CK14 positivas – não é frequente nos carcinomas mamários das gatas.

Nossos resultados sugerem que a perda da expressão da molécula de adesão E-caderina acontece a medida que a neoplasia se torna mais indiferenciada. Já a P-caderina é expressada em todos os tipos e graus histológicos dos carcinomas mamário da gata.

REFERÊNCIAS*

AMORIM, F. V.; SOUZA, H.; FERREIRA, A.; FONSECA, A. Clinical, cytological and histopathological evaluation of mammary masses in cats from Rio de Janeiro, Brazil. *J. Feline Med. Surg.*, v. 8, p. 379-388, 2006.

BARBIERI, F.; WURTH, R.; RATTO, A.; CAMPANELLA, C.; VITO, G.; THELLUNG, S.; DAGA, A.; CILLI, M.; FERRARI, A.; FLORIO, T. Isolation of stem-like cells from spontaneous feline mammary carcinomas: Phenotypic characterization and tumorigenic potencial. *Exp. Cell Res.*, v. 318, p. 847-860, 2012.

BEHA, G.; MUSCATELLO, L. V.; BRUNETTI, B.; ASPRONI, P.; MILLANTA, F.; POLI, A.; BENAZZI, C.; SARLI, G. Molecular phenotype of primary mammary tumours and distant metastases in female dogs and cats. *J. Comp. Pathol.*, v. 150, n. 2-3, p. 194-197, 2014.

BETZ, D.; SCHOENROCK, D.; MISCHKE, R.; BAUMGÄRTNER, W.; NOLTE, I. Postoperative treatment outcome in canine mammary tumors. Multivariate analysis of the prognostic value of pre- and postoperatively available information. *Tierarztl. Prax. Ausg. K. Kleintiere Heimtiere*, v. 40, n. 4, p. 235-242, 2012.

BHARGAVA, R.; BERIWAL, S.; MCMANUS, K.; DABBS, D. J. CK5 is more sensitive than CK5/6 in identifying the "Basal-like" phenotype of breast carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 130, p. 724-730, 2008.

BOSTOCK, D. E. Canine and feline mammary neoplasms. *J. Vet. Bras.*, v. 142, n. 6, p. 506-515, 1986.

BRUNETTI, B.; ASPRONI, P.; BEHA, G.; MUSCATELLO, L. V.; MILLANTA, F.; POLI, A.; BENAZZI, C.; SARLI, G. Molecular phenotype in mammary tumors of queens: correlation between primary tumour and lymph node metastasis. *J. Comp. Pathol.*, v. 148, p. 206-2013, 2013.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **List of journals indexed in Index Medicus**. Washington, 2008. 337p.

BRUNETTI, B.; SARLI, G.; PREZIOSI, R.; MONARI, I.; BENAZZI, C. E-cadherin and b-catenin reduction influence invasion but not proliferation and survival in canine malignant mammary tumors. *Vet. Pathol.*, v. 42, p. 781-787, 2005.

BURKITT, H. G.; YOUNG, B.; HEATH, J. W. *Wheater histologia funcional*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 362-655.

BURRAI, G.P.; MOHAMMED, S.; MILLER, M.A.; MARRAS, V.; PIRINO, S.; ADDI, M. F.; UZZAU, S.; ANTUOFERMO, E. Spontaneous feline mammary intraepithelial lesions as a model for human estrogen receptor- and progesterone receptor-negative breast lesions. *Rev. BMC Cancer*, v.10, n. 156, p. 1-11, 2010.

CALIARI, D.; ZAPPULLI, V.; RASOTTO, R.; CARDAZZO, B.; FRASSINETI, F.; GOLDSCHMIDT, M. H.; CASTAGNARO, M. Triple-negative vimentin-positive heterogeneous feline mammary carcinomas as a potential comparative model for breast cancer. *BMC Vet. Res.*, v. 10, p. 185, 2014.

CAMPOS, C. B.; DAMASCENO, K. A.; GAMBA, C. O.; RIBEIRO, A. M., MACHADO, A. J.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D. Evaluation of prognostic factors and survival rates in malignant feline mammary gland neoplasms. *J. Feline Med. Surg.*, p. 1-10, 2015.

CAMPOS, C. B.; HORTA, R. S.; COBUCCI, G. C.; BOTELHO, F. P. S.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D. Abordagem cirúrgica das neoplasias mamárias em pequenos animais: perfil do paciente, comportamento e epidemiologia tumoral. *Vet. Zootec.*, v. 18, n. 2, supl. 2, p. 7-12, 2011.

CAMPOS, C.B., NUNES, F.C., LAVALLE, G.E., CASSALI, G.D., Use of surgery and carboplatin in feline malignant mammary gland neoplasms with advanced clinical staging. *In Vivo*, v. 28, n. 5, p. 863-866, 2014.

CASSALI, G. D.; BERTAGNOLLI, A. C.; FERREIRA, E.; DAMASCENO, K. A.; GAMBA, C. O.; CAMPOS, C. B. Canine mammary mixed tumours: a review. *Vet. Med. Int.*, p. 1 - 7, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/274608>.

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; DE NARDI, A. B.; FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A. C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, A. C.; DALECK, C. R.; SALGADO, B. S.; FERNANDES, C. G.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors - Review Article. *Braz. J. Vet. Pathol.*, v. 4, n. 2, p.153-180, 2011.

CASTAGNARO, M. Immunohistochemical expression of E-cadherin and B catenin in feline mammary tumours. *J. Comp. Pathol.*, v. 147, p. 161-170, 2012.

CASTAGNARO, M.; De MARIA, R.; BOZZETTA, E.; RU, G.; CASALONE, C.; BIOLATTI, B.; CARAMELLI, M. Ki-67 index as indicator of the post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Res. Vet. Sci.*, v. 63, n. 3, p. 223-226, 1998.

DE LAS MULAS, J. M.; VAN NIEL, M. ; MILLÁN, Y.; ORDÁS, J.; BLANKENSTEIN, M. A.; VAN MIL, F.; MISDORP, W. Progesterone receptors in normal, dysplastic and tumourous feline mammary glands. Comparison with oestrogen receptors status. *Res. Vet. Sci.*, v. 72, n. 2, p. 153-161, 2002.

De NARDI, A. B.; RODASKY, S.; ROCHA, N. S.; FERNANDES, S. C. Neoplasias Mamárias. In: DALECK, C. R.; De NARDI, A. B.; RODASKY, S. *Oncologia em cães e gatos*. São Paulo: Roca, 2009. p. 372-383.

DIAS PEREIRA, P.; CARVALHEIRA, J.; GARTNER, F. Cell proliferation in feline normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissue – an immunohistochemical study. *J. Vet.*, v. 168, n. 2, p. 180-185, 2004.

DOWSETT, M.; NIELSEN, T.O.; A'HERN, R.; BARTLETT, J.; COOMBES, R.C.; CUZICK, J.; ELLIS, M.; HENRY, N.L.; HUGH J.C; LIVELY, T.; MCSHARE, L.; PAIK, S.; PRUDKIN, L.; REGAN, M.; International Ki-67 in breast cancer working group. Assessment of ki67 in breast cancer: recommendations from the international Ki67 in breast cancer working group. *J. Natl Cancer Inst.*, v. 103, p. 1656 – 1664, 2011.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Assessment of histological grade. *The Breast*, v. 13, p. 356-384, 1998.

FIGUEIRA, A. C.; GOMES, C.; OLIVEIRA, J. T.; VILHENA, H.; CARVALHEIRA, J.; DE MATOS, A.; DIAS-PEREIRA, P.; GARTNER, F. Aberrant P-cadherin expression is associated to aggressive feline mammary carcinomas. *BMC Vet. Res.*, v. 10, p. 270, 2014.

FIGUEIRA, A. C.; GOMES, C.; VILHENA, H.; MIRANDA, S.; CARVALHEIRA, J.; DE MATOS, A.; DIAS-PEREIRA, P.; GARTNER, F. Characterization of α -, β - and p120-Catenin Expression in feline mammary tissues and their relation with E- and P-Cadherin. *Anticancer Res.*, v. 35, p. 3361-3370, 2015.

GAMA, A.; PAREDES, L.; GÄRTNER, F.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Expression of E-cadherin, P-cadherin and β -catenin in canine malignant mammary tumours in relation to clinic pathological parameters, proliferation and survival. *Vet. J.*, v. 177, n. 1, p. 45-53, 2008.

