



fmvz - unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**QUANTIFICAÇÃO DOS MASTÓCITOS NAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS
MALIGNAS DE CADELAS: ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA,
HISTOQUÍMICA E IMUNOISTOQUÍMICA**

OSIMAR DE CARVALHO SANCHES

**BOTUCATU/SP
AGOSTO/ 2010**



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

**QUANTIFICAÇÃO DOS MASTÓCITOS NAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS
MALIGNAS DE CADELAS: ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA,
HISTOQUÍMICA E IMUNOISTOQUÍMICA**

OSIMAR DE CARVALHO SANCHES

Tese apresentada junto ao programa de pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Julio de mesquita Filho” – UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de Patologia Veterinária.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira

BOTUCATU/SP
AGOSTO/ 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Sanches, Osimar de Carvalho.

Quantificação dos mastócitos nas neoplasias mamárias malignas de cadelas: análise histopatológica, histoquímica e imunoistoquímica / Osimar de Carvalho Sanches. – Botucatu, 2010.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2010.

Orientador: Julio Lopes Sequeira

Capes: 50503006

1. Tumores em animais. 2. Mamas – Câncer. 3. Cão. 4. Mastócitos.

Palavras-chave: Mama; Mastócitos; Neoplasia; Cadelas; AgNOR; Caspase-3; Ki-67.

Osimar de Carvalho Sanches

**QUANTIFICAÇÃO DOS MASTÓCITOS NAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS
MALIGNAS DE CADELAS: ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA,
HISTOQUÍMICA E IMUNOISTOQUÍMICA**

Comissão Examinadora

Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira

Presidente e Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Adj. Dr^a. Louisiane de Carvalho Nunes

Departamento de Medicina Veterinária
Centro de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Adj. Dr. Alexandre Hataka

Departamento de Medicina Veterinária
Centro de Ciências agrárias
Universidade de Marília

Prof. Ass. Dr^a. Sheila Canevese Rahal

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Ass. Dr^a. Noeme Sousa Rocha

Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Data da defesa: 17 de agosto de 2010.

A Deus

*Arrasta-me após ti; corramos!
O rei introduziu-me nos seus aposentos.
Exultaremos de alegria e júbilo em ti.
Tuas carícias nos enebriarão mais que o vinho.
Quanta razão há de te amar!
(Cânt 1,4)*

Aos Meus Pais
Osvaldo e Marilena

*Ouve, meu filho, a instrução de teu pai:
não desprezes o ensinamento de tua mãe.
Isso será, pois, um diadema de graça para tua cabeça
e um colar para teu pescoço.
(Prov 1;8-9)*

À minha esposa Elisabete, aos meus filhos Maria Eduarda,
Jacqueline e Flávio

*Tu minha amada és o sal que veio dá sabor
e significado a minha vida. E vocês meus queridos,
são os presentes que Deus enviou
para me dar forças e coragem nesta jornada.*

Ao meu orientador
Prof. Dr. Julio Lopes Sequeira

*Existirá algo mais agradável do que ter alguém
com quem falar de tudo como
se estivéssemos falando conosco mesmos?
(Cícero)*

AGRADECIMENTOS

Para que um projeto seja realizado é necessário o envolvimento de várias pessoas, e este não foi diferente. Portanto, quero agradecer a todos que contribuíram direta ou indiretamente, e em especial:

Aos funcionários do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Veterinário da Universidade do Oeste Paulista: Cleonice Trevisan e Marcos Roberto Ramos, que foram fundamentais.

A Prof. Dr^o. Julio Lopes Sequeira pela orientação deste trabalho e pela amizade.

A Prof. Dr^a. Teresa Cristina Goulart de Oliveira Sequeira pelas conversas sinceras e pela acolhida em sua residência.

A Dr^a Camila Dias Porto pela inestimável ajuda com a técnica de imunoistoquímica.

Ao Prof. Dr. Rogério Giuffrida pela análise estatística, pela paciência e sugestões.

Aos Professores do Serviço de Anatomia Patológica da FMVZ: Julio Lopes Sequeira e Noeme Sousa Rocha.

A Dr^o. Caio Henrique Paganini Burine e sua esposa Daniela pela acolhida em sua casa, e pelas conversas sobre neoplasia mamária.

A Seção de Pós-graduação da FMVZ.

A direção do Curso de Medicina Veterinária da UNOESTE, na pessoa do Prof. Dr. Luis Carlos Vianna.

Aos meus ex-alunos e orientados Evandro Caldato, André Louzada, Daniele Cristina Voltarelli, Tatiana Dias Sichiere, Glaucia Ricci Lopes e Eliana Caleiro que participaram diretamente deste trabalho.

A Residente do Serviço de Patologia Animal da Unoeste Karina Maria Basso pela ajuda na tabulação dos dados.

LISTAS DE QUADROS E TABELAS

	Página
Quadro 1 – Classificação Histopatológica das neoplasias mamária em cães (WHO).-----	18
Tabela 1 – Relação de Anticorpos Primários e diluição -----	21
Quadro 2 – Distribuição das neoplasias malignas conforme a classificação histopatológica-----	27
Tabela 2 – Média e respectivo desvio-padrão da contagem de mastócitos e NORs conforme o tipo histomorfológico da neoplasia -----	32
Tabela 3 - Frequência (%) do índice de proliferação (Ki-67) conforme a classificação histomorfológica das neoplasias malignas -----	36
Tabela 4 - Mostra a frequência (%) do índice apoptótico (Caspase-3) conforme a classificação histopatológica da neoplasia -----	38
Tabela 5 - Coeficientes de correlação de Pearson (r) e valores de significância (p) para as variáveis MAST e NOR+, segundo a classificação da neoplasia, Presidente Prudente, 2010 -----	44
Tabela 6- Coeficientes de correlação de postos de Spearman (r_s) e valores de significância (p) para as variáveis MAST, KI-67+ e CASP-3+, segundo a classificação do tumor, Presidente Prudente, 2010 -----	45
Tabela 7- Coeficientes de correlação de postos de Spearman (r_s) e valores de significância (p) para as variáveis CASP-3+, NOR+ e Ki67+, segundo a classificação do tumor, Presidente Prudente, 2010 -----	46
Tabela 8- Medianas (med), e valores mínimos (v. mín) e máximos (v. máx.) dos escores de contagens de células Ki-67 positivas (Ki-67+) e Caspase-3 positivas (CASP-3+) para os tumores pesquisados, Presidente Prudente, 2010 -----	47

LISTAS DE FIGURAS

	Página
Figura 1– Distribuição racial das 102 cadelas portadoras de neoplasia mamária.-----	24
Figura 2. Idade das 102 cadelas portadoras de neoplasia mamária. -----	25
Figura 3 – Distribuição do porte das 102 cadelas com neoplasia mamária.	26
Figura 4 - Distribuição das neoplasias mamárias conforme a classificação histomorfológica nas 102 cadelas portadoras de neoplasia mamária.-----	28
Figura 5. Fotomicrografia de carcinoma complexo, onde é visualizado componente epitelial (cabeça de seta) e o componente mioepitelial (setas) – HxE -40x.-----	29
Figura 6. Fotomicrografia de carcinoma simples do tipo túbulo-papilífero, com formação marcante de papilas (setas) – HxE -10x. -----	29
Figura 7. Fotomicrografia de carcinoma de células fusiformes, com aglomerado de células epiteliais (seta menor) e predomínio de células fusiformes (seta maior) – HxE -40x.-----	30
Figura 8. Fotomicrografia de carcinosarcoma, observa-se componente epitelial (cabeça de seta) e mesenquimal (setas) com diferenciação óssea e cartilaginosa – HxE – 10x.-----	30
Figura 9. Fotomicrografia de carcinoma simples do tipo anaplásico, observa-se pleomorfismo acentuado e nucléolos evidentes. HxE – 40x.-----	31
Figura 10. Fotomicrografia de corte de carcinoma simples do tipo sólido, observa-se forte coesão entre as células (seta) e delgado estroma conjuntivo (cabeça de seta) HxE – 40x.-----	31
Figura 11 – Fotomicrografia de carcinoma simples do tipo túbulo papilífero, observa-se infiltrado marcante de mastócitos (setas) – Azul de toluidina, 40x.-----	33

Figura 12 – Fotomicrografia de carcinoma simples do tipo túbulo papilífero, observa-se mastócitos (setas) – Azul de toluidina, 100x.-----	33
Figura 13 – Fotomicrografia de carcinoma complexo, corado pela técnica da AgNOR e contracorado com verde luz. Observar as NORs (setas), AgNOR-40x.-----	35
Figura 14 – Fotomicrografia de carcinosarcoma, observar as NORs como pontos negros (setas), corado pela técnica da AgNOR e contracorado com verde luz, 100x.-----	35
Figura 15 – Prevalência dos escores de imunomarcção de Ki-67 conforme a classificação histopatológica das neoplasias mamárias.-----	37
Figura 16 – Prevalência dos escores de imunomarcção de caspase-3 conforme a classificação histopatológica das neoplasias mamárias. -----	39
Figura 17 – Fotomicrografia de coloração imunoistoquímica controle negativo, ausência do anticorpo primário anti-Ki-67, DAB, contracorado com Hematoxilina 100x.-----	40
Figura 18 – Fotomicrografia de coloração imunoistoquímica controle positivo (seta), anticorpo primário anti-Ki-67, DAB, contracorado com Hematoxilina 100x.-----	40
Figura 19 - Fotomicrografia de coloração imunoistoquímica mostrando marcação (setas) de escore (+), anticorpo primário anti-Ki-67, DAB, contracorado com Hematoxilina, 100x.-----	41
Figura 20 - Fotomicrografia de coloração imunoistoquímica mostrando marcação (setas) de escore (++), anticorpo primário anti-Ki-67, DAB, contracorado com Hematoxilina, 100x.-----	41
Figura 21 - Fotomicrografia de coloração imunoistoquímica mostrando marcação (setas) de escore (++), anticorpo primário anti-Ki-67, DAB, contracorado com Hematoxilina 100x.-----	42
Figura 22 - Fotomicrografia de coloração imunoistoquímica mostrando marcação (setas) de escore (+++), anticorpo primário anti-Ki-67, DAB, contracorado com Hematoxilina 100x.-----	42

Figura 23 - Fotomicrografia de carcinoma de células fusiformes, coloração imunoistoquímica mostrando marcação (setas) de escore (++) , anticorpo primário anti-caspase-3, DAB, contracorado com Hematoxilina 100x.----- 43

Figura 24 - Fotomicrografia de carcinoma simples anaplásico, coloração imunoistoquímica mostrando marcação (setas) de escore (+++) , anticorpo primário anti-caspase-3, DAB, contracorado com Hematoxilina 100x.----- 43

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
3. OBJETIVOS.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 - Origem das Amostras.....	17
4.2 - Classificação Histopatológica das Amostras.....	17
4.3 - Avaliação Histoquímica.....	19
4.3.1 – Técnica do azul de Toluidina.....	19
4.3.2 – Avaliação quantitativa dos mastócitos.....	19
4.3.3 – Técnica da AgNOR.....	19
4.3.4 – Avaliação Quantitativa das NORs.....	20
4.4 – Avaliação Imunoistoquímica.....	20
4.4.1 – Técnica de Coloração Imunoistoquímica.....	20
4.4.2 – Quantificação das Reações Imunoistoquímicas.....	21
4.5 Análise Estatística.....	22
5. RESULTADOS.....	23
5.1- Avaliação dos Dados Clínico-epidemiológicos dos Animais.....	24
5.1.1 – Padrão racial.....	24
5.1.2 – Idade dos animais.....	25
5.1.3 – Porte dos animais.....	26
5.2 – Avaliação Histopatológica das Amostras.....	26
5.3 – Avaliação histoquímica das amostras.....	32
5.3.1 – Avaliação quantitativa dos mastócitos.....	32
5.3.2 – Avaliação quantitativa das NORs.....	34
5.4 – Avaliação imunoistoquímica das amostras	34
5.4.1 – Avaliação do índice de proliferação (Ki-67 – MIB 1).....	34
5.4.2 – Avaliação do índice apoptótico (caspase 3).....	37
5.5 - Corelação entre a contagem diferencial de mastócitos e os parâmetros de proliferação e morte celular.....	44

5.6 - Correlação entre as contagens de células caspase-3-positivas e os parâmetros de proliferação celular (NORs e Ki-67)-----	46
5.7- Comparação dos escores e medianas de escores entre os diferentes tipos de Neoplasias-----	47
6. DISCUSSÃO-----	48
6.1- Avaliação dos Dados Clínico-epidemiológicos dos Animais-----	49
6.1.1 – Quanto ao padrão racial-----	49
6.1.2 – Idade dos animais-----	50
6.1.3 – Porte dos animais-----	51
6.2 – Avaliação Histopatológica das Amostras-----	51
6.3 – Avaliação histoquímica das amostras -----	53
6.3.1 – Avaliação quantitativa dos mastócitos-----	53
6.3.2 – Avaliação quantitativa das NORs-----	55
6.4 – Avaliação imunoistoquímica das amostras -----	56
6.4.1 – Avaliação do índice apoptótico (caspase 3) -----	56
6.4.2 – Avaliação do índice de proliferação (Ki-67 – MIB 1)-----	57
6.4.3 – Comentários finais-----	58
7. CONCLUSÕES-----	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	61
9. ARTIGO CIENTÍFICO-----	71

RESUMO

Sanches, O. C. Quantificação dos mastócitos na neoplasia mamária maligna de cadelas: análise histopatológica, histoquímica e imunoistoquímica. Botucatu, 2010. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

O presente trabalho teve como objetivo quantificar e avaliar presença dos mastócitos nos diferentes tipos de neoplasias malignas da glândula mamária da cadela. Através de estudo retrospectivo, foi empregado à coloração histoquímica do azul de toluidina, para detecção de mastócitos, e a técnica imunoistoquímica, usando os anticorpos Ki-67 para proliferação celular e a caspase-3 para identificar as células em apoptose. As amostras (n= 102) foram descritas conforme a Classificação Histopatológica para Neoplasia Mamária do Cão e do Gato da Organização Mundial de Saúde. Os animais sem raça definida apresentaram o maior número de casos, e entre os animais com raça definida, a raça Poodle foi a que apresentou o maior número de casos. A idade média das cadelas foi de 8,6 anos. Os tipos morfológicos de neoplasias encontradas foram o carcinoma *in situ* com 0,98%, carcinoma complexo com 45,09%, carcinoma simples com 35,29%, carcinossarcoma com 10,78% e os tipos especiais de carcinomas que representaram 7,89% dos casos. Os mastócitos estavam presentes no foco neoplásico em 96,08% das amostras. 99% das amostras apresentaram marcação positiva para o anticorpo Ki-67 (MIB-1). Já a imunomarcação pela caspase-3 revelou marcação positiva em 95% dos casos. Foi observada correlação significativa positiva entre o número de mastócitos e o índice de proliferação (Ki-67) ($p<0,05$) nos carcinomas do tipo complexo. Os mastócitos mostraram influência na proliferação das células dos carcinomas complexos, contudo, é necessário mais estudos para elucidar o papel destas células no índice de proliferação.

Palavras Chaves: Mama; Mastócitos; Neoplasia; Cadelas; AgNOR; Caspase-3; Ki-67.

ABSTRACT

SANCHES, O. C. Evaluation about the function of mast cells in the mammary tumours in dogs: histopathology, histochemistry and immunohistochemistry. Botucatu, 2010. Doctoral Thesis, Universidade Estadual Paulista, Veterinary Medicine and Animal Science Department.

The presented study aimed to quantify and evaluate the presence or absence of mast cells in different types of malignancies in the mammary gland of the female dogs. For this, it was used the blue toluidine in the histochemical colours with the purpose of detecting mast cells, and immunohistochemical techniques, using the antibodies Ki-67 to the proliferation of the cells and caspase-3 antibody to identify undergoing cells in apoptosis. All samples were put according to the pathological classification for dog's and cat's breast cancer in the World Health Organization. About the racial pattern, it was observed a higher number of cases in animals without breed, and in the animals with breed, the Poodle was the one with the largest number of cases. The average age of the female dogs was 8.6 years old. The morphological types of neoplasm founded were: carcinoma in situ with 0.98% (1/102), complex carcinoma with 45.09% (46/102), simple carcinoma in 35.29% (36/102) carcinosarcom in 10.78% (11/102) and special types of carcinomas that were represented with 7.89% (08/102) of the total number of cases. The mast cells were presented in the neoplastic focus with 96.08% (98/102), and it prevailed in areas where there are lots of human tissues, especially around the vessels. About the immune numbers of samples using the Ki-67 (MIB-1), it was conclude that 99% (101/102) showed positive results. However, using the caspase-3 it was showed positive results in 95% (97/102). About the influence of mast cells in the proliferation of neoplastic cells, it was observed a significant positive correlation between the number of mast cells and the proliferation (Ki-67) for the complex carcinoma ($p < 0.05$). The correlation between death and cells proliferation showed a negative significant relation in spindle cells carcinomas, between the apoptotic number (Caspase-3) and the proliferation number (NORs). How bigger is the number of NORs, it was smaller the presence of caspase-3.

Keywords: Breast; Mast Cells; Neoplastic; Bitch; AgNOR; Caspase-3; Ki-67.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias são importantes processos patológicos que acometem os cães, e as neoplasias mamárias em cadelas, são as que possuem segunda maior casuística. Misdorp et al. (1991), relatam uma taxa de incidência anual de 198 casos de neoplasias para cada 100.000 cadelas; observa-se ainda que a incidência é maior em cadelas com mais de cinco anos de idade.

A etiologia das neoplasias mamárias ainda não está totalmente esclarecida, entretanto, acredita-se que os principais fatores sejam hormonais. Pois a constatação de que cadelas castradas precocemente possuem menor probabilidade de desenvolverem a neoplasia, e que animais que recebem progestágenos exógenos, ou que tiveram quadros de pseudocieses, têm uma maior probabilidade de desenvolver a doença.

De acordo com Gilbertson et al. (1983) e Morrisson (1998), a grande heterogeneidade histopatológica torna difícil o estabelecimento de um sistema de classificação universal para as neoplasias de mama em caninos, tornando complicada a comparação de resultados entre dados de diferentes pesquisadores.

Dentre as neoplasias mamárias malignas, os carcinomas são os mais freqüentes, correspondendo a aproximadamente 45 a 50% do total (CAVALCANTI, 2006).

É verificado em vários estudos que as neoplasias mamárias possuem uma alta incidência de metástases, o que reforça a necessidade de diagnósticos precoces e técnicas de avaliação prognósticas rápidas e seguras para auxiliar o clínico veterinário a escolher uma conduta mais adequada diante do processo patológico em questão.

Vários são os métodos de avaliação do prognóstico das neoplasias mamárias, dentre estas a utilização da técnica histoquímica da AgNOR, Ki-67 (MIB-1) e a caspase-3. Estas técnicas de avaliação estão se difundindo na Medicina Veterinária, auxiliando na determinação do prognóstico, bem como na escolha do tratamento para os animais acometidos com a doença.

As NORs (Regiões Organizadoras de Nucléolos) são regiões do DNA, localizados nos nucléolos. Assim a denominação AgNOR significa, áreas de

NORs coradas pela prata, que ao microscópio óptico pode se observar como áreas enegrecidas no interior de núcleo e nucléolos.

Outras pesquisas já determinaram a importância da técnica da AgNOR como fator prognóstico em neoplasias. Isto pode ser observado nos trabalhos de Moran et al. (1989), Öfner et al. (1990), Rüschoff et al. (1990a), quando observam uma clara correlação entre o aumento da contagem de AgNORs e baixa sobrevivência dos pacientes.

Outro parâmetro que está sendo utilizado para avaliação do prognóstico em neoplasias que acometem o homem (como melanoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de cólon e carcinoma mamário) é a presença e quantificação dos mastócitos no foco neoplásico e nos linfonodos satélites.