GIMENEZ, F.; HECHTS, S.; CARIG, L. E.; LEGENDRE, A. M. Early detection aggressive therapy. Optimizing the management of feline mammary masses. *J. Feline Med. Surg.*, v. 12, p. 214-224, 2010.

GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. *Vet. Pathol.*, v. 48, n. 1, p. 117-131, 2011.

GRIFFEY, S. M.; KRAEGEL, S. A.; MADEWELL, B. R. proliferation indices in spontaneous canine lung cancer: proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Ki-67 (MIB1) and mitotic counts. *J. Comp. Pathol.*, v. 120, n. 4, p. 321-332, 1999.

HAMPE, J. F.; MISDORP, W. Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bull World Health Organ.*, v. 50, n. 1-2, p. 111-133, 1974.

HAYES, A. A.; MOONEY, S. Feline mammary tumors. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v. 15, n. 3, p. 513-520, 1985.

HAYES JUNIOR, H. M.; MILNE, K. L.; MANDELL, C. P. Epidemiological features of feline mammary carcinoma. *Vet. Rec.*, v. 108, n. 22, p. 476-479, 1981.

HUGHES, K.; DOBSON, J. M. Prognostic histopathological and molecular markers in feline mammary neoplasia. *Vet. J.*, v. 194, n. 1, p. 19-26, 2012.

ITO, T.; KADOSAWA, T.; MOCHIZUKI, M.; MATSUNAGA, S.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N. Prognosis of malignant mammary tumor in 53 cats. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 58, n. 8, p. 723-726, 1996.

JACOBS, T. M.; HOPPE, B. R.; POEHLMANN, C. E.; FERRACONE, J. D.; SORENMO, K. U. Mammary adenocarcinomas in three male cats exposed to medroxyprogesterone acetate (1990-2006). *J. Feline Med. Surg.*, v. 12, n. 2, p. 169-174, 2010.

JOHNSTON, S. D.; HAYDEN, D. W.; KIANG, D. T.; HANDSCHIN, B.; JOHNSON, K. H. Progesterone receptors in feline mammary adenocarcinomas. *Am. J. Vet. Res.*, v. 45, n. 2, p. 379-382, 1984.

KUMARAGURUPARAN, R.; KARUNAGARAN, D.; BALACHANDRAN, C.; MANOHAR, B. M.; NAGINI, S. Of humans and canines: A comparative evaluation of heat shock and apoptosis-associated proteins in mammary tumors. *Clin. Chim. Acta*, v. 365, p. 168-176, 2006.

KUSTRITZ, M. V. R. Determining the optimal age for gonadectomy of dogs and cats. *JAVMA*, v. 231, n. 11, p.1665-1675, 2007.

LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHOROW, S. J. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. *Withrow e MacEwen's small animal clinical oncology*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2007. p. 619-636.

LEONARDI, E.; GIRLANDO, S.; SERIO, G.; PERRONE, G.; SCAMPINI, S.; DALLAPALMA, P.; BARBARESCHI, M. PCNA and Ki-67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables. *J. Clin. Pathol.*, v.45, p.416–419, 1992.

MacEWEN, E. G.; WITHROW, J. S. Tumors of the mammary gland. In: _____. *Small animal clinical oncology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2013. p. 356-372.

MATOS, A. J. F.; BAPTISTA, C. S.; GÄRTNER, M. F.; RUTTERMAN, G. R. prognostic studies of canine and feline mammary tumors: The need for standardized procedures. *Vet. J.*, v. 193, p. 24-31, 2012.

MILLANTA, F.; CALANDRELLA, M.; VANNOZZI, I.; POLI, A. Steroid hormone receptors in normal, dysplastic and neoplastic feline mammary tissues and their prognostic significance. *Vet. Rec.*, v. 158, p. 821-824, 2006.

MILLS, S. W.; MUSIL, K. M.; DAVIES, J. L.; HENDRICK, S.; DUNCAN, C.; JACKSON, M. L.; KIDNEY, B.; PHILIBERT, H.; WOBESER, B. K.; SIMKO, E. Prognostic value of histologic grading for feline mammary carcinoma: a retrospective survival analysis. *Vet. Pathol.*, v. 52, p. 238-249, 2015.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D. J. *Tumors in domestic animals*. 4. ed. Ames: Iowa State Press, 2008. p. 575–606.

MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, T. P. *Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat*. 2. ed. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1999. 59 p.

MISDORP, W.; ROMIJN A.; HART, A. A. Feline mammary tumors: a case-control Study of hormonal factors. *Anticancer Res.*, v.11, n. 5, p.1793-1797, 1991.

MISDORP, W.; ROMIJN, A.; HART, A. A. The significance of ovariectomy and Progestogens in the development of mammary carcinoma in cats. *Tijdschr. Diergeneeskd.*, v. 117, n. 1, p. 2-4, 1992.

MOMMERS, E.C.; VAN DIEST, P.J.; LEONHART, A.M.; MEIJER, C.J.; BAAK, J.P. Balance of cell proliferation and apoptosis in breast carcinogenesis. *Breast. Cancer. Res. Treat.*, v.58, p. 163-169, 1999.

MORRIS, J. Mammary tumours in the cat size matters, so early intervention saves lives. *J. Feline Med. Surg.*, v.15, p. 391-400, 2013.

MORRIS, J. S.; NIXON, C.; BRUCK, A.; NASIR, L.; MORGAN, I. M.; PHILBEY, A. W. Immunohistochemical expression of top BP1 in feline mammary neoplasia in relation to histological grade, Ki67, ER α and p53. *Vet. J.*, v. 175, p. 218-226, 2008.

MOULTON, J. E. Tumors of the mammary gland. In: _____. *Tumors in domestic animals*. 3. ed. Los Angeles: University of California Press, 1990. cap. 12, p. 518-552.

MUSCATELLO, L. V.; SARLI, G.; BEHA, G.; ASPRONI, P.; MILLANTA, F.; POLI, A.; DE TOLLA, L. J.; BENAZZI, C.; BRUNETTI, B. Validation of tissue microarray for molecular profiling of canine and feline mammary tumors. *J. Comp. Pathol.*, p.1-8, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.12.014>. Acesso em: 10 out. 2015.

NGUYEN, F.; IBISCH, C.; LOUSSOUARN, D.; BERTRAND, L.; POHU, M.; ALBARIC, O.; CAMPONE, M.; ABADIE, J. Immunophenotypic Classification of feline Mammary Carcinomas. *J. Comp. Pathol.*, v. 146, p. 79-79, 2012.

NOVOSAD, C. A. Principles of treatment for mammary gland tumors. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.*, v.18, n. 2, p. 107-109, 2003.

NOWAK, M.; MADEJ, J. A.; PODHORSKA-OKOLOW, M.; DZIEGIEL, P. Expression of extracellular matrix metalloproteinase (MMP-9), E-cadherin and proliferation-Associated antigen Ki-67 and their reciprocal correlation in canine mammary adenocarcinomas. *In vivo*, v. 22, p. 463-470, 2008.

O'DONOVAN, N.; CROWN, J.; STUNELL, H.; HILL, A.D.; MCDERMOTT, E.; O'HIGGINS, N.; DUFFY, M. J. Caspase 3 in breast cancer. *Clin. Cancer. Res.*, v. 9, p. 738 – 742, 2003.

OVERLEY, B.; SHOFER, F. S.; GOLDSCHMIDT, M. H.; SHERER, D.; SORENMO, K. U. Association between ovarihysterectomy and feline mammary carcinoma. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 19, n. 4. p. 560-563, 2005.

PAREDES, J.; CORREIA, A. L.; RIBEIRO, A. S.; MILANEZI, F.; CAMESELLE-TEIJEIRO, J.; SCHMITT, F. C. Breast carcinomas that co-express E- and P-cadherin are associated with p120-catenin cytoplasmic localization and poor patient survival. *J. Clin. Pathol.*, v. 61, n. 7, p. 856-862, 2008.

PEÑA, L.; GAMA, A.; GOLDSCHMIDT, M.H.; ABADIE, J.; BENAZZI, C.; CASTAGNARO, M. Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Vet. Pathol.*, v. 51, n. 1, p. 127-145, 2014.

PEÑAFIEL-VERDU, C.; BUENDIA, A. J.; NAVARRO, J. A.; RAMIREZ, G. A.; VILAFRANCA, M.; ALTIMIRA, J.; SANCHEZ, J. Reduced Expression of E-cadherin and β -catenin and High Expression of Basal Cytokeratins in Feline Mammary Carcinomas With Regional Metastasis. *Vet. Pathol.*, v. 49, n. 6, p. 979-987, 2012.