Vários autores atribuem papel importante aos mastócitos, no que tange a proliferação de células neoplásicas no homem. Indicando que a presença de mastócitos tem um fator prognóstico ruim nas neoplasias (HARTVEIT et al., 1981; NORDLUND e ASKENASE, 1983; ROCHE, 1986; DABBOUS et al., 1991; CRICCO et al., 1994).

Rajput et al. (2007) estudando câncer mamário invasivo na mulher, usando a técnica do Tissue microarrays em 4.444 casos, constatou que a presença de um ou mais mastócitos no ambiente neoplásico é suficiente para exercer efeito prognóstico positivo.

Entretanto, estudo recente indica que a triptase aumenta a migração e a invasão das células neoplásicas malignas, contudo, não interfere na proliferação das mesmas (XIANG, 2010).

Pelo fato de não existir trabalhos que demonstre a quantificação e a influência dos mastócitos em cadelas com neoplasias mamárias, o presente estudo teve como objetivo quantificar e avaliar presença dos mastócitos nos diferentes tipos de neoplasias malignas da glândula mamária da cadela.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

Neoplasias de mama ocorrem comumente em cães, ratos, camundongos e gatos, e representam de 25 a 50% de todas as neoplasias das cadelas (JONES et al., 2000). A taxa de incidência anual é de 198 casos de neoplasia mamária para cada 100.000 cadelas (MISDORP et al., 2002).

As glândulas mamárias inguinais são as mais acometidas, e podem, dependendo do seu estágio evolutivo, serem pequenos, ulcerados, móveis, lobulares ou fixos a tecidos adjacentes (MEINERZ, 2004).

Dentre as neoplasias mamárias malignas, os carcinomas são os mais frequentes, correspondendo a aproximadamente 45 a 50% do total (CAVALCANTI, 2006).

Analisando 85 cadelas com neoplasia mamária, Oliveira et al. (2003), relatam que 71,8% eram malignas e 28,2% benignas, onde o carcinoma e o adenoma compunham a maioria das neoplasias malignas e benignas respectivamente, e que a idade média dos animais com neoplasias malignas e benignas foi de 9 anos de idade.

Os tumores mamários são raros em cadelas com menos de dois anos de idade, contudo ocorre um aumento abrupto na incidência por volta dos seis anos de idade (JONES et al., 2000).

Quanto à etiologia das neoplasias mamárias existem algumas hipóteses citadas: origem viral; influência da dieta (principalmente ao que se refere ao consumo de gordura) e atividade hormonal (ZUCCARI et al., 2001). Acredita-se que a principal etiologia seja hormonal, pelo fato de que há maior prevalência de câncer mamário em cadelas não castradas (GALERA et al., 2002). Entretanto, Jones et al (2000), relatam que a administração de progestágenos exógenos por período prolongado não induziu a neoplasia mamária; e acredita-se que as hipófises de cadelas com neoplasia mamária secretam mais hormônio do crescimento (GH) e menos hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), e hormônio estimulante da tireoide (TSH), em comparação a cadelas normais.

Oliveira et al., (2003), comenta que os progestágenos foram associados a uma maior incidência de tumores benignos, e que quadros de pseudociese são relacionados à maior ocorrência de neoplasias malignas, sendo assim, reforça que tanto o uso de progestágenos como as pseudocieses estão relacionados com o aparecimento precoce de neoplasias mamárias em cadelas.

Outro dado que sustenta a etiologia hormonal, é o fato de que a incidência é reduzida a 0,05 % quando a cadela é castrada antes do primeiro estro; 8 % após o primeiro estro; e 26 % quando castrada após o segundo estro; não se alterando após dois anos de idade (FERGUSON, 1985; JONES et al., 2000; ZUCCARI et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2003).

Burini (2002), estudando neoplasia mamária em cadelas sem raça definida observou que 83% destas apresentavam obesidade, e quanto ao tipo de neoplasia constatou que 43% dos animais com carcinoma e 10% dos animais com carcinoma complexo eram obesos.

Baseados em critérios morfológicos e biológicos, estima-se que aproximadamente 30% das neoplasias mamárias removidas cirurgicamente são malignas (MISDORP, 2002).

Os adenomas e os mistos benignos, respondem por cerca de metade de todas as neoplasias mamárias em cadelas, com o restante das neoplasias em geral sendo classificadas como carcinomas e adenocarcinomas (BRODEY et al 1983). Os sarcomas (fibrossarcoma, osteossarcoma, condrossarcoma) respondem por menos de 5% das neoplasias (KNAPP et al 2004).

Quanto ao aspecto histológico há relatos de que 40% são adenocarcinomas, 50% mistos e 10% de outros tipos histológicos (FERGUSON, 1985). Dentre as neoplasias malignas, os carcinomas são os mais frequentes, correspondendo a aproximadamente 45 a 50% do total (CAVALCANTI, 2006).

O trabalho realizado por Meiners (2004) verificou que os animais acometidos geralmente têm mais de seis anos de idade, sendo raças esportivas (Pointers, Retrievers, Setters ingleses e Spaniels), Poodles, Boston terriers, Tekel, as mais acometidas; sendo que 50 a 60% são malignos e

potencialmente metastáticos, acometendo principalmente os linfonodos locais e pulmões.

Segundo o relato de Cavalcanti (2006), a metástase nos carcinomas primários de mama de cadelas ocorre preferencialmente via linfática. Os principais órgãos acometidos pela disseminação tumoral são: linfonodos regionais (inguinais e axilares) e pulmão; com menor frequência atinge rim, fígado, baço, pele, as adrenais, encéfalo, olhos e esqueleto.

A ocorrência média de metástases nos carcinomas varia entre 30 a 85%. Em outro estudo, 50% dos tumores analisados eram carcinomas, sendo que 83% causaram metástases, levando 64% dos animais a óbito pela disseminação da doença (CAVALCANTI, 2006).

As neoplasias compreendidas nas três mamas craniais corresponderam a 5,9% dos casos, enquanto nas três mamas caudais corresponderam a 51,8%. Tumores em todas as mamas ocorreram em 36,5% dos casos (OLIVEIRA et. al., 2003).

As principais características básicas que incrementam o diagnóstico e auxiliam a determinação do prognóstico são: o tamanho tumoral, tipo histológico, o índice mitótico e o envolvimento linfático (CAVALCANTI, 2006).

Para avaliação dos prognósticos dos tumores mamários existem vários métodos sendo eles: a graduação de I a III em ordem crescente de anaplasia; método Nottingham, que analisa o índice de formação tubular, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica; estadiamento clínico sistema TNM, que se baseia no tamanho da lesão primária (T); na extensão de sua disseminação para linfonodos regionais (N) e na presença ou ausência de metástases à distância (M) (GILBERTSON et al., 1983).

Os mastócitos filogeneticamente são células que se perpetuaram durante a cadeia evolutiva, que aparentemente estão presentes em todas as espécies com circulação sanguínea. São originadas a partir de células progenitoras pluripotentes CD34, c-Kit e CD13 positivas da medula óssea (KLAS, 2002).

Estão envolvidos em uma série de eventos biológicos como as reações inflamatórias e alérgicas, cicatrização e remodelamento de feridas (MALONE et

al., 1986; DVORAK e KISSEL, 1991; TAKIZAWA et al., 1989). Além disso, o acúmulo de mastócitos, assim como a degranulação de seus produtos no microambiente neoplásico, tem sido associado com a rápida progressão neoplásica no homem e nos outros animais (DABBOUS et al., 1991; KANKKUNEN et al., 1997).

Hoje está claro que a lesão no DNA por si só não origina o câncer; contudo a proliferação celular é sustentada por um rico ambiente de células inflamatórias, fatores de crescimento, atividade estromal e agentes que promovam o dano no DNA (COUSSENS e WERB, 2002).

Os mastócitos liberam uma variedade de moléculas químicas como a heparina, histamina, triptase e quimase, assim como as citocinas TGF- β , TNF- α , IL-8, FGF-2 e VEGF que promovem e ou aumentam a angiogênese (RIBATTI et al., 2001). Os mastócitos regulam a degradação da matriz extracelular, a angiogênese e a resposta imune pela liberação destas moléculas bioativas (IRANI et al., 2010).

Kankkunen et al., (1997) analisando neoplasias mamárias (malignas e benignas), encontram correlação significativa nos mastócitos que expressavam maior conteúdo de triptase. Há relatos, indicando que densidade elevada de mastócitos promovem o crescimento neoplásico pelo fato destes aumentarem a angiogênese (IAMAROON et al., 2003).

Xiang et al., (2010) avaliando a triptase na neoplasia mamária da mulher, concluíram que a maior quantidade de triptase foi observado nas neoplasias de alto grau de malignidade, e que a triptase não promove a proliferação celular, entretanto, ela promove a invasão e a migração da célula neoplásica, através da ativação da metaloproteinase do tipo 2.

A relação entre histamina e o crescimento celular, porém, depende de um conjunto de eventos simultâneos tendo em vista que antagonistas de receptores H₂ e agonistas dos receptores H₁ podem inibir o crescimento celular, enquanto que antagonistas H₁ podem promover o crescimento celular. Assim, tratando-se de neoplasia, há um papel dual da histamina, tanto estimulando quando inibindo a proliferação celular. Portanto, o efeito depende da expressão predominante de um ou outro tipo de receptor na superfície da

célula neoplásica e da expressão de receptores histaminérgicos de linfócitos T citotóxicos presentes no local do tumor (BONAMIN et al., 1999).

Lemos et al. (1995), relatam que a célula mamária da mulher possui receptores de histamina (H_1 e H_2) na membrana celular. A histamina liberada por mastócitos possui um papel importante no crescimento nas células do carcinoma mamário induzido experimentalmente em ratas (CRICCO et al., 1994).

Há discussão grande no que tange a presença do infiltrado de mastócitos nas neoplasias mamárias que acometem a mulher. Um número maior de mastócitos foi detectado em neoplasias que apresentavam caráter maligno (HARTVEIT et al., 1981).

Nordlund e Askenase (1983) e Roche (1986), relatam que o crescimento das células neoplásicas é significativamente reduzido, quando se utiliza substância que estabiliza a membrana dos mastócitos, impedindo assim a liberação dos seus componentes citoplasmáticos.

Dabbous et al. (1991), usando substância que estabilizava a membrana dos mastócitos, impedindo assim a liberação dos mediadores químicos e das enzimas citoplasmáticas no carcinoma mamário em ratas, concluíram que no grupo que usava a droga estabilizadora de membrana, a inibição do crescimento neoplásico “in vivo” era aproximadamente 70% menor do que no grupo controle, o que vem corroborar os achados de Nordlund e Askenase (1983) e Roche (1986). Essa observação sustenta o conceito de que a interação dos mastócitos com a célula neoplásica é importante para as propriedades de crescimento e invasão demonstradas nos modelos experimentais de carcinoma mamário, pois quando o tratamento com droga estabilizadora era retirado, observava-se rápida proliferação da massa neoplásica (DABBOUS et al., 1991).

Do ponto de vista histopatológico vários são os métodos de avaliação do prognóstico das neoplasias mamárias, incluindo técnicas de imunoistoquímica e histoquímica. Dentre estas, a técnica histoquímica da AgNOR vêm-se difundindo em medicina veterinária, pelo fato desta oferecer boa avaliação da proliferação celular, ser de fácil execução, poder ser utilizada em material parafinado e ser de baixo custo (MORITA et al., 1991; LÖHR et al., 1997).

NORs (Regiões Organizadoras de Nucléolos) são regiões do DNA, localizados nos nucléolos, que possuem genes para a transcrição do RNA ribossômico. Nas células normais (na fase de interfase) as NORs estão exclusivamente agregadas nos nucléolos, enquanto nas células neoplásicas elas desagregam-se dos nucléolos e tendem a dispersar-se pelo núcleo (MADEWELL, 1997; TRERÈ, 2000). A prata reage seletivamente com proteínas ácidas não histônicas ricas em grupos sulfidrilícos e dissulfetos, que por sua vez, reduzem os íons de prata, sendo possível observar na microscopia óptica como agregados negros no interior dos nucléolos e núcleos. Na microscopia eletrônica o complexo corado corresponde ao sítio da RNA-polimerase 1 (MADEWELL, 1997; TRERÈ, 2000).

A aplicação prática da análise das NORs em neoplasias começou a ser avaliada por Ploton et al (1986). A partir daí vários trabalhos relatam o emprego da quantificação das NORs em neoplasias como em melanomas e linfomas (CROCKER e SKILBECK, 1987; CROCKER e NAR, 1987).

O valor prognóstico da análise das AgNORs em cães foi sugerido por Bostock et al. (1989) estudando mastocitomas. Cadelas com carcinoma mamário que possuem contagem das NORs por núcleo menor que 8, possuem um melhor prognóstico e uma sobrevida maior, diferente dos animais com contagem das NORs acima de 8, que morrem antes de completar um ano pós intervenção cirúrgica (BOSTOCK et al., 1992). Uma clara correlação entre o aumento da contagem das NORs e baixa sobrevivência foi demonstrada em carcinoma colorretal (MORAN et al., 1989; ÖFNER et al, 1990; RÜSCHOFF et al., 1990a).

Pich et al. (2000), estudando vários tipos de neoplasias verificaram que a análise das AgNORs é um fator prognóstico importante.

A análise morfométrica da área nuclear e das AgNOR em neoplasias mamárias malignas e benignas, mostrou diferença significativa, indicando uma expressão maior de AgNOR e área nuclear nos tumores malignos (CORRÊA et al., 2004).

Outra ferramenta importante para avaliação do prognóstico das neoplasias é a proliferação celular (Preziosi et al., 1995; Kreitz et al., 2000), e o mais estudado marcador de proliferação celular é o Ki-67. Uma proteína

nuclear não histônica, que pesa entre 345 e 395 quilo-daltons, sendo expressada 24 a 36 horas após o estímulo de divisão (fase G_1), alcançando o máximo durante a mitose, diminuindo drasticamente após esta fase, não sendo detectada durante a fase G_0 (ALLRED et al., 1998; DU MANOIR et al., 1991). A expressão do Ki-67 em neoplasias mamárias da mulher e de cães mostra correlação positiva com o tamanho da massa, aparecimento de metástase, expressão de receptores de estrógeno, morte pela neoplasia e baixa taxa de sobrevivência (BROWN & GATTER, 1990; VERONESE & GAMBACORTA, 1997; BOUZUBAR et al, 1989; NIETO et al, 1998 e ALENZA et al., 2000).

Apoptose é definido como morte celular programada, e consiste em um mecanismo homeostático geneticamente controlado para induzir a morte celular. No mecanismo de desencadeamento da apoptose, as caspases tem papel fundamental. Estas são uma família de enzimas, que estão presente no citoplasma na forma inativa “pro-enzimas”, tornando-se ativas após clivagem de seus substratos em segmentos específicos de ácido aspártico. Elas participam do mecanismo apoptótico como elementos reguladores e iniciadores do processo (caspases 8 e 10), ao passo que as caspases (3, 6 e 7) participam como executoras e ou efetoras da fragmentação celular (CHEVILLE, 2009; RODASKI & PIEKARZ, 2009).

OBJETIVOS

3 – OBJETIVOS

- Verificar os aspectos epidemiológicos das cadelas com neoplasia mamária maligna;
- Avaliar quantitativamente a presença dos mastócitos em neoplasias malignas mamárias em cadelas;
- Avaliar quantitativamente o número das NORs no diferentes tipos histomorfológicos das neoplasias de mama na cadela;
- Determinar o índice de proliferação celular e o índice apoptótico usando a técnica de imunoistoquímica com os anticorpos Ki-67 e caspase-3 respectivamente;
- Verificar se a presença de mastócitos influencia na proliferação e ou na apoptose das células neoplásicas da mama de cadela;

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem das Amostras

Foram avaliadas 102 amostras (biopsias e peças cirúrgicas) de neoplasias mamárias malignas oriundas do arquivo do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Veterinário da Unoeste, colhidas no período de 1999 a 2005. Os prontuários dos respectivos animais foram avaliados com a finalidade de colher os dados epidemiológicos.

Os fragmentos das neoplasias mamárias foram processados de acordo com a técnica de rotina histopatológica para inclusão em parafina. Cortes com 3 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo, depositados em lâminas e em seguida permaneceram em estufa a 60°C por 24 horas para fixação dos cortes à lâmina. Os cortes destinados a técnicas de imunoistoquímica foram depositados em lâminas histológicas previamente tratadas com Organosilano (A3648- Sigma Chemical CO). Após este procedimento, as lâminas foram submetidas aos processos de desparafinização e hidratação; e em seguida as mesmas foram coradas pelos métodos da Hematoxilina e Eosina (HxE), Azul de Toluidina, AgNOR e pelos anticorpos anti-caspase-3 e Ki-67.

4.2 Classificação Histopatológica das Amostras

Todas as amostras avaliadas eram de neoplasias malignas, e foram classificadas quanto ao tipo histomorfológico. A classificação histopatológica das amostras foi baseada na classificação para tumores mamários do cão e do gato formulada pela Organização Mundial de Saúde (WHO) e pelo Armed Forces Institute Pathology - AFIP (2004), como mostra o quadro 1.

Vale resaltar que no presente estudo não foi realizado o estadiamento histopatológico das amostras.

Quadro 1 – Classificação histopatológica das neoplasias mamária em cães segundo a WHO.

Neoplasias malignas
Carcinoma <i>in situ</i>
Carcinoma complexo
Carcinoma simples:
- Carcinoma túbulo-palilífero
- Carcinoma sólido
- Carcinoma anaplásico
Tipos especiais de carcinoma:
- Carcinoma de células fusiformes
- Carcinoma de células escamosas
- Carcinoma mucinoso
Carcinoma rico em lipídeos
Sarcomas:
- Fibrossarcoma
- Osteossarcoma
- Outros sarcomas
Carcinossarcoma
Carcinoma ou sarcoma em neoplasias benignas
Neoplasias Benignas
Adenoma:
- Adenoma simples
- Adenoma complexo
- Adenoma basalóide
Fibroadenoma:
- Fibroadenoma com baixa celularidade
- Fibroadenoma com alta celularidade
Tumor misto benigno
Papiloma ductal
Tumores sem classificação
Hiperplasias mamárias e displásicas:
- Hiperplasia ductal
- Hiperplasia lobular:
- Hiperplasia epitelial
- Adenose
- Cistos
- Ectasia ductal
- Fibrose focal
- Ginecomastia

4.3 Avaliação Histoquímica

4.3.1 Técnica do azul de toluidina

Todas as amostras foram desparafinadas, hidratadas em série alcoólica e lavadas em água corrente por cinco minutos, depois lavadas em água destilada, dois banhos de três minutos, e coradas com solução alcoólica de azul de toluidina em pH 2,0 por dez minutos. Após isto, foram desidratadas, diafanizadas e montadas com resina sintética.

4.3.2 Avaliação quantitativa dos mastócitos

A avaliação histoquímica da presença e da quantificação dos mastócitos nas amostras foi feito baseado na contagem destas células em dez campos microscópicos aleatórios usando a objetiva de 40X, fazendo-se a média de mastócitos por amostra. A contagem foi feita usando o programa de análise de imagem com o software da Micrometrics[®] o SE Premium.

4.3.3 Técnica da AgNOR

A técnica empregada foi a descrita por Plonton (1986), com adaptações. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em série alcoólica decrescente e lavados em água destilada e deionizada. A solução à base de nitrato de prata para uso foi constituída de uma parte da solução A (1g de gelatina incolor, 0,5 ml de ácido fórmico e 50ml de água deionizada), para duas partes da solução B (12,5g de nitrato de prata e 25 ml de água deionizada).