PRAT, A.; PARKER, J. S.; KARGINOVA, O.; FAN, C.; LIVASY, C.; HERSCHKOWITZ, J. I.; HE, X.; PEROU, C. M. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.*, v. 12, n. 5, p. 68, 2010.

PREZIOSI, R.; SARLI, G.; BENAZZI, C. Multiparametric survival analysis of histological satge and proliferative activity in feline mammary carcinomas. *Res. Vet. Sci.*, v. 73, p. 53-60, 2002.

RAMOS-VARA, J. A. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet. Pathol.*, v. 42, n. 4, p. 405-426, 2005.

RAMOS-VARA, J. A.; KIUPEL, M.; BASZLER, T.; BLIVEN, L.; BRODERSEN, B.; CHELACK, B.; CZUB, S.; DEL PIERO, F.; DIAL, S.; EHRHART, E. J.; GRAHAM, T.; MANNING, L.; PAULSEN, D.; VALLI, V. E.; WEST, K. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 20, n. 4, p. 393-413, 2008.

RASOTTO, R.; CALIARI, D.; CASTAGNARO, M.; ZANETTI, R.; ZAPPULLI, V. An immunohistochemical study of HER-2 expression in feline mammary tumours. *J. Comp. Pathol.*, v. 144, n. 2-3, p. 170-179, 2011.

RASOTTO, R.; GOLDSCHIMIDT, M. H.; CASTAGNARO, M.; CARNIER, P.; CALIARI, D.; ZAPPULI, V. The dog as a natural animal model for study of the mammary myoepithelial basal cell lineage and its role in mammary carcinogenesis. *J. Comp. Pathol.*, v.151, p. 166-180, 2014.

RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V.; CASTAGNARO, M. A retrospective study of those histopathologic parameters predictive of invasion of the lymphatic system by canine mammary carcinomas. *Vet. Pathol.*, v. 49, p. 330-340, 2012.

RIBEIRO, A. S.; ALBERGARIA, A.; SOUSA, B.; CORREIA, A. L.; BRACKE, M.; SERUCA, R. Extracellular cleavage and shedding of P-cadherin: a mechanism underlying the invasive behaviour of breast cancer cells. *Oncogene*, v. 29, n. 3, p. 392-402, 2010.

ROMAGNOLI, S. Progestins to control feline reproduction Historical abuse of high doses and potentially safe use of low doses. *J. Feline Med. Surg.*, v. 17, p. 743-752, 2015.

SARLI, G.; PREZIOSI, R.; BENAZZI, C. Rate of apoptosis in feline mammary tumors is not predictive of postsurgical survival. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 15, p. 115-122, 2003.

RUTTEMAN G.R.; WITHROW S.J.; MACEWEN, E.G. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW S.J.; MACEWEN, E.G. *Small animal clinical oncology*. 5. ed. New York: WB Saunders, 2013. p. 547-556.

SÁ, F. N. *Citologia e histopatologia: canídeos e felídeos*. 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2008.

SARRIO, D.; PALACIOS, J.; HERGUETA-REDONDO, M.; GOMEZ-LOPEZ, G.; CANO, A.; MORENO-BUENO, G. Functional characterization of E- and P-cadherin in invasive breast cancer cells. *BMC Cancer*, v. 9, n. 74, p. 1-12, 2009.

SEIXAS, F.; PALMEIRA, C.; PIRES, M. A.; BENTO, M. J.; LOPES, C. Grade is na independente prognostic fator for feline mammary carcinomas: A clinico pathological and survival analysis. *Vet. J.*, v. 187, p. 65-71, 2011.

SEIXAS, F.; PIRES, M. A.; LOPES, C. A. Complex carcinomas of the mammary gland in cat: Pathological and immunohistochemical features. *Vet. J.*, v. 176, p. 210-215, 2008.

SHAFIEE, R.; JAVANBAKHT, J.; ATYABI, N.; BAHRAMI, A.; KHERADMAND, D.; SAFAEI, R.; KHADIVAR, F.; HOSSEINI, E. Comparative value of clinical, cytological, and histopathological features in feline mammary gland tumors; an experimental model for the study of human breast cancer. *Diag. Pathol.*, v. 8, n. 136, p. 1-8, 2013.

SHALINI, S.; DORSTYN, L.; DAWAR, S.; DAWAR, S.; KUMAR, S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.*, v. 22, p. 526-539, 2015.

SILVA, M. N.; LEITE, J. S.; MELLO, M. F.V.; SILVA, K. V. G. C.; CORGOZINHO, K. B.; SOUZA, H. J. M.; CUNHA, S. C. S.; FERREIRA, A. M. R. Histologic evaluation of Ki-67 and cleaved caspase-3 expression in feline mammary carcinoma. *J. Feline Med. Surg.*, v.10, p. 1-6, 2016.

SOARES, M.; RIBEIRO, R.; CARVALHO, S.; PELETEIRO, M.; CORREIA, J.; FERREIRA, F. Ki-67 as a prognostic fator in feline mammary carcinoma: what is the optimal cutoff value?. *Vet. Pathol.*, v. 53, n. 1, p. 37-43, 2015.

SORENMO, K. U. Canine mammary gland tumors. *Vet. Clin. Small Anim.*, v. 33, p. 573-596, 2003.

SORENMO, K. U.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M. H. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet. Pathol.*, v. 48, n. 1, p. 85-97, 2011.

SORENMO, K. U.; WORLEY, D. R.; GOLDSCHMIDT, M. H. Tumor of mammary gland. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. *Withrow e MacEwen's small animal clinical oncology*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2013. p. 547-556.

SORLIE, T.; TIBSHIRANI, R.; PARKER, J.; HASTIE, T.; MARRON, J. S. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 100, p. 8418-8423, 2003.

TAKAUJI, S. R.; WATANABE, M.; UYAMA, R. Expression and subcellular localization of E-cadherin, alpha-catenin, and beta-catenin in 8 feline mammary tumor cell lines. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 69, p. 831-834, 2007.

TAMADA, H.; KAWATE, N.; INABA, T.; SAWADA, T. Long-term prevention of estrus in the bitch and queen using chlormadinone acetate. *Can. Vet. J.*, v. 44, p. 416-417, 2003.

TOGNI, M.; MASUDA, E. K.; KOMMERS, G. D.; FIGHERA, R. A. Estudo retrospectivo de 207 casos de tumores mamários em gatas. *Rev. Pesqui. Vet. Bras.*, v. 33, n. 3, p. 353-358, 2013.

TOMLINSON, M. J.; BARTEAUX, L.; FERNS, L. E.; ANGELOPOULOS, E. Feline mammary carcinoma: a retrospective evaluation of 17 cases. *Can. Vet. J.*, v. 25, n. 12, p. 435-439, 1984.

VIEIRA, A. F.; PAREDES, J. P-cadherin and the journey to cancer metastasis. *Mol. Cancer*, v. 14, n. 178, p. 1-12, 2015.

VINOTHINI, G.; BALACHANDRAN, C.; NAGINI, S. Evaluation of molecular markers in canine mammary tumors: correlation with histological grading. *Oncol. Res.*, v.18, n. 5-6, p. 193-201, 2009.

WALDRON, D. R. Diagnosis and surgical management of mammary neoplasia in dogs and cats. *Vet. Med.*, v. 96, n. 12, p. 943-948, 2001.

WEBSTER, J. D.; MILLER, M. A.; DUSOLD, D.; RAMOS-VARA, J. A. Effects of prolonged formalin fixation on diagnostic immunohistochemistry in domestic animals. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 57, n. 8, p. 753-761, 2009.

WEIJER, K.; HART, A. A. Prognostic factors in feline mammary carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 70, p. 709-716, 1983.

YAMAGAMI, T.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, K.; SUGIYAMA, M. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 58, n. 11, p. 1079-1083, 1996.

YOSHIMURA, H.; MICHISHITA, M.; OHKUSU-TSUKADA, K.; TAKAHASHI, K. Appearance and distribution of stromal myofibroblasts and tenascin-C in feline mammary tumors. *Histol. Histopathol.*, v. 26, p. 297-305, 2011.