Para se evitar o aparecimento de precipitados de gelatina sobre as células, que pode mimetizar as NORs, deve-se filtrar a solução corante antes de colocar as lâminas para incubar. Em seguida o material foi incubado em solução contendo nitrato de prata a 60°C, em câmara úmida ao abrigo da luz por 30 minutos. Quando as amostras apresentam coloração marron-escura, retira-se da solução corante e lavando-se as lâminas em água deionizada a

45°C, para retirar o precipitado formado pela gelatina. Após este processo as lâminas foram imersas em solução de tiosulfato de sódio a 5% por 5 minutos, com a finalidade de retirar a prata reduzida depositada sobre as células. Em seguida, realizou-se o processo de desidratação e montagem das lâminas.

4.3.4 Avaliação quantitativa das NORs

A avaliação quantitativa das NORs seguiu a metodologia descrita por Lohr et al (1997), onde contou-se as NORs por núcleo em 100 células epiteliais, em dez campos microscópicos aleatórios usando-se a objetiva de 40x, fazendo-se a média das NORs por amostra, metodologia também usada por. A contagem foi feita usando o software da Micrometrics® o SE Premium.

4.4 Avaliação Imunoistoquímica

Os cortes foram ainda submetidos à técnica de imunoistoquímica, onde foram utilizados os anticorpos primários: Ki-67 (MIB-1), que permite identificar células em proliferação e anti-Caspase-3 que permite marcar células em apoptose. Vale ressaltar que amostras de controle positivo e negativo padronizadas no laboratório de imunoistoquímica do serviço de patologia veterinária da FMVZ – UNESP – Campus de Botucatu – SP, foram incubadas junto com as amostras do experimento. As amostras tanto do controle positivo como do negativo eram de linfoma canino.

4.4.1 Técnica de Coloração Imunoistoquímica

As reações imunoistoquímicas foram feitas conforme o protocolo estabelecido pelo laboratório de imunoistoquímica do serviço de patologia veterinária da FMVZ – UNESP – Campus de Botucatu – SP.

Cortes das neoplasias mamárias foram colocados em lâminas histológicas, previamente tratadas com Organosilano (A3648- Sigma Chemical CO), desparafinizados e hidratados.

Para o bloqueio da peroxidase endógena, foi utilizada solução de água oxigenada a 30 volumes diluída em metanol na proporção de 1:9, por 15 minutos. Então, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica, onde foi usado a solução tampão de citrato 10 mM, pH 6,0 em forno de microondas (potência máxima – 700 watts) por 15 minutos. O material foi resfriado até atingir a temperatura ambiente.

As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários, relacionados na Tabela 1, em câmara úmida por 18 horas a 4°C e lavadas em solução Tris-HCl (T1503- Sigma Chemical C.O.) a 10 mM. Em seguida, foram incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse (BA2000 - VECTOR) à temperatura ambiente por uma hora. O kit ABC (PK6100 – VECTOR) foi preparado 30 minutos antes do término da reação com o anticorpo secundário. Após esta etapa o material foi lavado com Tris-HCl e as lâminas foram incubadas com o kit ABC à temperatura ambiente por 30 minutos.

Para visualização da reação, os cortes foram tratados com solução de 3,3'diaminobenzidina (Liquid DAB K3466 - Dako Cytomation) durante cinco minutos; posteriormente, foram contra-corados com hematoxilina de Harris. As lâminas foram avaliadas pela intensidade da marcação imunoistoquímica. As reações foram graduadas como negativa ou positiva.

Tabela 1 –Relação de Anticorpos Primários e diluição

ANTICORPO	DILUIÇÃO	FABRICANTE
Anti-Caspase-3	1:400	Dako
Ki-67 (MIB-1)	1:50	Cell Signaling

4.4.2 Quantificação das reações imunoistoquímicas

Os índices de proliferação e apoptótico foram obtidos contando-se em cinco campos aleatórios, e fazendo-se a média das células positivas para cada amostra. Os valores médios aferidos para as contagens de células Ki-67 e caspase-3 positivas foram codificadas em escores (0: imunomarcagem negativa; +: <10% células positivas; ++: 10 a 50% de células positivas e +++: >50% de células positivas), conforme metodologia usada por Zuccari (2004).

As amostras foram analisadas utilizando software da Micrometrics[®] o SE Premium.

4.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Previamente à análise estatística, todos os grupos de dados numéricos foram submetidos ao teste de Kolmogorov e Smirnov para verificar se possuíam distribuição Gaussiana. As variáveis contagens de NORs e contagem diferencial de mastócitos foram consideradas como paramétricas. Os valores aferidos para as contagens de células Ki-67 e caspase-3 positivas foram consideradas como variáveis não paramétricas.

Para estudar-se a correlação entre as contagens das NORs e a contagem diferencial de mastócitos empregou-se a análise bivariada com cálculos dos coeficientes de correlação de Pearson. Para estudar-se a correlação entre os escores de Ki-67 e contagem diferencial de mastócitos e entre escores de caspase-3 e mastócitos empregou-se análise bivariada com cálculos dos coeficientes de correlação de postos de Spearman.

Para correlacionar os escores de contagens de células caspase-3 positivas e os parâmetros de proliferação celular (escores de contagens de células Ki-67 positivas e contagem das NORs) foram calculados os coeficientes de correlação de postos de Spearman para variáveis não-paramétricas. As médias das contagens de mastócitos/10 campos e das NORs, foram comparadas, entre os diferentes tipos de tumores pelo método de análise de variância com um fator e contrastes pelo método de Tukey. Os escores de células Ki-67 positivas e de células caspase-3 positivas, entre os diferentes tipos morfológicos de neoplasias estudadas foram comparadas pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis com contrastes pelo método de Dunn (PAGANO e GAUVREAU, 2004).

Todas as análises foram efetuadas com o software SPSS (v. 14, SPSS, Inc, Chicago). Foram considerados como significativos os valores de P menores que 0,05.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação dos dados clínico-epidemiológicos dos animais

5.1.1 Quanto ao padrão racial

Das 102 amostras analisadas a prevalência maior de neoplasia mamária ocorreu em animais sem raça definida (SRD), 37,25% (38/102) dos casos. Entre os animais com raça definida, houve maior prevalência em animais da raça Poodle com 28,43% (29/102) dos casos; seguida da raça Cocker, Fila, Fox Paulistinha, Tekel, Boxer, Pastor alemão, Dog Alemão, Pinscher e Yorkshire Terrier que apresentaram 9,95% (5/102), 3,96% (4/102), 3,96% (4/102), 2,97% (3/102), 2,97% (3/102), 1,98% (2/102), 1,98% (2/102), 1,98% (2/102) dos casos respectivamente. As raças Rottweiler, Labrador, Husky Siberiano, Pastor Belga, Doberman e Basset Hound apresentaram apenas um caso cada uma como mostra a figura 1.

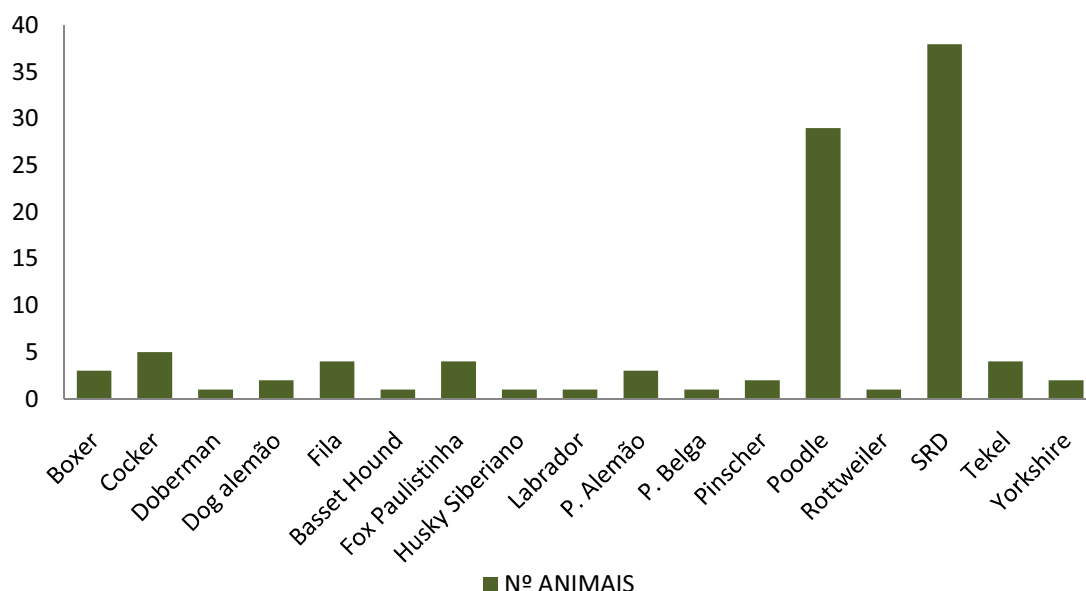


Figura 1– Distribuição racial das 102 cadelas portadoras de neoplasia mamária.

5.1.2 Idade dos animais

A idade dos animais variou de 1 a 20 anos e a média foi de 8,66 anos. O maior número de casos se concentrou na faixa entre 7 e 10 anos de idade, representando um total de (52,0%) dos casos. No restante dos animais, 23% encontravam-se na faixa entre 1 e 6 anos de idade e 25% entre 11 e 20 anos. Apenas dois animais não tiveram sua idade determinada. A figura 2 mostra a variação entre idade e números de casos.

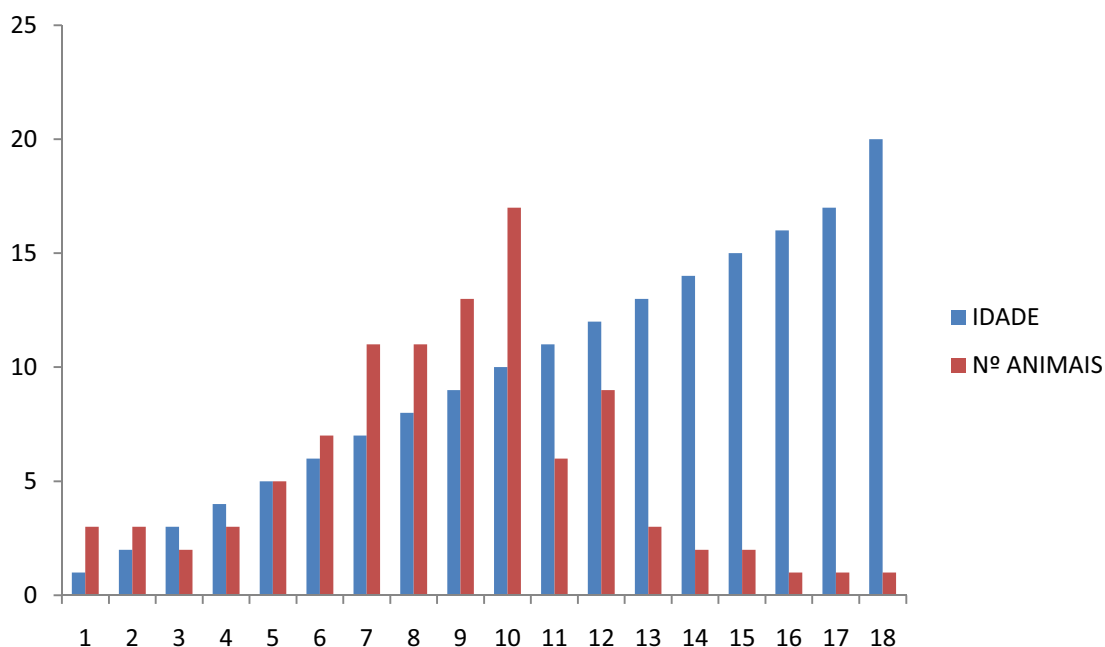


Figura 2. Idade das 102 cadelas portadoras de neoplasia mamária.

A análise da figura 2 mostra claramente que a partir de dos 12 anos de idade a incidência de neoplasia mamária diminui abruptamente.

5.1.3 Porte dos animais

Quanto ao porte dos animais, 50% (51/102) destes eram animais de porte pequeno, 29,4% (30/102) tinham porte médio e 20,5% (21/102) deles eram animais de porte grande, como mostra a figura 3.

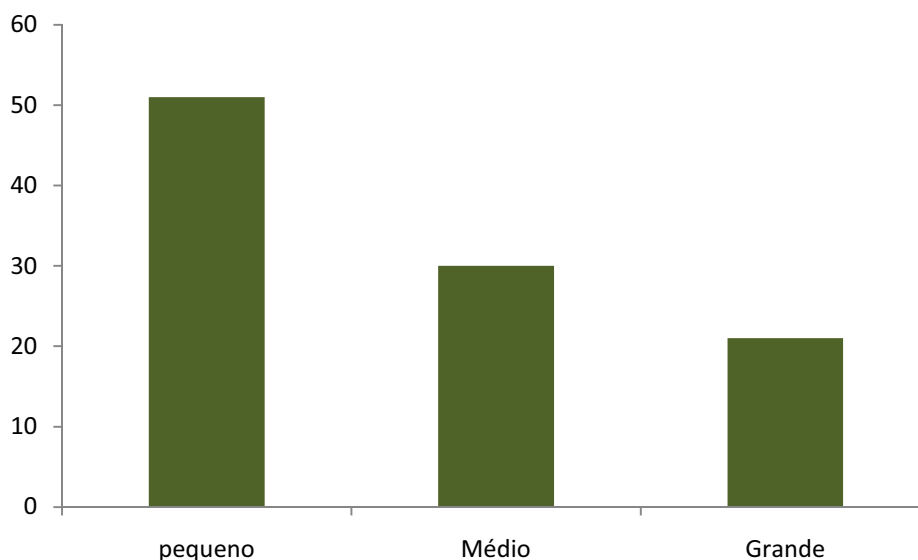


Figura 3 – Distribuição do porte das 102 cadelas com neoplasia mamária.

5.2 Avaliação histopatológica das amostras

Das 102 amostras analisadas todas foram classificadas histopatologicamente como malignas, e os tipos morfológicos encontrados foram o carcinoma *in situ* com 0,98% (1/102), carcinoma complexo com 45,09% (46/102), carcinoma simples com 35,29% (36/102), carcinossarcoma com 10,78% (11/102) e os tipos especiais de carcinomas que representaram 7,89% (08/102) dos casos. O Quadro 2 exibe estes dados.

Em relação aos carcinomas do tipo simples, estes foram subclassificados quanto ao tipo histomorfológico em: túbulo-papilífero com 24,5% (25/36), carcinoma sólido com 6,86% (07/36) e carcinoma anaplásico com 3,92% (4/36) dos casos.

Outro dado importante quanto à classificação histomorfológica é a diferenciação cartilaginosa e óssea nas neoplasias classificadas como carcinossarcoma. 27,27% (3/11) dos animais com carcinossarcoma apresentavam medula óssea ativa no foco neoplásico e os 72,72% (8/11) restantes apresentavam diferenciação cartilaginosa.

Já entre os tipos especiais de carcinomas encontrados, estes foram subclassificados em: carcinoma de células fusiformes (07/08) e carcinoma mucinoso (01/08), tendo incidência de 6,86% e 0,98% respectivamente, como mostra a figura 4.

Quadro 2 –Distribuição das neoplasias malignas conforme a classificação histopatológica

<u>Tipo de Neoplasia</u>	<u>Nº de casos</u>	<u>Prevalência (%)</u>
Carcinoma <i>in situ</i>	01	0,98
Carcinoma complexo	46	45,09
Carcinoma simples:	36	35,29
- Carcinoma túbulo-palilífero	25	24,5
- Carcinoma sólido	07	6,86
- Carcinoma anaplásico	04	3,92
Tipos especiais de carcinoma:	08	7,84
- Carcinoma de células fusiformes	07	6,86
- Carcinoma de células escamosas	00	0,0
- Carcinoma mucinoso	01	0,98
Carcinossarcoma	11	10,78

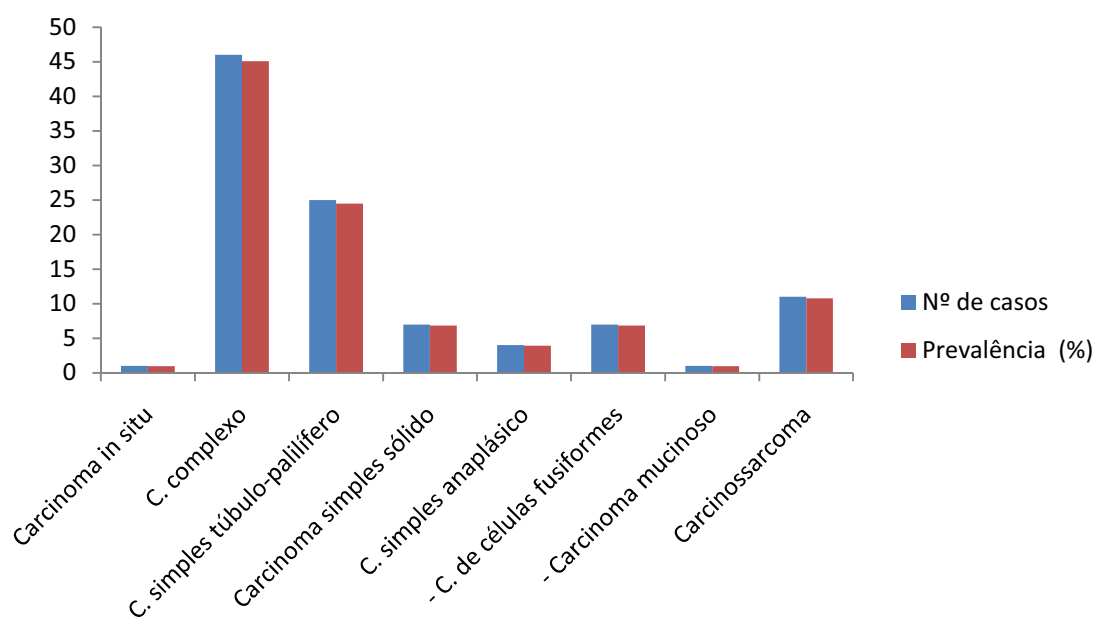


Figura 4 - Distribuição das neoplasias mamárias conforme a classificação histomorfológica nas 102 cadelas portadoras de neoplasia mamária.

As figuras de 5 a 10 exemplificam os tipos morfológicos conforme a classificação histomorfológica das neoplasias mamárias no presente estudo.

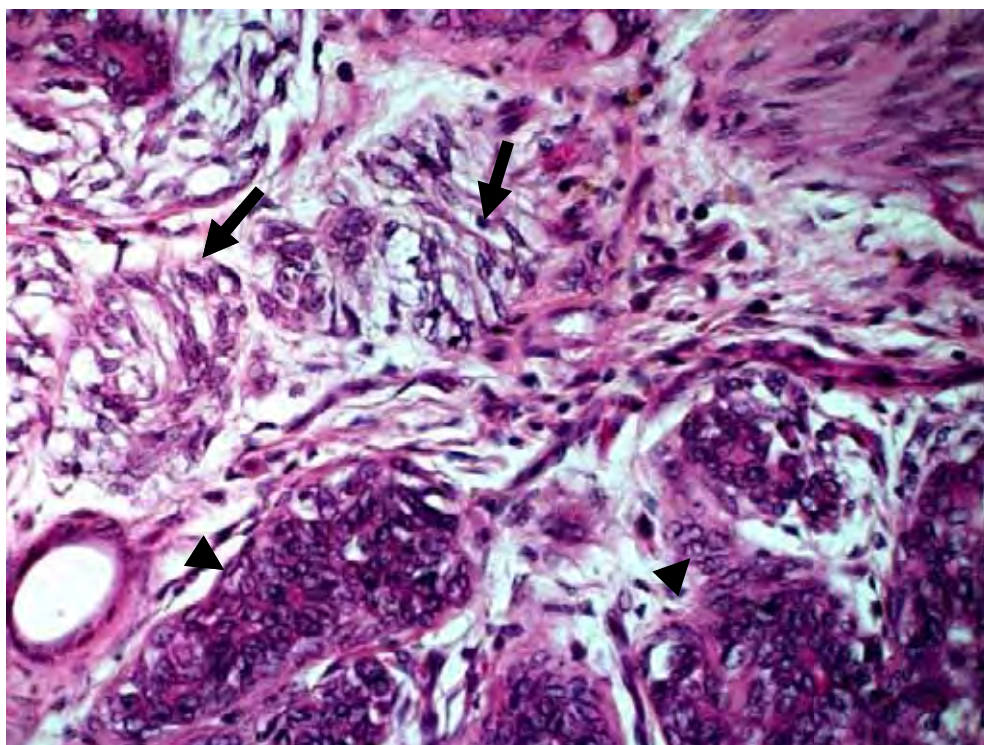


Figura 5. Fotomicrografia de carcinoma complexo, onde é visualizado componente epitelial (cabeça de seta) e o componente mioepitelial (setas) – Hx/E -40x.

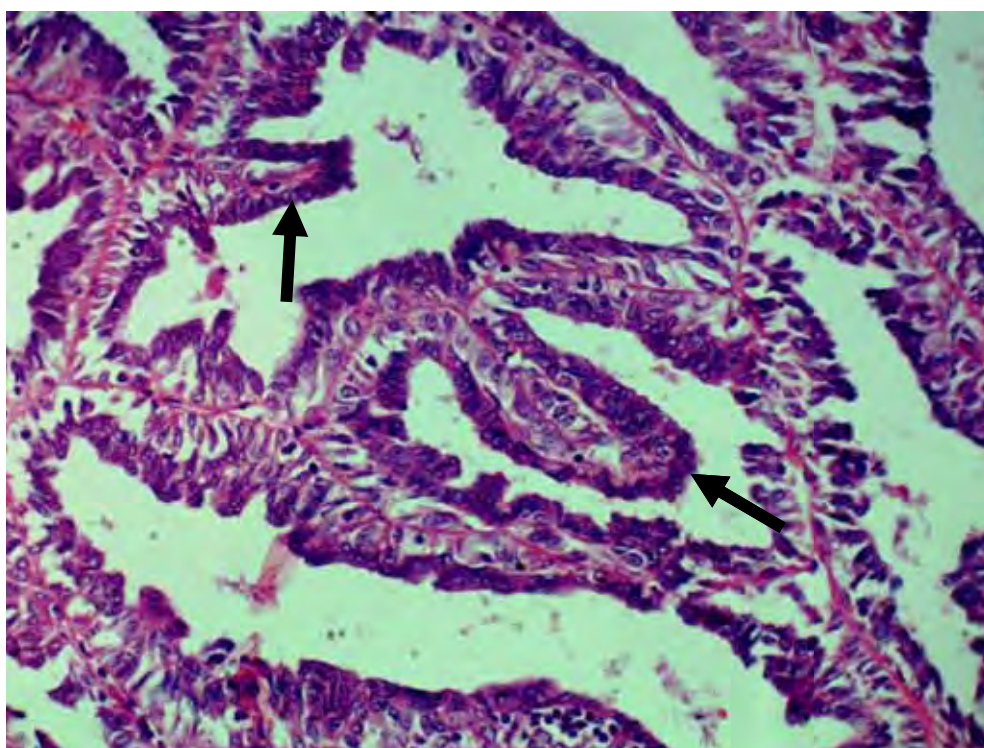


Figura 6. Fotomicrografia de carcinoma simples do tipo túbulo-papilífero, com formação marcante de papilas (setas) – Hx/E -10x.

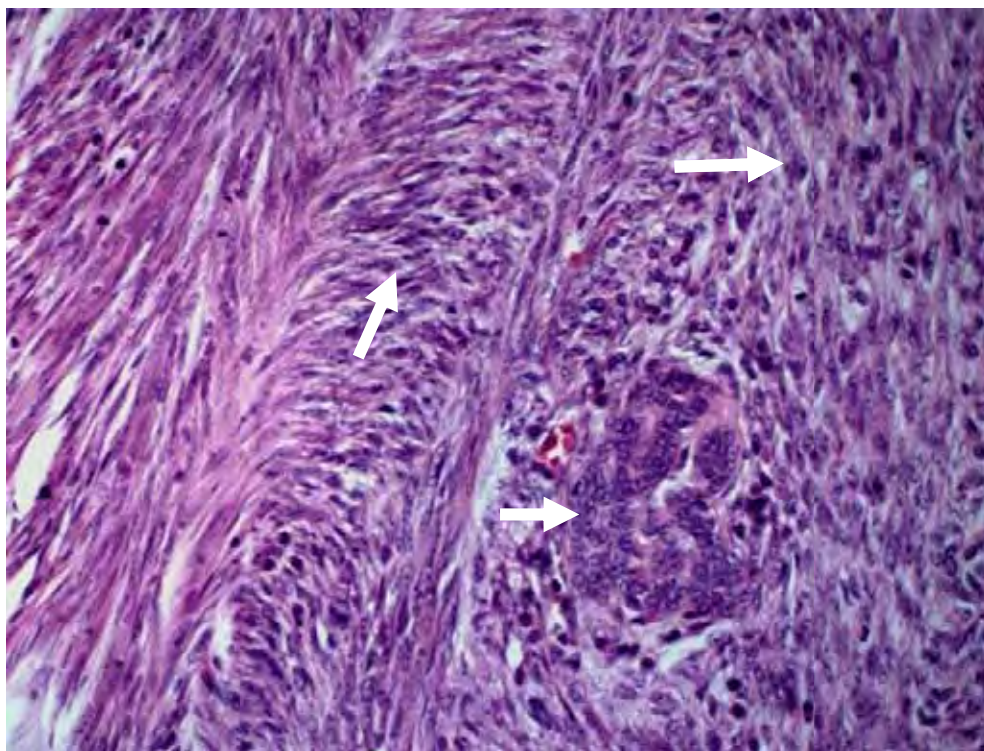


Figura 7. Fotomicrografia de carcinoma de células fusiformes, com aglomerado de células epiteliais (seta menor) e predomínio de células fusiformes (seta maior) – Hx E - 40x.

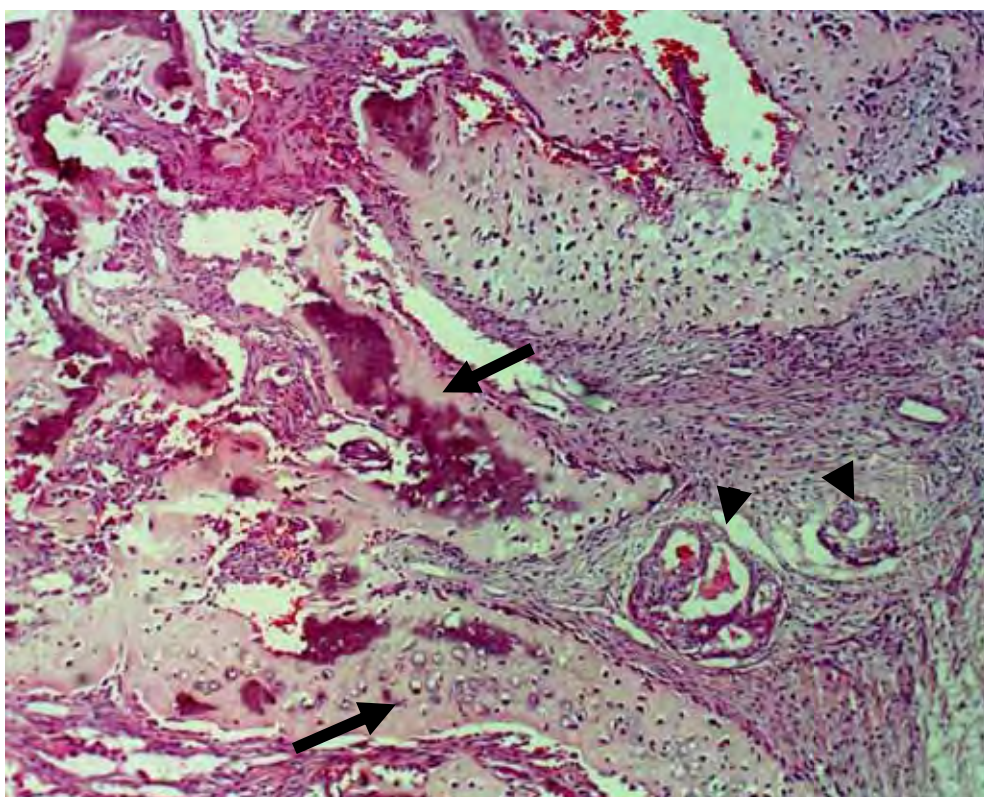


Figura 8. Fotomicrografia de carcinosarcoma, observa-se componente epitelial (cabeça de seta) e mesenquimal (setas) com diferenciação óssea e cartilaginosa – Hx E – 10x.

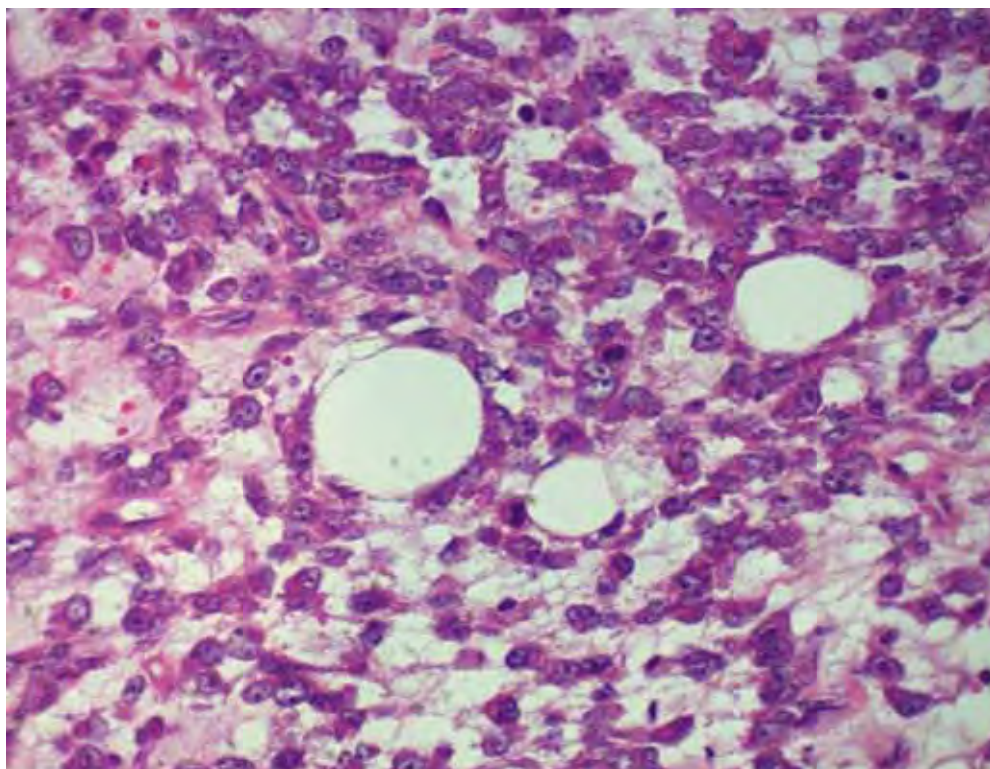


Figura 9. Fotomicrografia de carcinoma simples do tipo anaplásico, observa-se pleomorfismo acentuado e nucléolos evidentes. HxE – 40x.

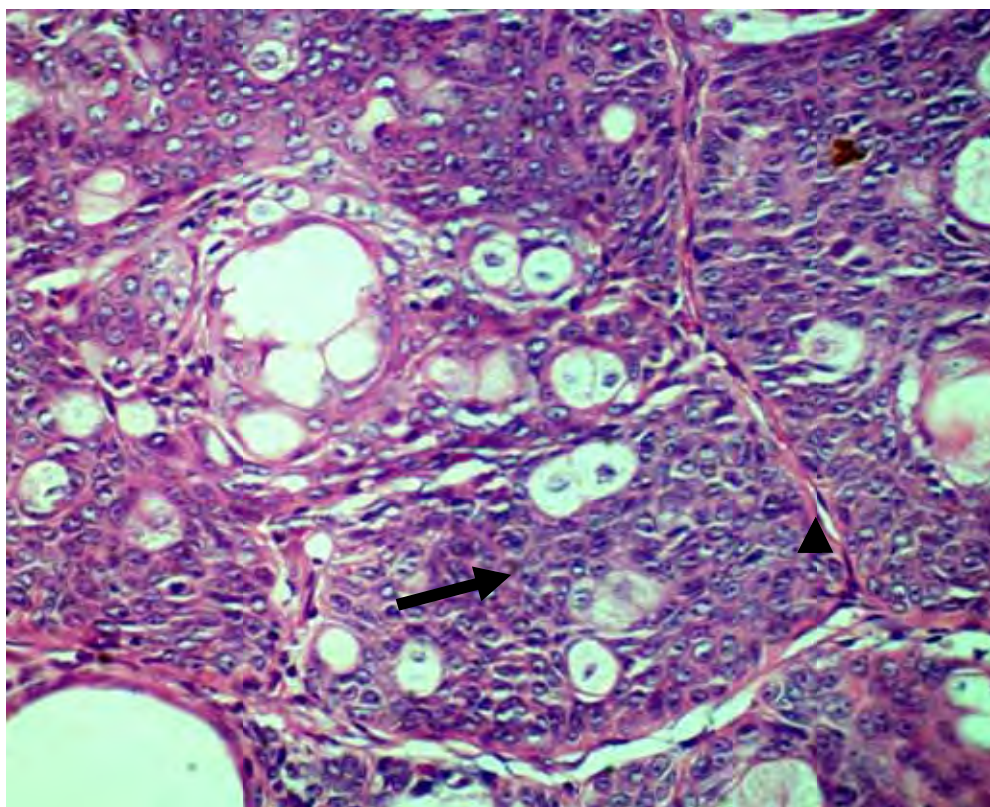


Figura 10. Fotomicrografia de corte de carcinoma simples do tipo sólido, observa-se forte coesão entre as células (seta) e delgado estroma conjuntivo (cabeça de seta) HxE – 40x.

5.3 – Avaliação histoquímica das amostras

5.3.1 – Avaliação quantitativa dos mastócitos

Das 102 amostras analisadas os mastócitos estavam presentes no foco neoplásico em 96,08% (98/102) destas. Predominavam nas áreas onde o tecido conjuntivo era abundante, principalmente ao redor dos vasos. Os mastócitos também apareceram em menor número entre as células epiteliais acinares e tubulares neoplásicas. As figuras 11 e 12 mostram o infiltrado de mastócitos no foco neoplásico.

O infiltrado de mastócitos apresentou variação de acordo com o tipo histomorfológico da neoplasia. A neoplasia que apresentou o maior número médio de mastócitos foi o carcinoma simples do tipo túbulopapilífero, seguido pelo carcinoma complexo, carcinosarcoma, carcinoma simples do tipo anaplásico, carcinoma simples do tipo sólido e pelo carcinoma de células fusiformes, como mostra a tabela 2.

Tabela 2 – Média e respectivo desvio-padrão da contagem de mastócitos e NORs conforme o tipo histomorfológico da neoplasia.

<u>Tipo de neoplasia</u>	<u>n</u>	<u>Mastócitos</u>	<u>NORs</u>
C. simples túbulo-papilar	25	6,65a ± 7,19	4,26a ± 1,35
C. complexo	46	4,98a ± 4,37	4,07a ± 1,64
Carcinosarcoma	11	4,90a ± 4,917	3,39a ± 1,55
C. simples anaplásico	04	4,25a ± 4,22	4,56a ± 0,51
C. simples sólido	07	3,34a ± 3,53	5,36a ± 1,65
C. Células fusiformes	07	2,55a ± 1,49	4,56a ± 1,74

c.= carcinoma

Obs: valores presentes na mesma coluna seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente.

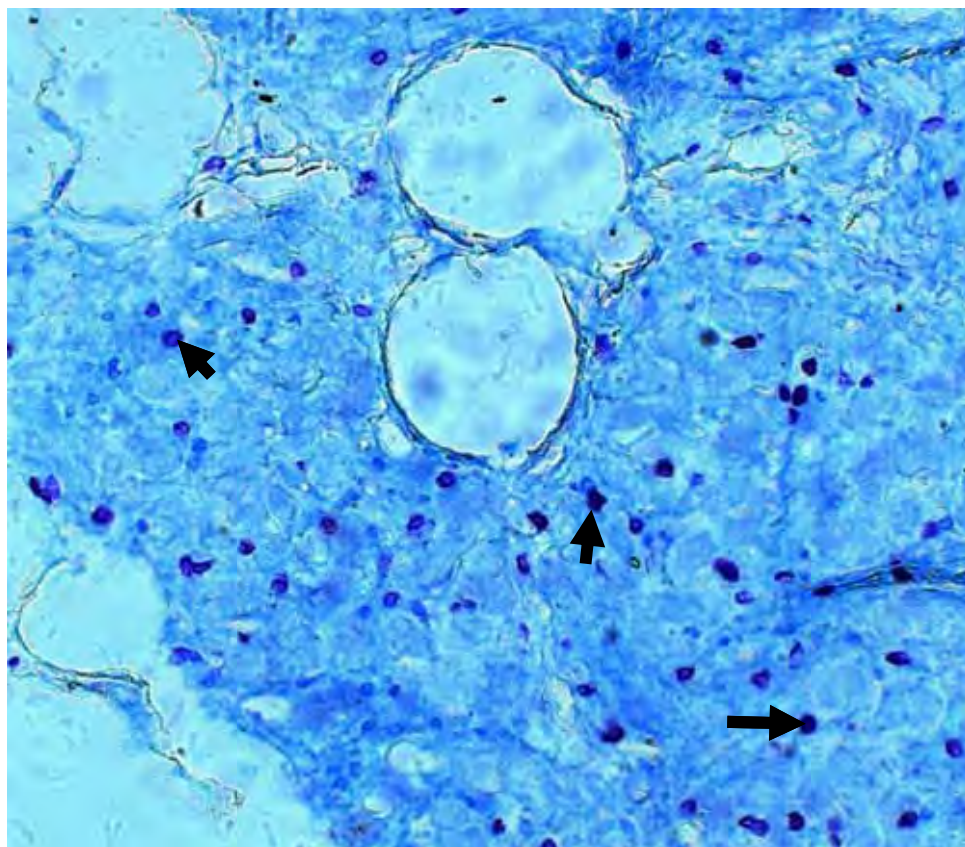


Figura 11 – Fotomicrografia de carcinoma simples do tipo túbulo papilífero, observa-se infiltrado marcante de mastócitos (setas) – Azul de toluidina, 40x.