ZAPPULLI, V.; CALIARI, D.; RASOTTO, R.; FERRO, S.; CASTAGNARO, M.; GOLDSCHMIDT, M. Proposed classification of the feline "complex" mammary tumors as ductal and intraductal papillary mammary tumors. *Vet. Pathol.*, v. 50, n. 6, p. 1070-1077, 2013.

ZAPPULLI, V.; DE CECCO, S.; TREZ, D.; CALIARI, D.; ARESU, L.; ZUCCARI, D. A. P. C.; BERTON, C. R.; TERZIAN, A. C. B.; RUIZ, C. M. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias –importância dos marcadores imuno-histoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo. *Arq. Ciênc. Saúde*, v. 15, n. 4, p.189-198, 2008.

ZAPPULLI, V.; DE ZAN, G.; CARDAZZO, B.; BARGELLONI, L.; CASTAGNARO, M. Feline mammary tumours in comparative oncology. *J. Dairy Res.*, v. 72, n. esp., p. 98-106, 2005.

ZAPPULLI, V.; RASOTTO, R.; CALIARI, D.; MAINENTI, M.; PENÃ, L.; GOLDSCHMIDT, M. H. Prognostic evaluation of feline mammary carcinomas: a review of the literature. *Vet. Pathol.*, v. 52, n. 1, p. 46-60, 2014.

ANEXOS

ANEXO 1

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"	 fmvz - unesp Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Campus de Botucatu
---	---	---

A T E S T A D O

Atesto para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa
**"Caracterização histopatológica e marcadores imuno-
histoquímicos no câncer de mama de gatas"**, Protocolo nº
46/2014-CEUA, do Professor Alexandre Hataka, desta Faculdade,
foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta
Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 11 de abril de
2014.


Profª. Ass. Drª. Maria Lúcia Gomes Lourenço
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

APÊNDICES

Apêndice 1 – Levantamento epidemiológico

Número	Idade (anos)	Raça	Tipo histológico
1	5	SRD	Tubular
2	13	SRD	Tubular
3	10	SRD	Tubular
4	9	SRD	Tubular
5	14	siamês	Tubular
6	10	SRD	Tubular
7	13	SRD	Papilífero
8	14	persa	Papilífero
9	10	siamês	Papilífero
10	10	SRD	Papilífero
11	15	SRD	Papilífero
12	18	SRD	Papilífero
13	6	siamês	Papilífero
14	11	SRD	Sólido
15	10	SRD	Sólido
16	14	persa	Sólido
17	14	SRD	Sólido
18	11	siamês	Sólido
19	13	SRD	Sólido
20	9	SRD	Sólido
21	20	SRD	Sólido
22	13	SRD	sólido
23	9	SRD	sólido
24	14	siamês	sólido
25	14	siamês	sólido
26	9	SRD	sólido
27	16	persa	sólido
28	14	SRD	cribriforme
29	14	SRD	cribriforme
30	11	SRD	cribriforme
31	14	siamês	cribriforme

Apêndice 2. Tipos histológicos, graduação histológica, invasão vascular e I.M.

Número	Tipo histológico	Grau	Invasão Vascular	Índice Mitótico
1	Túbulo-papilífero	II	Não	3
2	Túbulo-papilífero	II	Sim	2
3	Túbulo-papilífero	II	Não	3
4	Túbulo-papilífero	II	Sim	2
5	Túbulo-papilífero	II	Não	1
6	Túbulo-papilífero	II	Sim	2
7	Túbulo-papilífero	I	Não	1
8	Túbulo-papilífero	I	Não	1
9	Túbulo-papilífero	II	Não	2
10	Túbulo-papilífero	II	Sim	2
11	Túbulo-papilífero	II	Não	3
12	Túbulo-papilífero	II	Sim	3
13	Túbulo-papilífero	I	Não	
14	Sólido	II	Sim	2
15	Sólido	III	Não	3
16	Sólido	III	Sim	3
17	Sólido	III	Sim	3
18	Sólido	III	Não	3
19	Sólido	III	Não	3
20	Sólido	III	Não	3
21	Sólido	III	Não	3
22	Sólido	II	Sim	2
23	Sólido	III	Não	2
24	Sólido	III	Não	3
25	Sólido	III	Sim	3
26	Sólido	III	Não	3
27	Sólido	III	Não	3
28	Cribriforme	II	Não	3
29	Cribriforme	III	Sim	3
30	Cribriforme	III	Não	3
31	Cribriforme	III	Não	3

Apêndice 3. Quantidade de figuras mitóticas em cada campo.

Número	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	V.A.
1	8	1	2	4	8	3	0	0	2	0	29
2	3	2	1	1	1	5	3	3	3	4	28
3	2	1	3	4	1	2	3	2	1	0	22
4	1	0	2	1	2	5	1	1	2	1	20
5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	8
6	6	1	5	0	3	4	0	4	3	6	38
7	0	2	1	0	0	0	0	1	0	0	11
8	2	0	0	0	1	1	3	0	0	1	16
9	1	0	0	4	2	1	2	2	2	3	26
10	2	1	1	3	1	3	1	0	1	1	24
11	7	2	1	8	5	6	2	5	5	4	56
12	3	4	6	4	4	4	1	4	3	5	50
13	0	0	2	0	1	1	0	1	2	1	21
14	0	1	0	5	2	6	5	2	2	3	40
15	3	3	1	3	4	1	4	5	3	4	46
16	6	8	6	7	6	4	4	2	4	5	68
17	7	4	2	2	3	4	3	0	2	2	46
18	1	2	6	3	2	1	4	8	1	1	47
19	4	2	2	4	6	1	5	4	4	4	55
20	4	6	1	6	7	10	9	7	3	6	79
21	8	3	6	5	9	7	4	4	2	1	70
22	4	0	1	3	0	5	5	1	1	2	44
23	1	2	1	2	2	10	2	5	3	4	55
24	7	10	6	5	9	11	9	13	10	9	113
25	6	6	6	6	3	3	3	3	3	1	65
26	2	4	3	2	2	4	2	9	5	2	61
27	1	4	3	3	2	3	2	1	3	2	51
28	14	15	8	4	2	1	2	3	10	4	91
29	1	2	4	9	13	9	12	8	12	7	106
30	2	3	4	6	4	5	2	3	5	3	67
31	3	5	2	4	4	2	0	1	4	0	56

Apêndice 4. Valor absoluto para obtenção do índice proliferativo.

N	Campo	Marcada	Não marcada	Total	%
1	1	28	72	100	28%
1	2	29	71	100	29%
1	3	31	69	100	31%
1	4	31	69	100	31%
1	5	40	60	100	40%
1	6	37	63	100	37%
1	7	28	72	100	28%
1	8	34	66	100	34%
1	9	26	74	100	26%
1	10	40	60	100	40%
2	1	80	20	100	80%
2	2	74	26	100	74%
2	3	84	16	100	84%
2	4	59	41	100	59%
2	5	83	17	100	83%
2	6	71	29	100	71%
2	7	58	42	100	58%
2	8	40	60	100	40%
2	9	45	55	100	45%
2	10	69	31	100	69%
3	1	34	66	100	34%
3	2	28	72	100	28%
3	3	38	62	100	38%
3	4	26	74	100	26%
3	5	40	60	100	40%
3	6	27	73	100	27%
3	7	28	72	100	28%
3	8	34	66	100	34%
3	9	35	65	100	35%
3	10	31	69	100	31%
4	1	37	63	100	37%
4	2	28	72	100	28%
4	3	27	73	100	27%
4	4	29	71	100	29%
4	5	24	76	100	24%
4	6	32	68	100	32%
4	7	41	59	100	41%
4	8	37	63	100	37%
4	9	31	69	100	31%
4	10	35	65	100	35%
5	1	35	65	100	35%

5	2	28	72	100	28%
5	3	17	83	100	17%
5	4	33	67	100	33%
5	5	21	79	100	21%
5	6	20	80	100	20%
5	7	19	81	100	19%
5	8	17	83	100	17%
5	9	18	82	100	18%
5	10	24	76	100	24%
6	1	38	62	100	38%
6	2	32	68	100	32%
6	3	32	68	100	32%
6	4	38	62	100	38%
6	5	35	65	100	35%
6	6	41	59	100	41%
6	7	44	56	100	44%
6	8	45	55	100	45%
6	9	28	72	100	28%
6	10	26	74	100	26%
7	1	27	73	100	27%
7	2	13	87	100	13%
7	3	16	84	100	16%
7	4	17	83	100	17%
7	5	24	76	100	24%
7	6	20	80	100	20%
7	7	21	79	100	21%
7	8	17	83	100	17%
7	9	20	80	100	20%
7	10	30	70	100	30%
8	1	41	59	100	41%
8	2	30	70	100	30%
8	3	36	64	100	36%
8	4	37	63	100	37%
8	5	30	70	100	30%
8	6	23	77	100	23%
8	7	29	71	100	29%
8	8	16	84	100	16%
8	9	25	75	100	25%
8	10	31	69	100	31%
9	1	34	66	100	34%
9	2	47	53	100	47%
9	3	51	49	100	51%
9	4	59	41	100	59%
9	5	53	47	100	53%