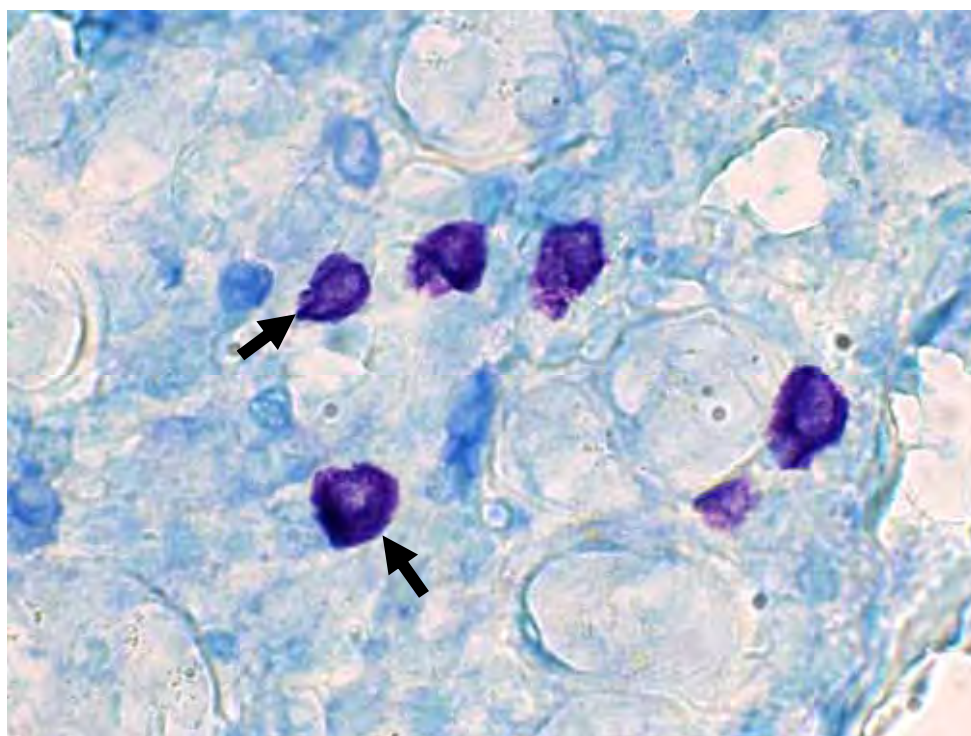


Figura 12 – Fotomicrografia de carcinoma simples do tipo túbulo papilífero, observa-se mastócitos (setas) – Azul de toluidina, 100x.

5.3.2 Avaliação quantitativa das NORs

A média das NORs entre os diversos padrões morfológicos de neoplasia mamária mostrou pouca variação. O carcinoma simples do tipo sólido foi o que apresentou a maior média, seguido do carcinoma simples do tipo anaplásico, carcinoma de células fusiformes, carcinoma simples do tipo túbulopapilífero, carcinoma complexo e do carcinosarcoma, como é demonstrado na tabela 2. As figuras 13 e 14 exemplificam a marcação das NORs.

5.4 Avaliação imunoistoquímica das amostras

5.4.1 Avaliação do índice de proliferação (Ki-67 – MIB 1)

Quanto a imunomarcação das amostras pelo Ki-67 (MIB-1), verificou-se que 99% (101/102) das amostras apresentaram marcação positiva. O índice de proliferação variou do escore (0) ausência de imunomarcação em 0,98% (1/102), escore (+) menos de 10% células com marcação positiva em 16,7% (17/102), escore (++) entre 10 a 50% células com marcação positiva em 62,7% (64/102) e escore (+++) onde mais de 50% das células apresentaram marcação positiva em 19,6% (20/102). As figuras 17 a 22 demonstram a imunomarcação e o controle negativo e positivo para o anticorpo anti-Ki 67.

No carcinoma complexo apenas 2% (2/46) das amostras não apresentaram expressão do Ki-67, contudo, 15,3% (16/46) das amostras revelaram índice de proliferação com escore (+), 65,3% (30/46) das amostras apresentaram índice de proliferação com escore (++) e 17,4% das amostras revelaram índice de proliferação com escore (+++).

O carcinoma simples túbulo-papilífero apresentou imunomarcação com escore (+) em 24% das amostras, escore (++) em 68% e escore (+++) em 8% das amostras. O carcinoma simples sólido apresentou imunomarcação com escore (+) em 14,3% das amostras, escore (++) em 71,4% e escore (+++) em 14,3% das amostras. Já o carcinoma simples anaplásico apresentou imunomarcação com escore (++) em 75% e escore (+++) em 25% das amostras.

No carcinoma de células fusiformes mostraram imunomarcação de escore (++) e (+++) em 57,1 e 42,9% das amostras respectivamente.

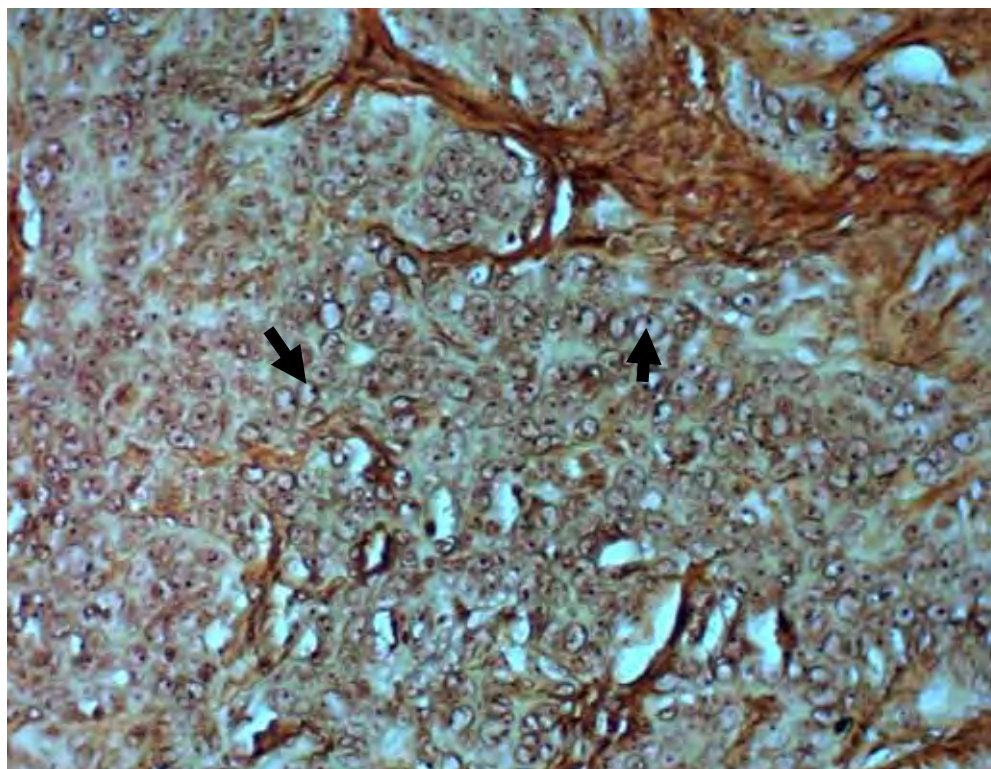


Figura 13 – Fotomicrografia de carcinoma complexo, corado pela técnica da AgNOR e contracorado com verde luz. Observar as NORs (setas), AgNOR-40x

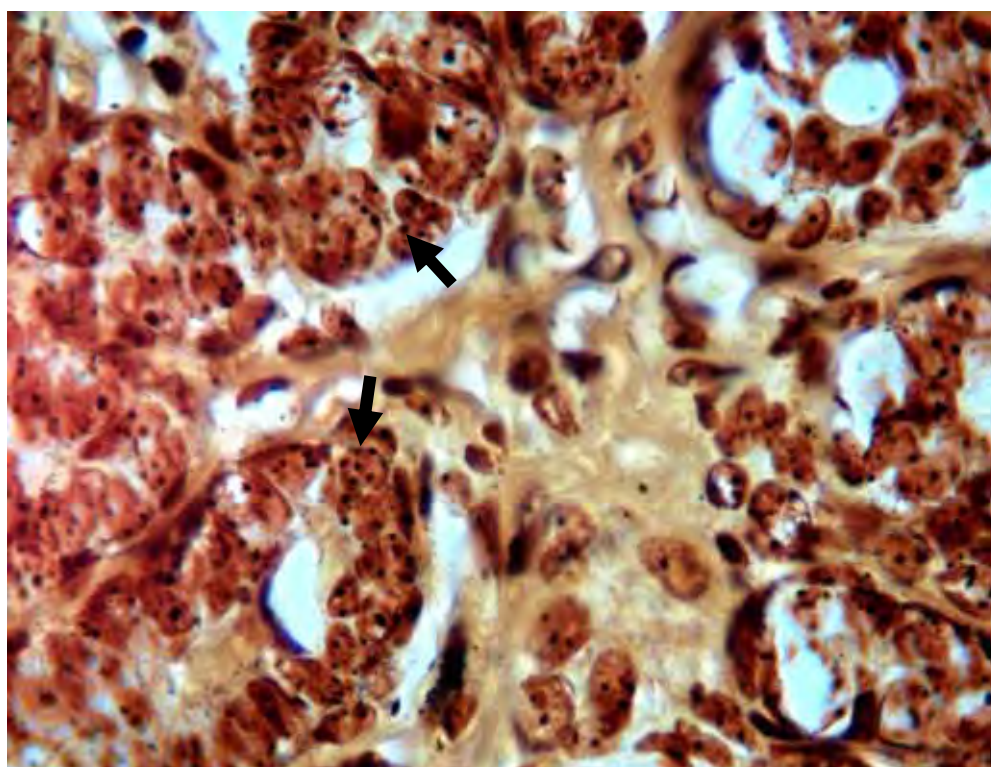


Figura 14 – Fotomicrografia de carcinosarcoma, observar as NORs como pontos negros (setas), corado pela técnica da AgNOR e contracorado com verde luz, 100x.

Nos carcinossarcomas 9% das amostras não apresentaram imunomarcção positiva, imunomarcção com escore (+) em 36,4%; escore (++) em 27,3% e escore (+++) em 27,3% das amostras respectivamente, como mostra a tabela 3.

Tabela 3 - Frequência (%) do índice de proliferação (Ki-67) conforme a classificação histomorfológica da neoplasia.

Tipo de Neoplasia	<u>Ki-67</u>			
	(0)	(+)	(++)	(+++)
C. complexo	2	15,3	65,3	17,4
C. simples túbulo-palilífero	0	24	68	8
Carcinoma simples sólido	0	14,3	71,4	14,3
C. simples anaplásico	0	0	75	25
C. de células fusiformes	0	0	57,1	42,9
Carcinossarcoma	9	36,4	27,3	27,3

C.= carcinoma

Quando se fizemos a análise gráfica da expressão do Ki-67 dos diferentes tipos neoplasias conforme a classificação da WHO, foi possível observar que a imunomarcção do Ki-67 aumenta conforme aumenta o grau de malignidade destas. A imunomarcção do Ki-67 conforme o grau de malignidade, evidencia que a maioria das amostra revelam escore (++) com 10 a 50% e escore (+++) onde mais de 50% das células eram positivas, como é observado no figura 15.

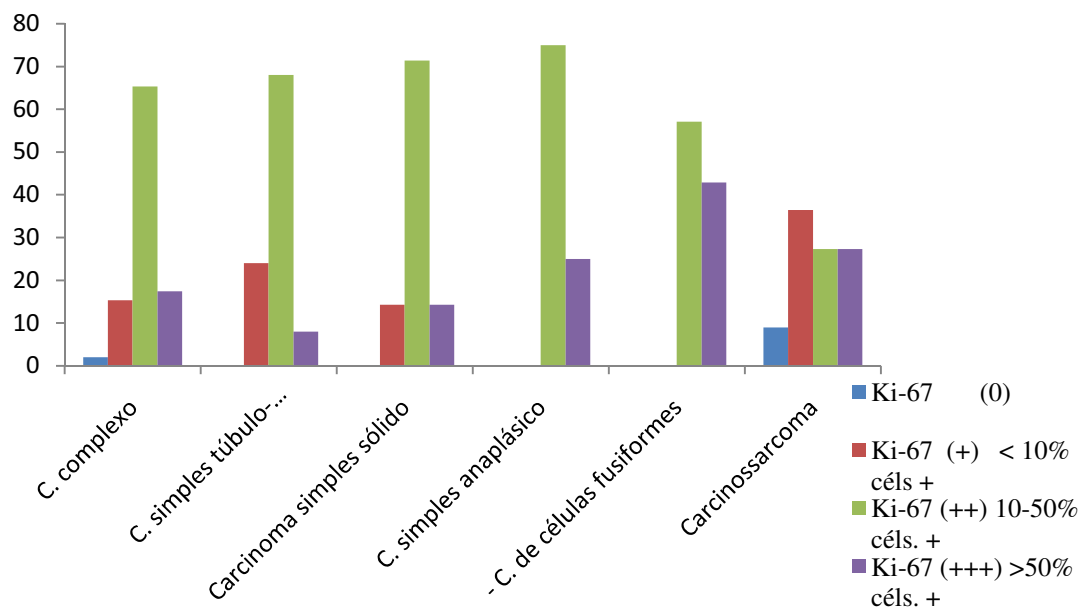


Figura 15 – Prevalência dos escores de imunomarcacão de Ki-67 conforme a classificação histopatológica das neoplasias mamárias.

5.4.2 – **Avaliação do índice apoptótico (caspase 3)**

A imunomarcacão da caspase-3 das amostras revela marcação positiva em 95% (97/102) destas. As amostras apresentaram índice apoptótico variável entre os diversos tipos morfológicos.

No carcinoma complexo apenas 4,3% das amostras não apresentaram expressão da caspase-3, contudo, 26,1% das amostras revelaram escore (+), 63,1% escore (++) e 6,5% das amostras revelaram índice apoptótico com escore (+++).

No carcinoma simples túbulo-papilífero 8% das amostras não apresentaram expressão da caspase-3, 12% com escore (+), 76% com escore (++) e 4% das amostras apresentaram escore (+++). O carcinoma simples sólido apresentou imunomarcacão da caspase-3 com escore (+) em 42,9% das amostras e escore (++) em 57,1% das amostras. Já o carcinoma simples anaplásico apresentou imunomarcacão da caspase-3 com escore (++) em 75% e escore (+++) em 25% das amostras. As figuras 23 e 24 demonstram a imunomarcacão pelo anticorpo anti caspase-3.

No carcinoma de células fusiformes a imunocarcção para caspase-3 mostrou escore de (++) e (+++) em 28,6 (29/102) e 71,4% (71/102) das amostras respectivamente.

Nos carcinossarcomas 9,1% (10/102) das amostras não apresentaram imunomarcção para caspase-3; 63,6% (64/102) tiveram escore (+) e 27,3% (28/102) das amostras mostraram escore (++) respectivamente, como mostra a tabela 4.

Tabela 4 - Mostra a frequência (%) do índice apoptótico (Caspase-3) conforme a classificação histopatológica da neoplasia.

Tipo de Neoplasia	<u>Caspase3</u>			
	(0)	(+)	(++)	(+++)
C. complexo	4,3	26,1	63,1	6,5
C. simples túbulo-palilífero	8	12	76	4
Carcinoma simples sólido	0	42,9	57,1	0
C. simples anaplásico	0	0	75	25
C. de células fusiformes	0	28,6	71,4	0
Carcinossarcoma	9,1	63,6	27,3	0

C.= carcinoma

A análise gráfica da expressão da caspase-3 nos diferentes tipos neoplasias conforme a classificação da WHO, mostra que não há uma expressão crescente da caspase-3 conforme aumenta o grau de malignidade, apesar de 50% ou mais das amostras revelarem escore (++) com 10 a 50% de células positivas e escore (+++) com mais de 50% das células positivas, como é observado no figura 16.

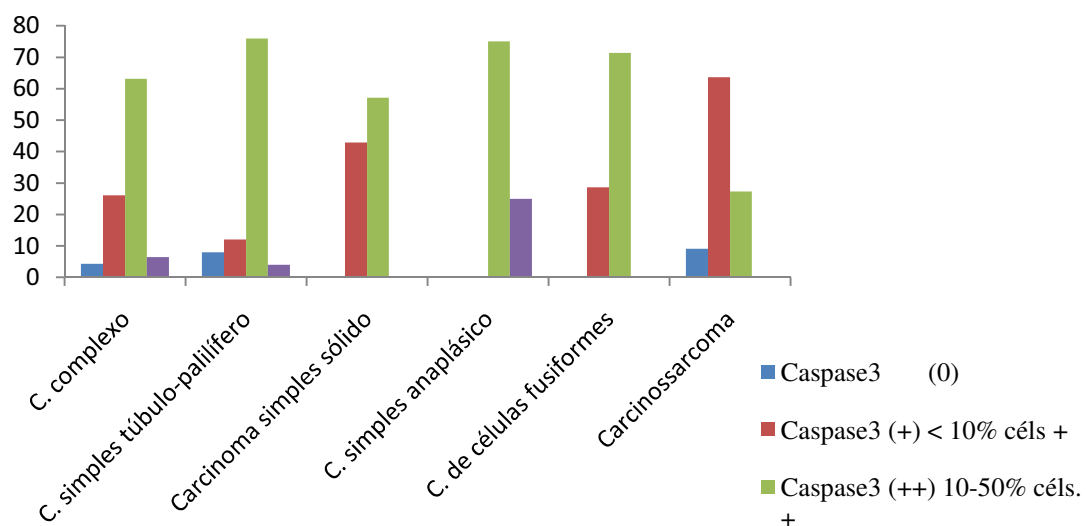


Figura 16 – Prevalência dos escores de imunomarcacão de caspase-3 conforme a classificacão histopatológica das neoplasias mamárias.

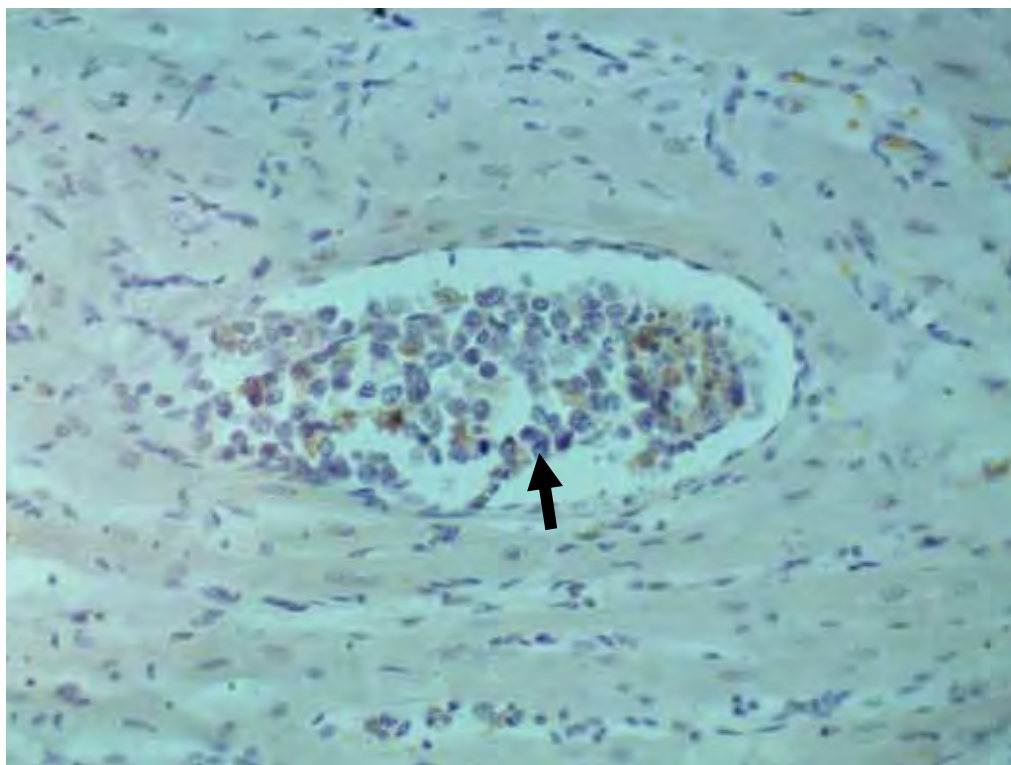


Figura 17 – Fotomicrografia de coloração imunoistoquímica controle negativo, ausência do anticorpo primário anti-Ki-67, DAB, contracorado com Hematoxilina 100x.

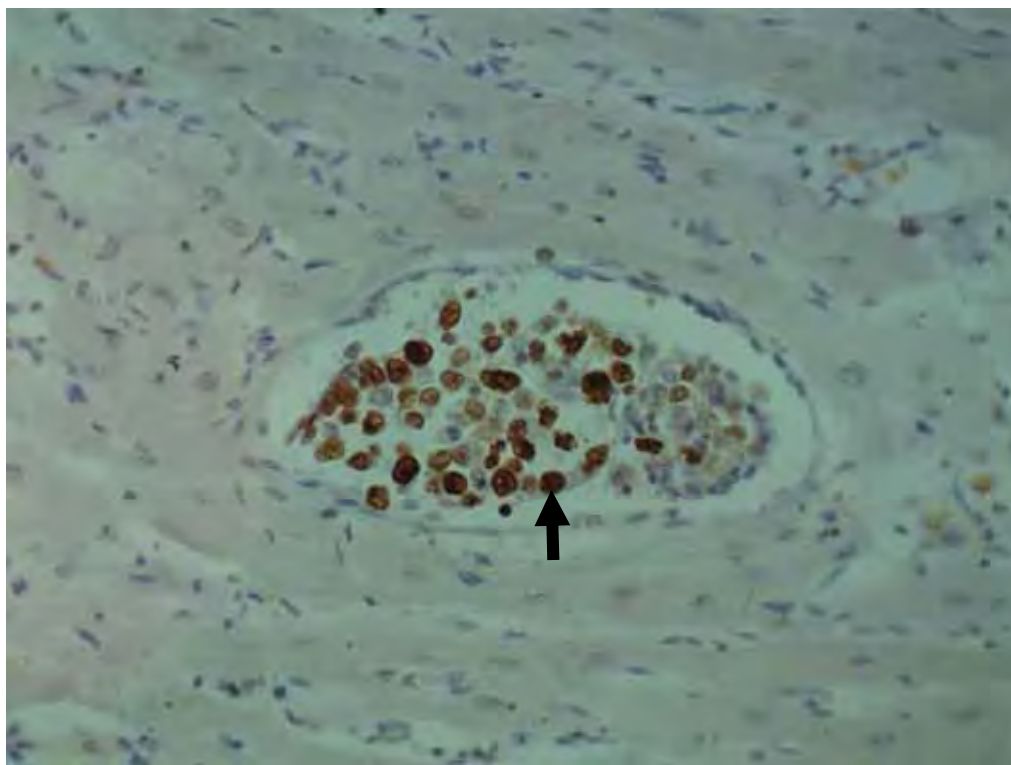


Figura 18 – Fotomicrografia de coloração imunoistoquímica controle positivo (seta), anticorpo primário anti-Ki-67, DAB, contracorado com Hematoxilina 100x.

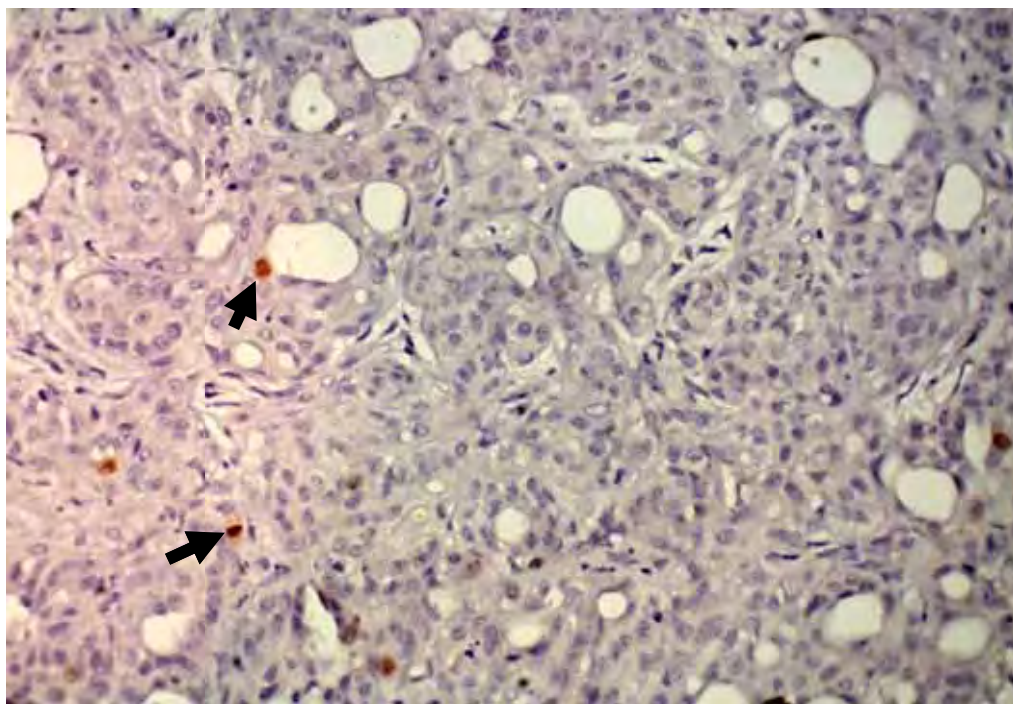


Figura 19 - Fotomicrografia de coloração imunoistoquímica mostrando marcação (setas) de escore (+), anticorpo primário anti-Ki-67, DAB, contracorado com Hematoxilina, 100x.

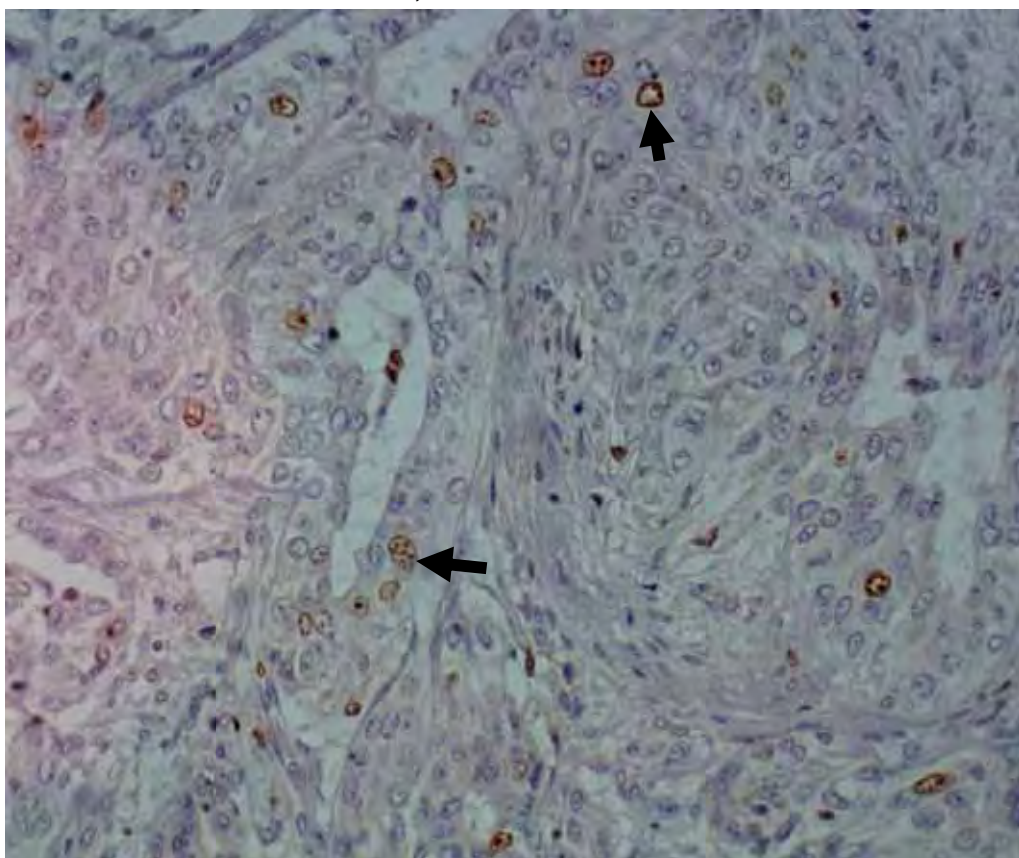


Figura 20 - Fotomicrografia de coloração imunoistoquímica mostrando marcação (setas) de escore (++), anticorpo primário anti-Ki-67, DAB, contracorado com Hematoxilina, 100x.

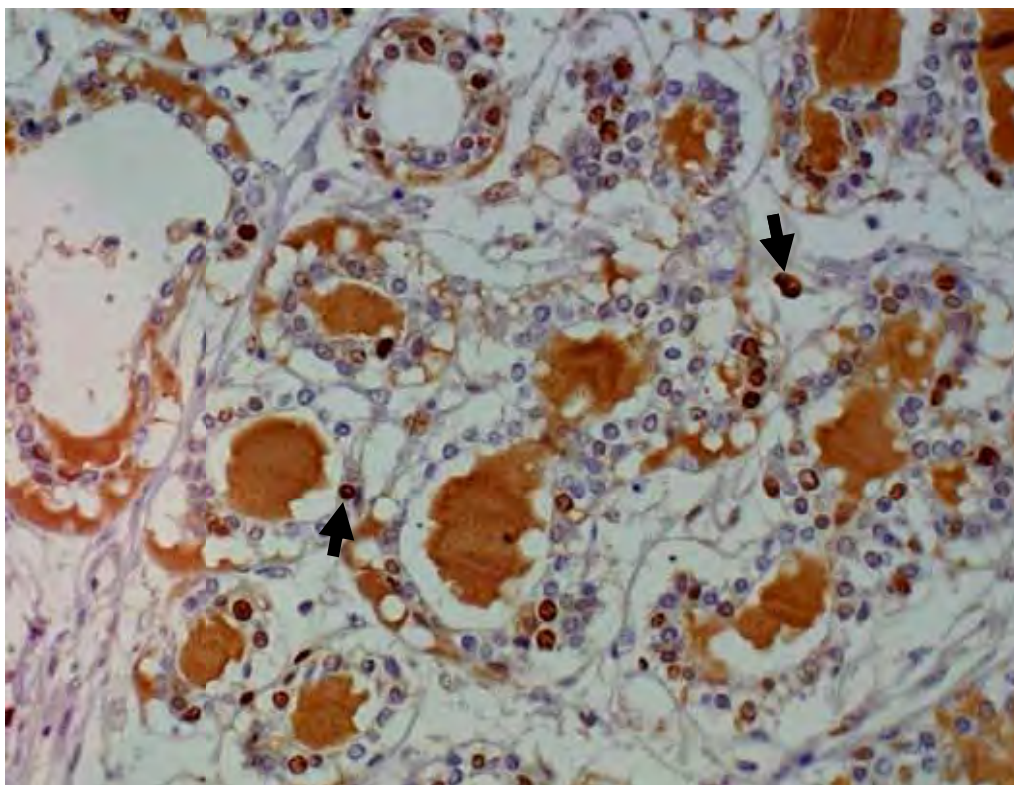


Figura 21 - Fotomicrografia de coloração imunoistoquímica mostrando marcação (setas) de escore (++), anticorpo primário anti-Ki-67, DAB, contracorado com Hematoxilina 100x.

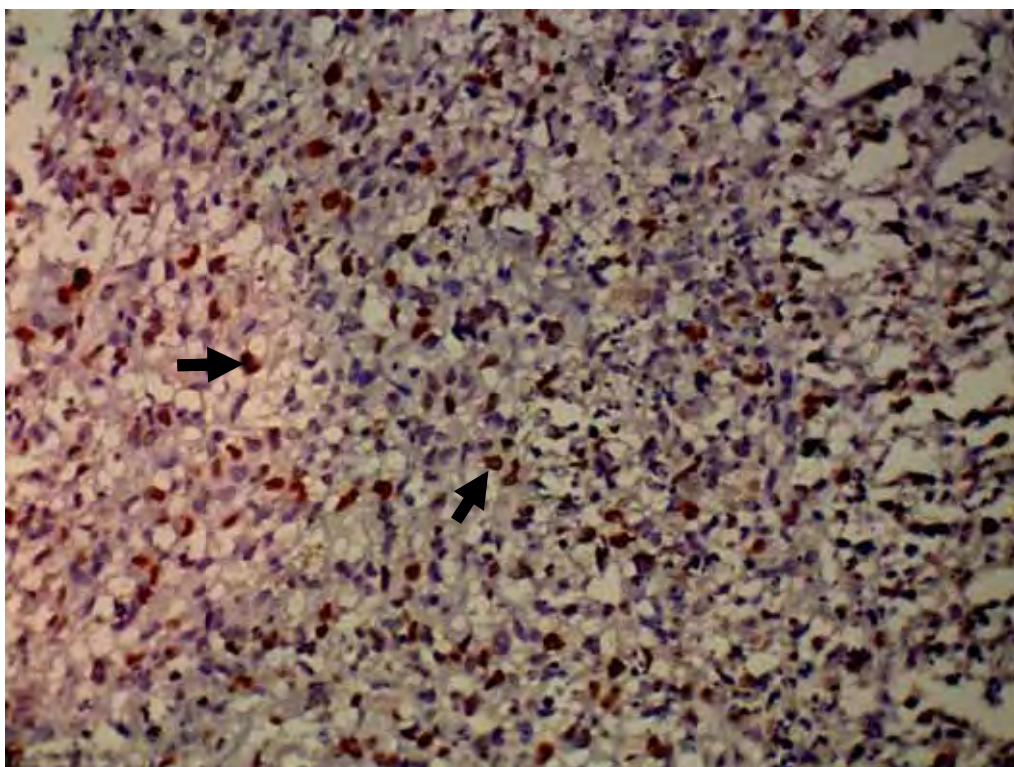


Figura 22 - Fotomicrografia de coloração imunoistoquímica mostrando marcação (setas) de escore (+++), anticorpo primário anti-Ki-67, DAB, contracorado com Hematoxilina 100x.

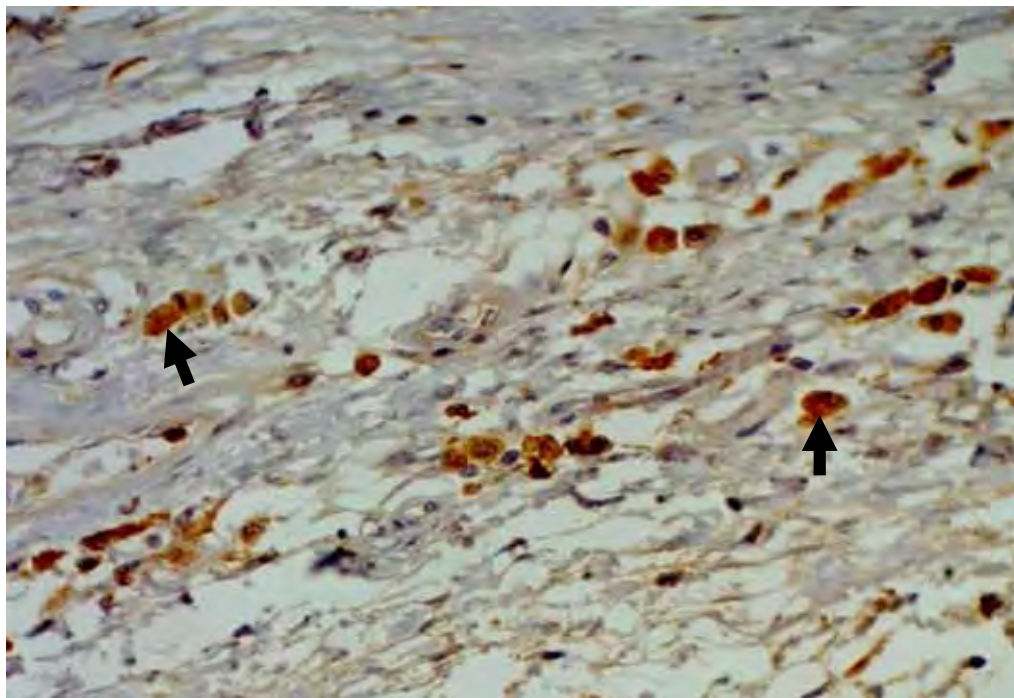


Figura 23 - Fotomicrografia de carcinoma de células fusiformes, coloração imunoistoquímica mostrando marcação (setas) de escore (++), anticorpo primário anti-caspase-3, DAB, contracorado com Hematoxilina 100x.

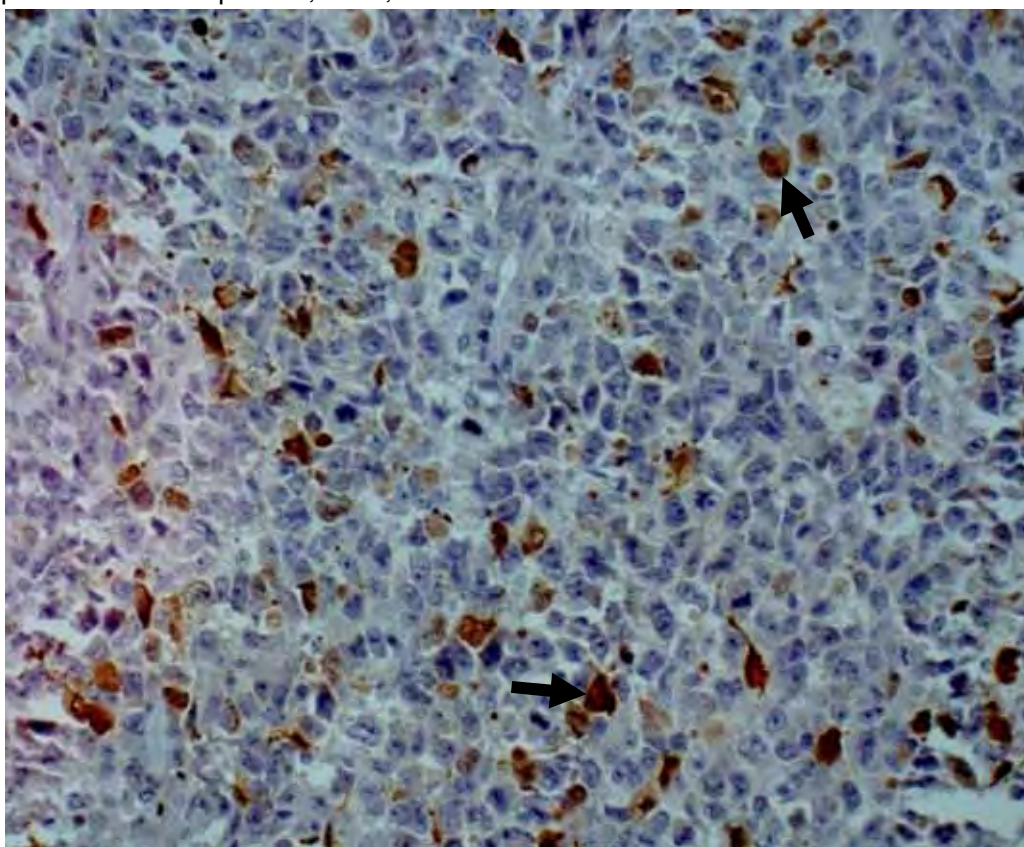


Figura 24 - Fotomicrografia de carcinoma simples anaplásico, coloração imunoistoquímica mostrando marcação (setas) de escore (+++), anticorpo primário anti-caspase-3, DAB, contracorado com Hematoxilina 100x.

5.5 Correlação entre a contagem diferencial de mastócitos e os parâmetros de proliferação e morte celular

Quanto à média de mastócitos e NORs nos diferentes tipos morfológicos de neoplasias mamárias, se observou que não houve diferença estatística significativa, como mostra tabela 4.

Os valores dos coeficientes de correlação de Pearson para as variáveis contagem diferencial de mastócitos (MAST) e número das regiões organizadoras de nucléolos (NORs) e seus respectivos valores de significância estão descritos na tabela 5.

Tabela 5 - Coeficientes de correlação de Pearson (r) e valores de significância (p) para as variáveis MAST e NOR+, segundo a classificação da neoplasia, Presidente Prudente, 2010.