9	6	50	50	100	50%
9	7	45	55	100	45%
9	8	51	49	100	51%
9	9	62	38	100	62%
9	10	50	50	100	50%
10	1	19	81	100	19%
10	2	17	83	100	17%
10	3	23	77	100	23%
10	4	22	78	100	22%
10	5	17	83	100	17%
10	6	15	85	100	15%
10	7	21	79	100	21%
10	8	10	90	100	10%
10	9	23	77	100	23%
10	10	28	72	100	28%
11	1	24	76	100	24%
11	2	19	81	100	19%
11	3	15	85	100	15%
11	4	37	63	100	37%
11	5	33	67	100	33%
11	6	13	87	100	13%
11	7	29	71	100	29%
11	8	29	71	100	29%
11	9	27	73	100	27%
11	10	28	72	100	28%
12	1	40	60	100	40%
12	2	39	61	100	39%
12	3	40	60	100	40%
12	4	34	66	100	34%
12	5	51	49	100	51%
12	6	40	60	100	40%
12	7	33	67	100	33%
12	8	33	67	100	33%
12	9	23	77	100	23%
12	10	33	67	100	33%
13	1	17	83	100	17%
13	2	23	77	100	23%
13	3	22	78	100	22%
13	4	20	80	100	20%
13	5	19	81	100	19%
13	6	11	89	100	11%
13	7	14	86	100	14%
13	8	19	81	100	19%
13	9	16	84	100	16%

13	10	28	72	100	28%
14	1	29	71	100	29%
14	2	75	25	100	75%
14	3	54	46	100	54%
14	4	50	50	100	50%
14	5	24	76	100	24%
14	6	61	39	100	61%
14	7	63	37	100	63%
14	8	33	67	100	33%
14	9	43	57	100	43%
14	10	68	32	100	68%
15	1	31	69	100	31%
15	2	42	58	100	42%
15	3	43	57	100	43%
15	4	39	61	100	39%
15	5	65	35	100	65%
15	6	55	45	100	55%
15	7	37	63	100	37%
15	8	42	58	100	42%
15	9	42	58	100	42%
15	10	37	63	100	37%
16	1	22	78	100	22%
16	2	32	68	100	32%
16	3	39	61	100	39%
16	4	40	60	100	40%
16	5	44	56	100	44%
16	6	18	82	100	18%
16	7	34	66	100	34%
16	8	30	70	100	30%
16	9	37	63	100	37%
16	10	59	41	100	59%
17	1	48	52	100	48%
17	2	44	56	100	44%
17	3	40	60	100	40%
17	4	42	58	100	42%
17	5	37	63	100	37%
17	6	39	61	100	39%
17	7	58	42	100	58%
17	8	42	58	100	42%
17	9	34	66	100	34%
17	10	31	69	100	31%
18	1	49	51	100	49%
18	2	49	51	100	49%
18	3	40	60	100	40%

18	4	58	42	100	58%
18	5	18	82	100	18%
18	6	14	86	100	14%
18	7	21	79	100	21%
18	8	32	68	100	32%
18	9	53	47	100	53%
18	10	12	88	100	12%
19	1	50	50	100	50%
19	2	26	74	100	26%
19	3	33	67	100	33%
19	4	34	66	100	34%
19	5	35	65	100	35%
19	6	41	59	100	41%
19	7	18	82	100	18%
19	8	42	58	100	42%
19	9	22	78	100	22%
19	10	29	71	100	29%
20	1	59	41	100	59%
20	2	55	45	100	55%
20	3	55	45	100	55%
20	4	61	39	100	61%
20	5	43	57	100	43%
20	6	48	52	100	48%
20	7	49	51	100	49%
20	8	46	54	100	46%
20	9	56	44	100	56%
20	10	58	42	100	58%
21	1	39	61	100	39%
21	2	44	56	100	44%
21	3	46	54	100	46%
21	4	35	65	100	35%
21	5	46	54	100	46%
21	6	44	56	100	44%
21	7	35	65	100	35%
21	8	44	56	100	44%
21	9	36	64	100	36%
21	10	29	71	100	29%
22	1	45	55	100	45%
22	2	25	75	100	25%
22	3	33	67	100	33%
22	4	33	67	100	33%
22	5	37	63	100	37%
22	6	37	63	100	37%
22	7	42	58	100	42%

22	8	35	65	100	35%
22	9	32	68	100	32%
22	10	39	61	100	39%
23	1	27	73	100	27%
23	2	37	63	100	37%
23	3	41	59	100	41%
23	4	36	64	100	36%
23	5	43	57	100	43%
23	6	32	68	100	32%
23	7	32	68	100	32%
23	8	30	70	100	30%
23	9	35	65	100	35%
23	10	36	64	100	36%
24	1	66	34	100	66%
24	2	75	25	100	75%
24	3	61	39	100	61%
24	4	62	38	100	62%
24	5	47	53	100	47%
24	6	43	57	100	43%
24	7	48	52	100	48%
24	8	77	23	100	77%
24	9	47	53	100	47%
24	10	52	48	100	52%
25	1	25	75	100	25%
25	2	13	87	100	13%
25	3	13	87	100	13%
25	4	25	75	100	25%
25	5	16	84	100	16%
25	6	31	69	100	31%
25	7	19	81	100	19%
25	8	24	76	100	24%
25	9	28	72	100	28%
25	10	20	80	100	20%
26	1	18	82	100	18%
26	2	35	65	100	35%
26	3	35	65	100	35%
26	4	19	81	100	19%
26	5	58	42	100	58%
26	6	41	59	100	41%
26	7	36	64	100	36%
26	8	31	69	100	31%
26	9	17	83	100	17%
26	10	23	77	100	23%
27	1	18	82	100	18%

27	2	23	77	100	23%
27	3	17	83	100	17%
27	4	22	78	100	22%
27	5	22	78	100	22%
27	6	22	78	100	22%
27	7	31	69	100	31%
27	8	23	77	100	23%
27	9	25	75	100	25%
27	10	27	73	100	27%
28	1	75	25	100	75%
28	2	78	22	100	78%
28	3	68	32	100	68%
28	4	59	41	100	59%
28	5	58	42	100	58%
28	6	76	24	100	76%
28	7	53	47	100	53%
28	8	65	35	100	65%
28	9	60	40	100	60%
28	10	78	22	100	78%
29	1	9	91	100	9%
29	2	9	91	100	9%
29	3	7	93	100	7%
29	4	13	87	100	13%
29	5	9	91	100	9%
29	6	10	90	100	10%
29	7	13	87	100	13%
29	8	12	88	100	12%
29	9	14	86	100	14%
29	10	7	93	100	7%
30	1	29	71	100	29%
30	2	41	59	100	41%
30	3	44	56	100	44%
30	4	41	59	100	41%
30	5	45	55	100	45%
30	6	37	63	100	37%
30	7	35	65	100	35%
30	8	34	66	100	34%
30	9	46	54	100	46%
30	10	44	56	100	44%
31	1	36	64	100	36%
31	2	47	53	100	47%
31	3	42	58	100	42%
31	4	27	73	100	27%
31	5	40	60	100	40%

31	6	29	71	100	29%
31	7	24	76	100	24%
31	8	31	69	100	31%
31	9	34	66	100	34%
31	10	42	58	100	42%

Apêndice 5. Valor absoluto para obtenção do índice de apoptose.