Tipo de neoplasia	r	p
C. complexo	0,210	0,161
C. simples túbulo-papilífero	0,146	0,486
C. simples anaplásico	-0,030	0,970
C. simples sólido	0,192	0,680
C. células fusiformes	-0,709	0,075
Carcinossarcoma	0,178	0,610

c.= carcinoma

Não foram observadas correlações significativas entre os números de mastócitos e NORs, considerando todas as neoplasias. Entretanto, no carcinoma de células fusiformes foi observada uma tendência à significância ($p= 0,075$), porém observando correlação negativa. Ou seja, o modelo mostra

que há uma tendência a indicar que quanto maior o número de NORs menor é o número de mastócitos.

Os valores dos coeficientes de correlação de postos de Spearman para as variáveis MAST e contagem de células Ki-67 (Ki-67) e para as variáveis MAST e contagem de células caspase-3 positivas (CASP-3 +) estão descritos na tabela 6, conjuntamente com os respectivos valores de significância.

Tabela 6- Coeficientes de correlação de postos de Spearman (r_s) e valores de significância (p) para as variáveis MAST, KI-67+ e CASP-3+, segundo a classificação do tumor, Presidente Prudente, 2010.

Tipo de Neoplasia		r_s (p)	
C. complexo		Ki-67+	CASP-3+
	MAST	0,339 (0,021)	0,000 (0,998)
C. simples túbulo-papilífero		Ki-67+	CASP-3+
	MAST	0,110 (0,601)	-0,033 (0,876)
C. simples anaplásico		Ki-67+	CASP-3+
	MAST	0,775 (0,225)	-0,258 (0,742)
C. simples sólido		Ki-67+	CASP-3+
	MAST	0,000 (1,000)	0,073 (0,877)
C. células fusiformes		Ki-67+	CASP-3+
	MAST	0,144 (0,758)	0,316 (0,390)
Carcinossarcoma		Ki-67+	CASP-3+
	MAST	0,066 (0,846)	-0,043 (0,901)

c.= carcinoma

Quanto à influência dos mastócitos na proliferação das células neoplásicas, foi observada correlação significativa positiva entre o número de mastócitos e o índice de proliferação (Ki-67) ($p < 0,05$) para o carcinoma complexo. Entretanto, nos demais tipos de neoplasias não foram observados correlações significativas.

Quanto à influência dos mastócitos no índice de apoptose das células neoplásicas, não foram observadas correlações significativas e entre o número de mastócitos e o índice apoptótico (caspase-3) para todas as neoplasias estudadas.

5.6. Correlação entre as contagens de células caspase-3-positivas e os parâmetros de proliferação celular (NORs e Ki-67)

Os valores dos coeficientes de correlação de postos de Spearman para as variáveis CASP-3, NORs e Ki67 estão descritos na tabela 7, conjuntamente com os respectivos valores de significância.

Tabela 7- Coeficientes de correlação de postos de Spearman (r_s) e valores de significância (p) para as variáveis CASP-3+, NOR+ e Ki67+, segundo a classificação do tumor, Presidente Prudente, 2010.

Tumor		r_s (p)	
C. complexo		NOR+	Ki67+
	CASP-3+	0,022 (0,882)	-0,002 (0,989)
C. simples túbulo-papilífero		NOR+	Ki67+
	CASP-3+	0,090 (0,669)	-0,075 (0,722)
C. simples anaplásico		NOR+	Ki67+
	CASP-3+	-0,258 (0,742)	-0,333 (0,667)
C. simples sólido		NOR+	Ki67+
	CASP-3+	0,000 (1,000)	0,540 (0,211)
C. células fusiformes		NOR+	Ki67+
	CASP-3+	-0,791 (0,034)	0,548 (0,203)
Carcinossarcoma		NOR+	Ki67+
	CASP-3+	-0,341 (0,305)	-0,044 (0,897)

c.= carcinoma

A análise de correlação entre morte e proliferação celular, mostrou correlação significativa negativa nos carcinomas de células fusiformes, entre o índice apoptótico (Caspase-3) e o índice de proliferação (NORs). Ou seja, no

carcinoma de células fusiformes quando se tem aumento do número das NORs é observado diminuição do índice apoptótico.

A mesma análise não mostrou correlações significativas entre o índice apoptótico e os índices de proliferação estudados (Ki-67 e NOR) nas outras neoplasias.

5.7. Comparação dos escores e medianas de escores entre os diferentes tipos de Neoplasias

Na tabela 8 são descritas as medianas e os valores mínimos e máximos dos escores de contagem de células Ki-67 positivas e Caspase-3 positivas.

Tabela 8- Medianas (med), e valores mínimos (v. mín) e máximos (v. máx.) dos escores de contagens de células Ki-67 positivas (Ki-67+) e Caspase-3 positivas (CASP-3+) para os tumores pesquisados, Presidente Prudente, 2010.

Tumor	n. pontos NORs	Ki-67+			CASP-3+		
		med	v. mín.	v. máx.	med	v. Max	v. min.
C. complexo	46	2a	0	3	2ab	0	3
C. simples túbulo-papilífero	25	2a	1	3	2ab	0	3
C. simples anaplásico	4	2a	2	3	2a	2	3
C. simples sólido	7	2a	1	3	2ab	1	2
C. células fusiformes	7	2a	2	3	2ab	1	2
Carcinossarcoma	11	2a	0	3	1b	0	2

c.= carcinoma

Obs: valores de medianas presentes na mesma coluna seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente.

A análise dos valores de escores e medianas de escores só mostrou diferença entre o carcinoma simples anaplásico e o carcinossarcoma para o parâmetro índice apoptótico (Caspase-3). Porém não se observou diferenças entre o índice de morte para os demais tumores, assim como para o índice de proliferação.

Isto mostra que no carcinoma anaplásico há maior número de células entrando em apoptose do que no carcinossarcoma.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1 – Avaliação dos dados clínico-epidemiológicos dos animais

6.1.1 – Padrão racial

Frye et al. (1967) e Howard e Nielssen (1965) afirmaram que há um alto risco de desenvolvimento de neoplasia mamária em animais da raça Tekel e Pointer, e menor risco para animais da raça Boxer e Collie. Entretanto, os animais da raça Tekel e boxer representaram 3,96% (4/102) e 2,97% (3/102) dos casos respectivamente no presente estudo.

Peleteiro (1994), afirma que animais de raças puras apresentam maior suscetibilidade para desenvolverem neoplasia mamária. Em outro estudo Loar (1992), relata que animais das raças Cocker Spainel, Cocker, Fox e Bonton Terrier possuem maior predisposição para o desenvolvimento de neoplasia mamária.

Galera et al. (2002) estudando 19 casos de neoplasias mamárias, constatou que os cães SRD representaram 47,36% dos casos, seguido dos animais da raça Pinscher e Cocker Spainel.

Semelhante ao que é descrito por Galera (2002), e ao contrário do que afirma Peleteiro (1994), constatou-se que os animais SRD apresentaram a maior prevalência de casos de neoplasia mamária. Entre os animais de raça pura que apresentaram maior incidência foi a Poodle, o que foi comprovado também por Priester e Mckay (1980), Gottwald (1998) e Zatloukal (2005).

A incidência elevada de casos de neoplasias em cadelas SRD no presente estudo, deve-se ao fato de que as amostras são oriundas do arquivo do Hospital Veterinário, que atende um público de baixo poder aquisitivo.

6.1.2 – Idade dos animais

Neoplasias mamárias em cães raramente ocorrem em animais com menos de 4 ou 5 anos de idade Priester e Mckay (1980), Ferguson (1985), Gottwald (1998) e Zatloukal (2005)

Vários autores relataram que a idade média dos animais com neoplasia mamária em torno de 9 anos. Galera et al. (2002) constatou que a idade média das cadelas com neoplasia de mama era de 9,9 anos, Lohr (1997) relata a média de 9,05 anos e Peña et al (1998) relatou-se em seu estudo que os animais com neoplasia de mama tinham entre 5 e 13 anos, e a idade média era de 9,9 anos. Já Hataka (2004) afirma que a média de idade é de 9,5 anos.

O presente estudo constatou que os animais apresentaram uma ampla faixa de idade, variando de 1 a 20 anos. Diferente de outros autores, que relatam que é raro a neoplasia de mama em animais jovens, o presente estudo encontrou 16% (16/102) dos casos, com idade entre 1 e 5 anos. Contudo, o maior número dos casos se concentrou nos animais que tinham entre 7 e 10 anos de idade, representando um total de 52,0% dos casos.

O número de casos aumenta com a idade, sendo que animais com 6 anos tem incidência de 1%, animais com idade de até 8 anos possuem incidência de 6% e animais com até 10 anos possuem incidência de 13% (EGENVALL, 2005).

O aumento abrupto na incidência a partir dos seis anos de idade foi verificado no presente estudo, concordando com os achados de Jones et al. (2000).

6.1.3 – Porte dos animais

Itoh et al (2005), estudando 101 amostras de neoplasia mamária (60 amostras de raças de pequeno porte, e 40 de outros portes), relata que há diferença na incidência de neoplasia mamária de acordo com o porte do animal, onde 25% das amostras com diagnóstico histopatológico de malignidade eram de pacientes com raças de pequeno porte, e 58% eram de pacientes de raças de grande porte.

Contrariando os achados de Itoh et al. (2005), constatou-se que animais de raças pequenas ou animais pequeno porte representaram 50%, seguido dos de porte médio com 29,4% e os animais de grande porte representando 20,5% dos casos. Hataka (2004) relata em estudo que houve maior ocorrência em cães de porte médio com 43,75% dos animais.

6.2 – Avaliação histopatológica das amostras

De acordo com Gilbertson et al (1983) e Morrisson (1998), a grande heterogeneidade histopatológica torna difícil o estabelecimento de um sistema de classificação universal para as neoplasias de mama em caninos, tornando complicada a comparação de resultados entre dados de diferentes pesquisadores.

A classificação histopatológica estabelecida pela WHO é descrita em ordem crescente de malignidade, e baseada em critérios prognósticos para cada neoplasia (MISDORP, 2002).

Oliveira et. al (2003), analisando 85 cadelas com neoplasia mamária, relatam que 71,8% eram lesões malignas e 28,2% benignas, entre as neoplasias malignas o carcinoma era o que apresentava o maior número de casos. Nós não podemos fazer análise semelhante, pois trabalhamos somente com neoplasias malignas. Os nossos achados concordam com os resultados de Oliveira et al. (2003), quanto a maior incidência de carcinomas.

Terzian et al. (2007), estudando 70 cadelas com neoplasia mamária constatou que 65% dos casos eram carcinomas. Entre estes, o carcinoma túbulo-papilífero foi o que apresentou maior incidência com 41% dos casos, seguido dos sólidos com 17% e do carcinoma anaplásico com 6% dos casos. Os mesmos autores relatam que os carcinossarcomas representaram 21% do total das amostras.

De acordo com a classificação histopatológica empregada neste trabalho, constatou-se que 81,36% (83/102) dos casos eram carcinomas. Destes 0,98% (1/102) era carcinoma *in situ*, 45,09% (46/102) eram carcinoma complexo e 35,29% (36/102) eram carcinomas do tipo simples, diferindo dos achados de Terzian et al. (2007).

A diferenciação óssea nos carcinossarcomas no presente estudo foi de 27,27% (3/11) dos animais, com medula óssea ativa no foco neoplásico, e a cartilaginosa ocorreu em 72,72% (8/11) dos casos com carcinossarcoma; diferindo dos dados encontrados por Terzian et al (2007), que relatam diferenciação cartilaginosa em 54% e óssea em 13% das amostras com carcinossarcoma.

Zuccari et al. (2008) analisando 73 cadelas com neoplasia mamária, constatou que 86% eram neoplasias malignas, e destas 65% foram classificadas como carcinomas e 21% como carcinoma complexo.

Utilizando a classificação morfológica da WHO, onde as neoplasias são classificadas em graus crescentes de malignidade, foi possível analisar que nos carcinomas do tipo simples, houve maior prevalência da neoplasia classificada com menor grau de malignidade, o carcinoma do tipo túbulopapilífero com 24,5% (25/102), seguido pelo carcinoma do tipo sólido com 6,86% (07/102) e do carcinoma do tipo anaplásico com 3,92% (04/102) de todas as amostras.

Vale ressaltar, apesar de serem características não consideradas na classificação histomorfológica utilizadas neste trabalho, entre os carcinomas simples do tipo túbulopapilífero grande parte apresentava áreas císticas, bem como secreção proteinácea no interior dos ácinos e túbulos.

6.3 Avaliação histoquímica das amostras

6.3.1 Avaliação quantitativa dos mastócitos

Vários autores atribuem papel importante aos mastócitos, no que tange a proliferação de células neoplásicas no homem. Indicando que a presença de mastócitos indica um fator prognóstico ruim nas neoplasias (HARTVEIT et al, 1981; NORDLUND e ASKENASE, 1983; ROCHE, 1986; DABBOUS et al., 1991; CRICCO et al., 1994).

Não há relatos em medicina veterinária que correlacione os efeitos dos mastócitos com a proliferação ou morte de células neoplásicas na mama de cadelas (RAJPUT, et al., 2007).

Rajput et al. (2007) estudando câncer mamário invasivo na mulher, usando a técnica do Tissue microarrays em 4.444 casos, constatou que a presença de um ou mais mastócitos no ambiente neoplásico é suficiente para exercer efeito prognóstico positivo.

Os mastócitos podem inibir o crescimento tumoral pela liberação de peroxidase endógena que é citotóxica para células neoplásicas de mamíferos (HERDENSON et al., 1981), por citotoxicidade natural (BHOWMICK & MOSES, 2005), e pelo recrutamento de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos (HE e WALLS, 1998).

Os mastócitos secretam várias moléculas como o fator semelhante à heparina, interleucina-8, fator de crescimento endotelial que promove a neovascularização, histamina que suprime a resposta imune, fator crescimento derivado das plaquetas e o fator de stem-cell, que são mitogênicos e as proteases que promovem a metástases (THEOHARIDES, 2004).

Outra hipótese que indica que os mastócitos tem um prognóstico melhor para o paciente é de que eles podem também inibir o crescimento neoplásico pela secreção de interleucina-1, interleucina-4, interleucina-6, e fator de necrose tumoral (TNF- α) que induzem a apoptose de células endoteliais (LATTI, 2003); e sulfato de condroitina que inibe metástases (KOKENYESI, 2001).

Os mastócitos que liberam a protease quimase estimulam a apoptose em diferentes células (HARA, 1999), e inibem a angiogênese, pelo fato de

exercer efeito citotóxico na musculatura lisa dos vasos (LESKINEN, 2003). Já os mastócitos que liberam a protease triptase estimulam a inflamação e o recrutamento de fibroblastos, que induz a fibrose tumoral e, por conseguinte limitando o crescimento neoplásico e as metástases (RUOSS, 1991).

Entretanto, estudo recente indica que a triptase aumenta a migração e a invasão das células neoplásicas malignas, contudo, não interfere na proliferação das mesmas (XIANG, 2010).

Este estudo mostra que os mastócitos estão presentes no foco neoplásico em 96,08% (98/102) das amostras. São predominantes em áreas onde o tecido conjuntivo é abundante, e principalmente ao redor dos vasos. Os mastócitos também apareceram em menor número entre as células epiteliais acinares e tubulares.

Há variação na concentração de mastócitos conforme o tipo histomorfológico da neoplasia, entretanto, não há diferenças marcantes entre as médias dos diferentes tipos de neoplasias. A neoplasia que apresentou o maior número médio de mastócitos foi o carcinoma simples do tipo túbulopapilífero, seguido pelo carcinoma complexo, carcinosarcoma, carcinoma simples do tipo anaplásico, carcinoma simples do tipo sólido e pelo carcinoma de células fusiformes.

Quanto à influência dos mastócitos na proliferação das células neoplásicas, foi observada correlação significativa positiva entre o número de mastócitos e o índice de proliferação (Ki-67) ($p < 0,05$) para o carcinoma complexo. Assim, neste tipo de neoplasia mamária os mastócitos podem ser um dos responsáveis pelo estímulo proliferativo observado. Nos demais tipos de neoplasias não foram observados correlações significativas.

Sabe-se que a triptase secretada pelos mastócitos, além de promover a angiogênese, é também conhecida como agente mitogênico (OZDEMIR, 2006).

O estímulo mitogênico exercido pelos produtos liberados pelos mastócitos é controverso. Quanto à influência dos mastócitos no índice de apoptose das células neoplásicas, não foram observadas correlações significativas e entre o número de mastócitos e o índice apoptótico (caspase-3) para todas as neoplasias estudadas. Alguns autores consideram que os mastócitos possuem uma função inibitória sobre o crescimento do tecido

neoplásico, que é exercida por meio do efeito prónecrolítico ou pró-apoptótico de componentes de seus grânulos, como o TNF- α , granzimas e quimase (ÖZDEMİR, 2006; CHING, 2006). Os resultados obtidos neste estudo não corroboram esta afirmativa.

A análise de correlação entre morte e proliferação celular, mostrou correlação significativa negativa nos carcinomas de células fusiformes, entre o índice apoptótico (Caspase-3) e o índice de proliferação (NORs). Ou seja, no carcinoma de células fusiformes quando se tem aumento do número das NORs é observado diminuição do índice apoptótico.

A mesma análise não mostrou correlações significativas entre o índice apoptótico (caspase-3) e os índices de proliferação estudados (Ki-67 e NOR) nas outras neoplasias.

6.3.2 **Avaliação quantitativa das NORs**

Uma clara correlação entre o aumento da contagem das NORs e baixa sobrevivência foi demonstrada em carcinoma colorretal (MORAN et al., 1989; ÖFNER et al., 1990; RÜSCHOFF et al., 1990a).

Pich et al. (2000), estudando vários tipos de neoplasias verificaram que a análise das AgNORs é um fator prognóstico importante.

Morita et al. (1991) relataram que o número das NORs por núcleo igual ou superior a 6, indica baixa sobrevivência em pacientes humanos com carcinoma de esôfago.

O valor prognóstico da análise das AgNORs em cães foi sugerido por Bostock et al. (1989) estudando mastocitomas. Cadelas com carcinoma mamário, que possuem contagem das NORs por núcleo menor que 8, tem um melhor prognóstico e uma sobrevida maior, diferente dos animais com contagem das NORs acima de 8 por núcleo, que morrem antes de completar um ano pós intervenção cirúrgica (BOSTOCK et al., 1992).

Pessoa (2005) e Suzano (2007) estudando cães portadores de linfomas de baixo e alto grau de malignidade, também relataram maior número das NORs por núcleo em cães com linfomas de alto grau de malignidade.

Corrêa et al. (2004) estudando a área nuclear e das NORs em neoplasias benignas e malignas de mama em cadelas, relataram que há diferença significativa, com expressão maior da área das AgNOR por núcleo em neoplasias malignas.

No presente estudo houve pequena variação na quantidade das NORs por núcleo (3,39 a 5,36 NORs) nos diferentes tipos de neoplasias, e apesar de não haver diferença estatística significativa entre os diferentes tipos histomorfológicos de neoplasias, a média das NORs foram superiores as encontradas por Löhr (1997).

Neste estudo o tipo neoplásico que apresentou a maior média das NORs foi o carcinoma simples túbulo-papilífero, seguido do carcinoma complexo. Entretanto, estes tipos de neoplasia são os menos agressivos conforme a classificação histopatológica da WHO. Os resultados descritos por Bostock et al. (1992), que relataram que os carcinomas mamários com contagem menor que 8 por núcleo possuem melhor prognóstico, podem ter sido influenciados pela técnica de coloração da AgNOR empregada, visto que os precipitados de prata sobre as células pode influenciar a contagem das NORs.

6.4 Avaliação imunoistoquímica das amostras

6.4.1 Avaliação do índice apoptótico (caspase 3)

Poucos são os relatos de uso da caspase-3 em neoplasias mamárias em cães, contudo, Dukers et al (2002) estudando neoplasias linfoides, diz que a caspase-3 tem sido considerada um dos melhores métodos de determinação do índice de apoptose, esta técnica é mais confiável do que a contagem dos corpos apoptóticos.

Para Alberts (1999), London e Vail (2007) a apoptose pode ser um marcador favorável para indivíduos com neoplasia mamária, uma vez que este fenômeno estabilizaria o crescimento e impediria a evolução do tumor.

Portanto se o paciente possuir elevado índice apoptótico e juntamente elevado índice de proliferação celular, não tem prognóstico favorável (DE JONG et al., 2000).

Dubin e Stoppani (2000) relatam que se o índice apoptótico da amostra neoplásica for elevado, esta cresce lentamente, enquanto que, se for baixo a neoplasia cresce rapidamente.

O estudo de Terzian et al. (2007), também relata correlação entre a marcação pela caspase-3 e a marcação pelo Ki-67.

O presente estudo revela imunomarcação pela caspase-3 em 94,12% (96/102) das amostras. As amostras apresentaram índice apoptótico variável entre os diversos tipos morfológicos, entretanto, a análise das médias não mostra diferença entre os diferentes tipos morfológicos das neoplasias.

A análise de correlação de Spearman entre morte e proliferação celular, mostrou correlação significativa negativa nos carcinomas de células fusiformes, entre o índice apoptótico (Caspase-3) e o índice de proliferação (NORs). Ou seja, no carcinoma de células fusiformes quando se tem aumento do número das NORs é observado diminuição do índice apoptótico.

6.4.2 Avaliação do índice de proliferação (Ki-67 – MIB 1)

Vários autores relatam que a avaliação da expressão do Ki-67 em neoplasias é um fator prognóstico importante no que tange a proliferação celular (PREZIOSI et al., 1995; KREITZ, et al., 2000).

A expressão do Ki-67 em neoplasias mamárias de humanos e de cães mostra correlação positiva com o tamanho da massa, aparecimento de metástase, expressão de receptores de estrógeno, morte pela neoplasia e baixa taxa de sobrevivência (BROWN & GATTER, 1990; VERONESE e GAMBACORTA, 1997; BOUZUBAR et al., 1989; NIETO et al., 1998 E ALENZA et al., 2000).

Zuccari et al. (2008) que o Ki-67 apresenta melhores resultados quando se quer avaliar a proliferação celular, e que é um fator prognóstico desfavorável quando associado aos carcinomas.

No presente estudo foi constatado que a expressão do Ki-67 nos carcinomas do tipo simples, aumenta conforme aumenta o grau de malignidade destes. Segundo Peña et al. (1998) o índice proliferativo é independente do tipo

histológico nos tumores malignos da mama, embora nos carcinomas sólidos se apresente mais alto do que nos carcinomas que apresentam formação tubular.

No carcinoma do tipo complexo e nos carcinossarcomas a expressão do ki-67 também é alta, o que vem corroborar os achados de Terzian et al. (2007) e Zuccari et al. (2008).

A análise da expressão do Ki-67 em todas as amostras estudadas revela que houve predomínio da marcação com escore (++) quando 10 a 50% das células eram positivas.

6.4.3 **Comentários Finais**

O interesse pelo estudo das neoplasias mamárias vem de sua alta frequência nas fêmeas caninas. Ultimamente o foco das pesquisas tem sido centrado na determinação de fatores de prognóstico para este tipo de câncer. A complexidade e a heterogeneidade características das neoplasias mamárias tem sido o principal obstáculo a este tipo de abordagem.

Consideram-se atualmente como fatores prognósticos o tamanho do tumor, o envolvimento ganglionar, presença de metástases, o tipo histológico, o grau de malignidade, o grau de diferenciação nuclear, a reatividade do tecido linfóide adjacente ao tumor, o grau de invasão, o crescimento intravascular, a atividade de receptores hormonais e o índice proliferativo.

A continuidade dos estudos destes fatores e de outros que venham a surgir permitirá um melhor entendimento das neoplasias mamárias, levando a uma abordagem clínica e principalmente a estratégias de tratamento mais eficientes.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitiram concluir que:

- As fêmeas sem raça definida apresentaram maior prevalência de neoplasia mamária;
- Nas fêmeas com raça definida a que apresentou maior prevalência foi à raça Poodle;
- A média de idade das cadelas com neoplasia mamária foi de 8,6 anos;
- Os mastócitos estão presentes ao redor e dentro do foco neoplásico na quase totalidade das amostras;
- Os mastócitos influenciaram significativamente a proliferação celular no carcinoma do tipo complexo;
- As técnica da AgNOR mostrou ótima marcação nas neoplasias mamárias,
- Quanto maior o índice de proliferação (NORs) nos carcinomas de células fusiformes menor é o índice apoptótico;
- A expressão do Ki-67 foi elevada na quase totalidade das amostras;
- Nos carcinomas do tipo simples a expressão do Ki-67 aumenta conforme aumenta o grau de malignidade;
- A expressão da caspase-3 também é elevada nas neoplasias de mama, principalmente nas células dos carcinomas do tipo simples.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIAS

- AFIP, Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat. Return to Who tumor classification menu, 05 de Abril, 2004. <http://www.afip.org/vetpath/whoamm.htm>), 22 /julho/ 2010.
- ALBERTS, B. ET AL. Controle do ciclo celular e morte celular. In____. Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia da célula. Porto Alegre, Artmed, 1999.
- ALENZA, M. D. P., PEÑA, L., DEL CASTILHO, N. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumors. *J. Small Anim Pract.* 41: 287-291, 2000.
- ALLRED, C. D., HARVEY, J. M. BERARDO, M. Prognosti and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod. Pathol.* 11: 155-168, 1998.
- BHOWMICK, A.N., MOSES, L.H. Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev* 15:97–101, 2005.
- BRODEY, R. S. et al. Canine mammary gland neoplasms. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 19; p 61, 1983.
- BONAMIM, L. V.; ABEL, M. N. C.; Histamina, serotonina e seus antagonista. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BENARDI, M. M.; *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. São Paulo: Guanabara Koogan, p.183-191, 1999.
- BOSTOCK, D. E., CROCKER, J., HARRIS, K., SMITH, P. Nucleolar organizer regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumors. *Br. J. Cancer.* v. 59, p. 915-918. 1989.
- BOSTOCK, D. E., MORIARTY, J., CROCKER, J., Correlation between histologic diagnosis mean nucleolar organizer region count and prognosis in canine mammary tumors. *Vet. Pathol.* v. 29. p. 381 – 385. 1992.
- BROWN, D. C. & GATTER, K. C. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology.* 17: 489-503, 1990.

- BOUZUBAR, N., WALKER, K. J., GRIFFITHS, K. Ki67 immunostaining in primary breast cancer: pathological and clinical associations. *Br. J. Cancer*. 59: 943-947, 1989.
- BURINI, C. H. P. Caracterização clínica, Citopatológica e Bioquímica do câncer Mamário de Cadelas Sem Raça Definida. Botucatu, 2002. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista.
- CAVALCANTI, M. F., CASSALI, G. D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas – revisão. *Clínica Veterinária*. Ano XI, n. 61, março/abril, p. 56 – 62. 2006.
- CHEVILE, N. F. *Introdução à patologia celular*. 3.ed. Barueri –SP: Manole, 2009. 462p.
- CHING S, WALLIS RA, YUAN L, et al. Mast cells and cutaneous malignancies. *Modern Pathology*. 19: 149–59, 2006.
- CORRÊA, V. P., SALDIVA, P. H. N., GUERRA, J. L., ANTONANGELO, L., SANTOS, D. L. Anclivepa, *Rev. Ofic. de Educ. Cont. da Assoc. Nac. de Clín. Vet. de Peq. Anim.*, Maio, p. 77-78, 2004
- COUSSENS, L. M & WERB, Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 420, p. 860-867, 2002.
- CRICCO, G.P.; DAVIO, C.A.; MARTIN, G.; ENGEL, N.; FITZSIMONS, C.P.; BERGOC, R.M. & RIVEIRA, E.S. Histamine as na autocrine growth factor in experimental mammary carcinomas. *Agentes actions*. 43 (1-2),p.17-20, 1994.
- CROCKER, J., NAR, P., Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J. Pathol*. v.151, p. 111-118. 1987.
- CROCKER, J., SKILBECK, N., 1987. Nucleolar organizer regions in melanocytic lesions: a quantitative study. *J. Clin. Pathol*. v. 40, p 885-889. 1987.

- DABBOUS, M. K.; HANEY, L.; NICOLSON, G. L.; ECKLEY, D.; WOOLLEY, D. E.; Mast cell modulation of tumor cell proliferation in rat mammary adenocarcinoma 13762 NF. *Br. J.Cancer*. 63, p.873-878, 1991.
- DE JONG, J. S., VAN DIEST, P. J., BAAK, J. P. A. Number of apoptotic cells as a prognostic marker in invasive breast cancer. *British Journal of Cancer*. V. 82, n. 2, 368-373p, 2000.
- DUBIN, M. & STOPPANI, A. O. M. Muerte celular programada y apoptosis function de las mitocondrias. *Medicina* (Buenos Aires), v. 60, 375-386p, 2000.
- DUKERS, D.F.; OUDEJANS, J. J.; VOS, W.; BERGE, R.L.; MEIJER, C.J.L.M. Apoptosis in B-cell lymphomas and resctive lymphoid tissues always involves activation of caspase-3 as determined by a new in situ detection method. *Journal Pathol*. v.196, p.307-315, 2002.
- DU MANOIR, S. GUILLAUD, P., CAMUS, E., SEIGNEURIN, D. BRUGAL, G. Ki-67 pathways within the 2c compartment. *Cytometry*. 12: 445-463, 1991.
- DVORAK, A.M. & KISSEL, S. Granule changes of human skin mast cells characteristic of piecemeal degranulation and associated with recovery during wound healing in situ. *Journal Leuk. Biol*. 49:197–210, 1991.
- EGENVALL, A., BONNETT, B.N., OHAGEN, P. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80.000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prev Vet Med*. 69: 109-127. 2005.
- FERGUSON, H. R. Canine Mamary Gland Tumours. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*. 15: 3,1985.
- FRYE, F. L., DORN, C. R., TAYLOR, D. O. N., HIBBARD, H. H. & KLAUBER, M. R. Characteristics of canine mammary gland tumor cases. *Anim Hosp*. 3: 1-12, 1967.

- GALERA, P. D. FREITAS, S. H. OLIVEIRA, J. E. B. GODOY, S. S. Estudo Retrospectivo da Ocorrência de Tumores de Mama em Cadelas. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.24, n.6, 2002.
- GILBERTSON, S. R., KURZMAN, I. D., ZACHRAU, R. E., HURVITZ, A. I. e BLACK, M.M. Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary Pathology*. 20: 127-142. 1983.
- GOTTWALD, D. Ein beitrage zur Häufigkeit von mammatumoren beim hund: statistische auswertung der einsendungen einer praxis für tierpathologie aus den Jahren 1990 bis 1995, doctoral dissertation, Munich, University of München, 1998.
- HARTVEIT, F.; Mast cells and metachromasia in human breast cancer: their occurrence, significance and consequence; a preliminary report. *The Pathological Society of Great Britian and Ireland*; v-134,pg-7-11, 1981.
- HARA, M., MATSUMORI, A., ONO, K., KIDO, H., HWANG, M. W., MIYAMOTO, T., IWASAKI, A., OKADA, M., NAKATANI, K., SASAYAMA, S. Mast cells cause apoptosis of cardiomyocytes and proliferation of other intramyocardial cells in vitro. *Circulation* 100:1443–1449, 1999.
- HATAKA, A. Citologia aspirativa por agulha fina e histopatologia: valor e significado para o diagnóstico e prognóstico do câncer de mama em cadelas. Botucatu, 2004. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
- HENDERSON, W.R., CHI, E.Y, JONG, E.C., KLEBANOFF, S.J. (Mast cell-mediated tumor-cell cytotoxicity. Role of the peroxidase system. *J Exp Med* 153:520–533, 1981).
- H.E, S. WALLS, A.F.. Human mast cell chymase induces the accumulation of neutrophils, eosinophils and other inflammatory cells in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 25:1491–1500, 1998.

- HOWARD, E. B & NIELSEN, S. W. Neoplasms of the boxer dog. *Amer. J. Vet Res.* 26: 1121-1131. 1965.
- IAMAROON, A., PONGSIRIWET, S., JITTIDECHARAKS, S., PATTANAPORN, K., PRAPAYASATOK, S. & WANACHANTARARAK, S.: Increase of mast cells and tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 32: 195-199, 2003.
- ITOH, T., UCHIDA, K., ISHIKAWA, K. et al. Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. *Journal Vet. Med. Science.* 67: 345-347, 2005.
- IRANI, A. M., BRADFORD, T. R., KEPLEY, C. L., SCHECHTER, N. M. & SCHWARTZ, L. B: Detection of MCT and MCTC types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies. *J Histochem Cytochem* 37: 1509-1515, 1989.
- JONES, T. C. HUNT, R. D. KING, N. W. *Patol. Vet.* 5a ed., Barueri: Manole, 2000, 1213-1214p.
- KANKKUNEN, J. P.; HARVIMA, I. T.; NAUKKARINEN, A.; Quantitative analysis of tryptase and chymase containing mast cells in benign and malignant breast lesions. *Int. J. Cancer.* 72, p. 385-388, 1997.
- KLAS, N. Mast cells and angiogenesis. *APMIS*, v.110: 5, 355 – 371, 2002.
- KNAPP, D. W.; WATERS, D. J.; SCHIMIDT, B. R.; Tumores do Sistema Urogenital e das Glândulas Mamárias. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C.; *Tratado de Medicina Interna Veterinária*, 5. ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2004, v-1, p574–582.
- KOKENYESI, R. Ovarian carcinoma cells synthesize both chondroitin sulfate and heparan sulfate cell surface proteoglycans that mediate cell adhesion to interstitial matrix. *J Cell Biochem.* 83:259–270, 2001.
- KREITZ, S., FACKELMAYER, F. O., GERDES, J. The proliferation specific human Ki-67 protein is a constituent of compact chromatin. *Exp. Cell Res.* 261: 284-292, 2000.

- LATTI, S., LESKINEN, M., SHIOTA, N., WANG, Y., KOVANEN, P. T., LINDSTEDT, K. A. Mast cell-mediated apoptosis of endothelial cells in vitro: a paracrine mechanism involving TNF-alpha-mediated down-regulation of bcl-2 expression. *J Cell Physiol*, 195:130–138, 2003.
- LEMOS, B.; DAVIO, C.A.; GASS, H.; GONZALEZ, P.; CRICCO, G.P.; MARTIN, G.; BERGOC, R.M. & RIVEIRA, E.S. Histamine receptors in human mammary gland, different benign lesions and mammary carcinomas. *Inflamm. Res.*, apr.; 44, suppl. 1: S68-69, 1995.
- LESKINEN, M. J., LINDSTEDT, K. A., WANG, Y., KOVANEN, P. T. Mast cell chymase induces smooth muscle cell apoptosis by a mechanism involving fibronectin degradation and disruption of focal adhesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:238–243, 2003.
- LOAR, A. S. Tumores do sistema genital e glândulas mamárias. In: ETTINGER, S. J., Tratado de Medicina Interna Veterinária, Seção XI: O Sistema Reprodutivo. 3. Ed. Rio de Janeiro: Manole, 2007.
- LÖHR, C. V., TEIFKE, J. P., FAILING, K. & WEISS, E. Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardized AgNOR method with postfixation and immunohistologic of Ki-67 and PCNA. *Vet. Pathol.*, 34; 212-221, 1997.
- LONDON, C. A. & VAIL, D. M. Tumor biology. In: WITHROW, S. J. & MACEWEN'S, E. G. *Small animal clinical oncology*. 4 ed. Philadelphia: Saunders, 2007, 31 -75p.
- MADEWELL, B. R. Tumor Markers. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W. e BRUSS, M. L. *Clinical. Bioch. of Domestic Animals*. 5. ed. California. Academic Press, 1987, p767-768.
- MALONE, D. H.; IRANI, A.M.; SCHWARTZ, L.B.; BARRET, K.E.; METCALF, D.D. Mast cell numbers and histamine levels in synovial fluids from patients with diverse arthritis. *Arthritis Rheum*. 29: 956–63, 1986.

- MISDORP, W.; Tumors of the Mammary Gland. In: MOULTON, J. E. *Tumors in Domestic Animals*, 4ª edição; California; 2002, p575 – 627.
- MORAN, K., COOKE, T., FOSTER, G., GILLEN, P., SHEEHAN, S., DERVAN, P., FITZPATRICK, J. M., Prognostic value of nucleolar organizer regions and ploidy values in advanced colorectal cancer. *Br. J. Surg.* v. 76, p. 1152-1155. 1989.
- MORRISON, W. B.; Canine and Feline Mammary Tumors. In: MORRIN, W. B.; *Cancer in dogs and cats: Medical and Surgical Management*. 1.ed, Pennsylvania; 1998, p591 - 598.
- MORITA, M., KUWANO, H., MATSUDA, H., MORIGUCHI, S. & SUGIMACHI, K. Prognostic significance of argyrophilic nucleolar organizer regions in esophageal carcinoma. *Cancer Research*, v 51, 19. 5339-5341p. 1991.
- NIETO, A. I., PEÑA, L. L., PÉREZ-ALENZA, M. D., SÁNCHEZ, M. A., FLORES, J. M. & CASTAÑO, M. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet. Pathol.* V 37: 239-247, 2000.
- NORDLUND, J. J.; ASKENASE, P. W.; The effect of histamine, antihistamine, and a mast cell stabilizer on the growth of Cloudman melanoma cells in DBA/2 mice. *J. Invest. Dermatol.*, 81, pg 28 – 32, 1983.
- ÖFNER, D., TÖTSCH, M., SANDBICHLER, P., HALLBRUCKER, C. H. R., MARGREITER, R., MIKUZ, G., SCHMID, K. W., Silver stained nucleolar organizer regions proteins (AgNORs) as a predictor of prognosis in colonic cancer. *J. Pathol.* v.162, p. 43-49. 1990.
- OLIVEIRA, L. O., OLIVEIRA, R. T., LORETTI, A. P., RODRIGUES, R. e DRIEMEIER, D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta Scien. e Vet.* v. 31: p.105 - 110. 2003.

- ÖZDEMİR, Ö. Might mast cells have a role in neoplastic angiogenesis of canine melanomas? *European Society of Veterinary Dermatology*. **17**; 284–286, 2006.
- ÖZDEMİR Ö. Human mast cell cytotoxicity against human lymphoma and myeloid leukemia cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 117: S17, 2006.
- PAGANO, M., GAUVREAU, K. Princípios de bioestatística. 2 ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learneing, 2004.
- PELETEIRO, M. C. Tumores mamários na cadela e na gata. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.89, p.10-29, 1994.
- PEÑA, L. L., NIETO, A. I., PÉREZ-ALENZA, D., CUESTA, P. & CASTAÑO, M. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *J. Vet. Diagn. Invest.* V 10: 237-246, 1998.
- PESSOA, A.W.P Classificação Citohistológica , Imunoistoquímica, Lesão de DNA, Morfometria e Índice de proliferação celular nos linfomas caninos Botucatu, 2005. 187p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista.
- PICH, A., CHIUSA, L., MARGARIA, E., Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. *Micron* v. 31, p. 133-141. 2000.
- PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANNESSON, P.; HIMBER, G.; PIGEON, F. E ADNET, J. J., Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nuclear organizer regions at the optical level. *Histochem. Journal*, v.18, p. 5-14. 1986.
- PRIESTER, W. A. & MCKAY, F. W. The occurrence of tumors in domestic animals. NCI Monograph 54, Bethesda. *National Cancer Institute*, 1980.
- PREZIOSI, R. SARLI, G., BENAZZI, C. MARCATO, P. S. Detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in canine and feline mammary tumours. *Journal