N	Campo	Marcada	Não marcada	Total	%
1	1	28	72	100	28%
1	2	54	46	100	54%
1	3	28	72	100	28%
1	4	34	66	100	34%
1	5	22	78	100	22%
1	6	25	75	100	25%
1	7	25	75	100	25%
1	8	3	97	100	3%
1	9	33	67	100	33%
1	10	16	84	100	16%
2	1	17	83	100	17%
2	2	8	92	100	8%
2	3	9	91	100	9%
2	4	22	78	100	22%
2	5	10	90	100	10%
2	6	15	85	100	15%
2	7	21	79	100	21%
2	8	23	77	100	23%
2	9	18	82	100	18%
2	10	13	87	100	13%
3	1	5	95	100	5%
3	2	5	95	100	5%
3	3	2	98	100	2%
3	4	1	99	100	1%
3	5	4	96	100	4%
3	6	2	98	100	2%
3	7	2	98	100	2%
3	8	3	97	100	3%
3	9	3	97	100	3%
3	10	5	95	100	5%
4	1	14	86	100	14%
4	2	18	82	100	18%
4	3	11	89	100	11%
4	4	4	96	100	4%
4	5	6	94	100	6%
4	6	12	88	100	12%
4	7	20	80	100	20%
4	8	7	93	100	7%
4	9	12	88	100	12%
4	10	14	86	100	14%
5	1	10	90	100	10%

5	2	10	90	100	10%
5	3	15	85	100	15%
5	4	7	93	100	7%
5	5	10	90	100	10%
5	6	24	76	100	24%
5	7	16	84	100	16%
5	8	23	77	100	23%
5	9	30	70	100	30%
5	10	23	77	100	23%
6	1	9	91	100	9%
6	2	8	92	100	8%
6	3	6	94	100	6%
6	4	15	85	100	15%
6	5	7	93	100	7%
6	6	11	89	100	11%
6	7	6	94	100	6%
6	8	10	90	100	10%
6	9	8	92	100	8%
6	10	5	95	100	5%
7	1	15	85	100	15%
7	2	8	92	100	8%
7	3	9	91	100	9%
7	4	11	89	100	11%
7	5	9	91	100	9%
7	6	8	92	100	8%
7	7	3	97	100	3%
7	8	10	90	100	10%
7	9	4	96	100	4%
7	10	4	96	100	4%
8	1	12	88	100	12%
8	2	28	72	100	28%
8	3	18	82	100	18%
8	4	13	87	100	13%
8	5	13	87	100	13%
8	6	15	85	100	15%
8	7	25	75	100	25%
8	8	17	83	100	17%
8	9	17	83	100	17%
8	10	7	93	100	7%
9	1	11	89	100	11%
9	2	10	90	100	10%
9	3	16	84	100	16%
9	4	19	81	100	19%
9	5	15	85	100	15%

9	6	24	76	100	24%
9	7	6	94	100	6%
9	8	13	87	100	13%
9	9	18	82	100	18%
9	10	23	77	100	23%
10	1	9	91	100	9%
10	2	7	93	100	7%
10	3	11	89	100	11%
10	4	13	87	100	13%
10	5	6	94	100	6%
10	6	4	96	100	4%
10	7	11	89	100	11%
10	8	13	87	100	13%
10	9	36	64	100	36%
10	10	10	90	100	10%
11	1	12	88	100	12%
11	2	9	91	100	9%
11	3	11	89	100	11%
11	4	7	93	100	7%
11	5	2	98	100	2%
11	6	13	87	100	13%
11	7	25	75	100	25%
11	8	13	87	100	13%
11	9	7	93	100	7%
11	10	23	77	100	23%
12	1	10	90	100	10%
12	2	14	86	100	14%
12	3	12	88	100	12%
12	4	31	69	100	31%
12	5	20	80	100	20%
12	6	18	82	100	18%
12	7	35	65	100	35%
12	8	17	83	100	17%
12	9	20	80	100	20%
12	10	45	55	100	45%
13	1	22	78	100	22%
13	2	15	85	100	15%
13	3	5	95	100	5%
13	4	6	94	100	6%
13	5	12	88	100	12%
13	6	15	85	100	15%
13	7	4	96	100	4%
13	8	4	96	100	4%
13	9	19	81	100	19%

13	10	19	81	100	19%
14	1	10	90	100	10%
14	2	13	87	100	13%
14	3	11	89	100	11%
14	4	13	87	100	13%
14	5	93	7	100	93%
14	6	18	82	100	18%
14	7	23	77	100	23%
14	8	9	91	100	9%
14	9	14	86	100	14%
14	10	15	85	100	15%
15	1	3	97	100	3%
15	2	6	94	100	6%
15	3	4	96	100	4%
15	4	2	98	100	2%
15	5	4	96	100	4%
15	6	4	96	100	4%
15	7	2	98	100	2%
15	8	7	93	100	7%
15	9	5	95	100	5%
15	10	6	94	100	6%
16	1	5	95	100	5%
16	2	8	92	100	8%
16	3	7	93	100	7%
16	4	11	89	100	11%
16	5	18	82	100	18%
16	6	2	98	100	2%
16	7	8	92	100	8%
16	8	9	91	100	9%
16	9	14	86	100	14%
16	10	8	92	100	8%
17	1	6	94	100	6%
17	2	9	91	100	9%
17	3	8	92	100	8%
17	4	7	93	100	7%
17	5	6	94	100	6%
17	6	8	92	100	8%
17	7	8	92	100	8%
17	8	5	95	100	5%
17	9	5	95	100	5%
17	10	3	97	100	3%
18	1	11	89	100	11%
18	2	4	96	100	4%
18	3	4	96	100	4%

18	4	9	91	100	9%
18	5	10	90	100	10%
18	6	9	91	100	9%
18	7	3	97	100	3%
18	8	5	95	100	5%
18	9	11	89	100	11%
18	10	7	93	100	7%
19	1	6	94	100	6%
19	2	11	89	100	11%
19	3	8	92	100	8%
19	4	7	93	100	7%
19	5	16	84	100	16%
19	6	13	87	100	13%
19	7	15	85	100	15%
19	8	16	84	100	16%
19	9	15	85	100	15%
19	10	9	91	100	9%
20	1	12	88	100	12%
20	2	12	88	100	12%
20	3	16	84	100	16%
20	4	23	77	100	23%
20	5	4	96	100	4%
20	6	13	87	100	13%
20	7	5	95	100	5%
20	8	4	96	100	4%
20	9	18	82	100	18%
20	10	28	72	100	28%
21	1	3	97	100	3%
21	2	7	93	100	7%
21	3	10	90	100	10%
21	4	8	92	100	8%
21	5	39	61	100	39%
21	6	58	42	100	58%
21	7	10	90	100	10%
21	8	10	90	100	10%
21	9	7	93	100	7%
21	10	13	87	100	13%
22	1	14	86	100	14%
22	2	15	85	100	15%
22	3	3	97	100	3%
22	4	21	79	100	21%
22	5	9	91	100	9%
22	6	22	78	100	22%
22	7	18	82	100	18%

22	8	3	97	100	3%
22	9	13	87	100	13%
22	10	7	93	100	7%
23	1	12	88	100	12%
23	2	24	76	100	24%
23	3	9	91	100	9%
23	4	10	90	100	10%
23	5	12	88	100	12%
23	6	20	80	100	20%
23	7	15	85	100	15%
23	8	9	91	100	9%
23	9	13	87	100	13%
23	10	11	89	100	11%
24	1	12	88	100	12%
24	2	5	95	100	5%
24	3	9	91	100	9%
24	4	8	92	100	8%
24	5	4	96	100	4%
24	6	11	89	100	11%
24	7	11	89	100	11%
24	8	5	95	100	5%
24	9	4	96	100	4%
24	10	9	91	100	9%
25	1	12	88	100	12%
25	2	24	76	100	24%
25	3	9	91	100	9%
25	4	10	90	100	10%
25	5	12	88	100	12%
25	6	20	80	100	20%
25	7	15	85	100	15%
25	8	9	91	100	9%
25	9	13	87	100	13%
25	10	11	89	100	11%
26	1	63	37	100	63%
26	2	21	79	100	21%
26	3	38	62	100	38%
26	4	11	89	100	11%
26	5	10	90	100	10%
26	6	14	86	100	14%
26	7	15	85	100	15%
26	8	33	67	100	33%
26	9	14	86	100	14%
26	10	13	87	100	13%
27	1	9	91	100	9%

27	2	8	92	100	8%
27	3	19	81	100	19%
27	4	8	92	100	8%
27	5	8	92	100	8%
27	6	35	65	100	35%
27	7	17	83	100	17%
27	8	6	94	100	6%
27	9	18	82	100	18%
27	10	5	95	100	5%
28	1	10	90	100	10%
28	2	15	85	100	15%
28	3	2	98	100	2%
28	4	16	84	100	16%
28	5	31	69	100	31%
28	6	4	96	100	4%
28	7	13	87	100	13%
28	8	8	92	100	8%
28	9	24	76	100	24%
28	10	4	96	100	4%
29	1	10	90	100	10%
29	2	6	94	100	6%
29	3	9	91	100	9%
29	4	5	95	100	5%
29	5	8	92	100	8%
29	6	17	83	100	17%
29	7	13	87	100	13%
29	8	20	80	100	20%
29	9	28	72	100	28%
29	10	25	75	100	25%
30	1	7	93	100	7%
30	2	8	92	100	8%
30	3	5	95	100	5%
30	4	11	89	100	11%
30	5	9	91	100	9%
30	6	6	94	100	6%
30	7	18	82	100	18%
30	8	3	97	100	3%
30	9	1	99	100	1%
30	10	4	96	100	4%
31	1	10	90	100	10%
31	2	6	94	100	6%
31	3	9	91	100	9%
31	4	5	95	100	5%
31	5	8	92	100	8%

31	6	17	83	100	17%
31	7	13	87	100	13%
31	8	20	80	100	20%
31	9	28	72	100	28%
31	10	25	75	100	25%

Apêndice 6. Valor absoluto para obtenção do percentual de marcação citoplasmática positiva para E-cad.

N	Campo	Marcada	Não marcada	Total
1	1	27	73	100
1	2	13	87	100
1	3	23	77	100
1	4	20	80	100
1	5	63	37	100
1	6	27	73	100
1	7	33	67	100
1	8	32	68	100
1	9	52	48	100
1	10	47	53	100
2	1	81	19	100
2	2	92	8	100
2	3	98	2	100
2	4	66	34	100
2	5	82	18	100
2	6	95	5	100
2	7	88	12	100
2	8	87	13	100
2	9	52	48	100
2	10	85	15	100
3	1	87	13	100
3	2	81	19	100
3	3	34	66	100
3	4	64	36	100
3	5	38	62	100
3	6	84	16	100
3	7	69	31	100
3	8	74	26	100
3	9	100	0	100
3	10	64	36	100
4	1	14	86	100
4	2	21	79	100
4	3	35	65	100
4	4	20	80	100
4	5	23	77	100
4	6	34	66	100
4	7	22	78	100
4	8	10	90	100
4	9	15	85	100
4	10	9	91	100
5	1	10	90	100

5	2	8	92	100
5	3	6	94	100
5	4	1	99	100
5	5	1	99	100
5	6	11	89	100
5	7	2	98	100
5	8	0	100	100
5	9	9	91	100
5	10	9	91	100
6	1	27	73	100
6	2	49	51	100
6	3	78	22	100
6	4	84	16	100
6	5	84	16	100
6	6	78	22	100
6	7	100	0	100
6	8	89	11	100
6	9	91	9	100
6	10	100	0	100
7	1	36	64	100
7	2	100	0	100
7	3	52	48	100
7	4	24	76	100
7	5	56	44	100
7	6	42	58	100
7	7	62	38	100
7	8	57	43	100
7	9	48	52	100
7	10	97	3	100
8	1	100	0	100
8	2	100	0	100
8	3	100	0	100
8	4	100	0	100
8	5	80	20	100
8	6	86	14	100
8	7	92	8	100
8	8	88	12	100
8	9	79	21	100
8	10	99	1	100
9	1	2	98	100
9	2	1	99	100
9	3	0	100	100
9	4	52	48	100
9	5	29	71	100

9	6	27	73	100
9	7	0	100	100
9	8	0	100	100
9	9	0	100	100
9	10	32	68	100
10	1	68	32	100
10	2	50	50	100
10	3	48	52	100
10	4	40	60	100
10	5	39	61	100
10	6	34	66	100
10	7	65	35	100
10	8	53	47	100
10	9	45	55	100
10	10	35	65	100
11	1	78	22	100
11	2	86	14	100
11	3	88	12	100
11	4	79	21	100
11	5	37	63	100
11	6	32	68	100
11	7	31	69	100
11	8	76	24	100
11	9	89	11	100
11	10	54	56	100
12	1	28	72	100
12	2	27	73	100
12	3	33	67	100
12	4	41	59	100
12	5	29	71	100
12	6	21	79	100
12	7	19	81	100
12	8	29	71	100
12	9	40	60	100
12	10	31	69	100
13	1	89	11	100
13	2	85	15	100
13	3	90	10	100
13	4	87	13	100
13	5	77	23	100
13	6	79	21	100
13	7	50	50	100
13	8	22	78	100
13	9	53	47	100

13	10	46	54	100
14	1	4	96	100
14	2	9	91	100
14	3	8	92	100
14	4	10	90	100
14	5	9	91	100
14	6	5	95	100
14	7	9	91	100
14	8	13	87	100
14	9	19	81	100
14	10	5	95	100
15	1	25	75	100
15	2	23	77	100
15	3	4	96	100
15	4	38	62	100
15	5	54	46	100
15	6	20	80	100
15	7	28	72	100
15	8	31	69	100
15	9	10	90	100
15	10	10	90	100
16	1	3	97	100
16	2	3	97	100
16	3	3	97	100
16	4	15	85	100
16	5	14	86	100
16	6	44	56	100
16	7	47	53	100
16	8	25	85	100
16	9	22	88	100
16	10	6	94	100
17	1	7	93	100
17	2	6	94	100
17	3	14	86	100
17	4	9	91	100
17	5	6	94	100
17	6	8	92	100
17	7	5	95	100
17	8	10	90	100
17	9	1	91	100
17	10	6	94	100
18	1	11	89	100
18	2	12	88	100
18	3	5	95	100

18	4	1	99	100
18	5	47	53	100
18	6	7	93	100
18	7	13	87	100
18	8	12	88	100
18	9	39	61	100
18	10	14	86	100
19	1	40	60	100
19	2	16	84	100
19	3	1	99	100
19	4	0	100	100
19	5	19	81	100
19	6	24	76	100
19	7	8	92	100
19	8	6	94	100
19	9	20	80	100
19	10	39	61	100
20	1	60	40	100
20	2	47	53	100
20	3	47	53	100
20	4	11	89	100
20	5	9	91	100
20	6	11	89	100
20	7	28	72	100
20	8	19	81	100
20	9	37	63	100
20	10	28	72	100
21	1	0	100	100
21	2	0	100	100
21	3	0	100	100
21	4	0	100	100
21	5	1	99	100
21	6	0	100	100
21	7	0	100	100
21	8	0	100	100
21	9	3	97	100
21	10	0	100	100
22	1	96	4	100
22	2	100	0	100
22	3	100	0	100
22	4	90	10	100
22	5	73	27	100
22	6	83	17	100
22	7	51	49	100

22	8	23	77	100
22	9	24	76	100
22	10	40	60	100
23	1	38	62	100
23	2	39	61	100
23	3	25	75	100
23	4	28	72	100
23	5	26	74	100
23	6	21	79	100
23	7	16	84	100
23	8	12	88	100
23	9	18	82	100
23	10	7	93	100
24	1	58	42	100
24	2	57	43	100
24	3	80	20	100
24	4	100	0	100
24	5	92	8	100
24	6	59	41	100
24	7	69	31	100
24	8	35	65	100
24	9	27	73	100
24	10	82	18	100
25	1	52	48	100
25	2	80	20	100
25	3	52	48	100
25	4	47	53	100
25	5	44	56	100
25	6	46	54	100
25	7	47	53	100
25	8	71	29	100
25	9	67	33	100
25	10	57	43	100
26	1	20	80	100
26	2	25	75	100
26	3	31	69	100
26	4	37	63	100
26	5	64	34	100
26	6	53	57	100
26	7	51	59	100
26	8	75	25	100
26	9	54	56	100
26	10	39	61	100
27	1	8	92	100

27	2	19	81	100
27	3	1	99	100
27	4	4	96	100
27	5	0	100	100
27	6	0	100	100
27	7	32	68	100
27	8	40	60	100
27	9	25	75	100
27	10	5	95	100
28	1	53	47	100
28	2	47	53	100
28	3	73	27	100
28	4	23	77	100
28	5	9	91	100
28	6	85	15	100
28	7	19	81	100
28	8	32	68	100
28	9	25	75	100
28	10	15	85	100
29	1	27	73	100
29	2	49	51	100
29	3	42	58	100
29	4	45	55	100
29	5	1	99	100
29	6	0	100	100
29	7	43	57	100
29	8	0	100	100
29	9	22	78	100
29	10	4	96	100
30	1	36	64	100
30	2	40	60	100
30	3	47	53	100
30	4	100	0	100
30	5	63	37	100
30	6	37	63	100
30	7	51	49	100
30	8	36	64	100
30	9	42	58	100
30	10	0	100	100
31	1	0	100	100
31	2	0	100	100
31	3	1	99	100
31	4	1	99	100
31	5	0	100	100

31	6	0	100	100
31	7	0	100	100
31	8	2	98	100
31	9	0	100	100
31	10	0	100	100

Apêndice 7. Valor absoluto para obtenção do percentual de marcação citoplasmática positiva para P-cad.

N	Campo	Marcada	Não marcada	Total
1	1	46	54	100
1	2	35	65	100
1	3	43	57	100
1	4	56	34	100
1	5	53	37	100
1	6	45	55	100
1	7	66	36	100
1	8	74	26	100
1	9	88	12	100
1	10	51	49	100
2	1	12	88	100
2	2	8	92	100
2	3	16	84	100
2	4	33	67	100
2	5	23	77	100
2	6	14	86	100
2	7	27	73	100
2	8	17	83	100
2	9	8	92	100
2	10	4	96	100
3	1	89	11	100
3	2	79	21	100
3	3	100	0	100
3	4	92	8	100
3	5	65	35	100
3	6	95	5	100
3	7	93	7	100
3	8	72	28	100
3	9	68	32	100
3	10	100	0	100
4	1	89	11	100
4	2	82	18	100
4	3	54	46	100
4	4	47	53	100
4	5	57	43	100
4	6	31	69	100
4	7	52	48	100
4	8	54	46	100
4	9	49	51	100
4	10	34	66	100
5	1	33	67	100

5	2	40	60	100
5	3	33	67	100
5	4	9	91	100
5	5	40	60	100
5	6	60	40	100
5	7	60	40	100
5	8	41	59	100
5	9	33	67	100
5	10	44	56	100
6	1	8	92	100
6	2	19	81	100
6	3	23	77	100
6	4	75	25	100
6	5	41	59	100
6	6	58	42	100
6	7	60	40	100
6	8	54	46	100
6	9	61	39	100
6	10	72	28	100
7	1	48	52	100
7	2	77	23	100
7	3	15	85	100
7	4	50	50	100
7	5	48	52	100
7	6	22	78	100
7	7	38	62	100
7	8	21	79	100
7	9	30	70	100
7	10	51	49	100
8	1	100	0	100
8	2	80	20	100
8	3	58	42	100
8	4	35	65	100
8	5	86	14	100
8	6	93	7	100
8	7	79	21	100
8	8	78	22	100
8	9	64	36	100
8	10	80	20	100
9	1	61	39	100
9	2	59	41	100
9	3	14	86	100
9	4	19	81	100
9	5	51	49	100

9	6	11	89	100
9	7	8	92	100
9	8	16	86	100
9	9	8	92	100
9	10	13	87	100
10	1	28	72	100
10	2	27	73	100
10	3	29	71	100
10	4	38	62	100
10	5	28	72	100
10	6	35	65	100
10	7	30	70	100
10	8	39	61	100
10	9	35	65	100
10	10	42	58	100
11	1	98	2	100
11	2	81	19	100
11	3	66	34	100
11	4	90	10	100
11	5	47	53	100
11	6	33	67	100
11	7	54	46	100
11	8	36	64	100
11	9	32	68	100
11	10	85	15	100
12	1	72	18	100
12	2	79	21	100
12	3	61	29	100
12	4	93	7	100
12	5	73	27	100
12	6	36	64	100
12	7	60	40	100
12	8	22	78	100
12	9	38	62	100
12	10	48	52	100
13	1	71	29	100
13	2	100	0	100
13	3	85	15	100
13	4	95	5	100
13	5	84	16	100
13	6	49	51	100
13	7	60	40	100
13	8	56	44	100
13	9	24	76	100

13	10	12	88	100
14	1	46	54	100
14	2	21	79	100
14	3	17	83	100
14	4	13	87	100
14	5	19	81	100
14	6	24	76	100
14	7	16	84	100
14	8	14	86	100
14	9	10	90	100
14	10	40	60	100
15	1	62	38	100
15	2	76	24	100
15	3	46	54	100
15	4	45	55	100
15	5	36	64	100
15	6	53	47	100
15	7	62	38	100
15	8	42	58	100
15	9	72	28	100
15	10	87	13	100
16	1	40	60	100
16	2	88	12	100
16	3	87	13	100
16	4	19	81	100
16	5	33	67	100
16	6	87	13	100
16	7	23	77	100
16	8	49	51	100
16	9	33	67	100
16	10	69	31	100
17	1	100	0	100
17	2	100	0	100
17	3	38	62	100
17	4	74	26	100
17	5	91	9	100
17	6	80	20	100
17	7	96	4	100
17	8	69	31	100
17	9	66	34	100
17	10	46	54	100
18	1	100	0	100
18	2	35	65	100
18	3	71	29	100

18	4	100	0	100
18	5	100	0	100
18	6	100	0	100
18	7	80	20	100
18	8	79	21	100
18	9	57	43	100
18	10	67	33	100
19	1	100	0	100
19	2	100	0	100
19	3	100	0	100
19	4	100	0	100
19	5	100	0	100
19	6	48	52	100
19	7	99	1	100
19	8	100	0	100
19	9	91	9	100
19	10	100	0	100
20	1	76	24	100
20	2	64	36	100
20	3	62	38	100
20	4	87	13	100
20	5	53	47	100
20	6	60	40	100
20	7	46	54	100
20	8	61	39	100
20	9	64	36	100
20	10	54	56	100
21	1	6	94	100
21	2	0	100	100
21	3	0	100	100
21	4	6	94	100
21	5	0	100	100
21	6	13	87	100
21	7	18	82	100
21	8	24	76	100
21	9	3	97	100
21	10	8	92	100
22	1	29	71	100
22	2	39	61	100
22	3	98	2	100
22	4	39	61	100
22	5	81	9	100
22	6	35	65	100
22	7	75	25	100

22	8	76	24	100
22	9	97	3	100
22	10	100	0	100
23	1	13	87	100
23	2	33	67	100
23	3	34	66	100
23	4	28	72	100
23	5	17	83	100
23	6	15	85	100
23	7	19	91	100
23	8	51	49	100
23	9	22	78	100
23	10	17	83	100
24	1	84	16	100
24	2	100	0	100
24	3	79	21	100
24	4	100	0	100
24	5	93	7	100
24	6	89	11	100
24	7	56	44	100
24	8	53	57	100
24	9	52	58	100
24	10	66	36	100
25	1	47	53	100
25	2	25	75	100
25	3	36	64	100
25	4	11	89	100
25	5	13	87	100
25	6	26	74	100
25	7	59	51	100
25	8	46	54	100
25	9	64	36	100
25	10	45	55	100
26	1	60	40	100
26	2	53	47	100
26	3	51	49	100
26	4	79	21	100
26	5	53	47	100
26	6	58	42	100
26	7	49	51	100
26	8	59	41	100
26	9	66	34	100
26	10	58	42	100
27	1	100	0	100

27	2	100	0	100
27	3	100	0	100
27	4	100	0	100
27	5	100	0	100
27	6	100	0	100
27	7	100	0	100
27	8	64	36	100
27	9	100	0	100
27	10	100	0	100
28	1	82	18	100
28	2	77	23	100
28	3	49	51	100
28	4	65	35	100
28	5	87	13	100
28	6	70	30	100
28	7	59	51	100
28	8	89	11	100
28	9	98	2	100
28	10	92	8	100
29	1	67	33	100
29	2	52	48	100
29	3	60	40	100
29	4	64	36	100
29	5	50	50	100
29	6	75	25	100
29	7	44	56	100
29	8	30	70	100
29	9	29	71	100
29	10	55	45	100
30	1	44	56	100
30	2	47	53	100
30	3	41	59	100
30	4	78	22	100
30	5	51	49	100
30	6	46	54	100
30	7	47	53	100
30	8	53	47	100
30	9	22	78	100
30	10	35	65	100
31	1	100	0	100
31	2	100	0	100
31	3	100	0	100
31	4	100	0	100
31	5	100	0	100

31	6	91	9	100
31	7	96	4	100
31	8	89	11	100
31	9	100	0	100
31	10	81	19	100
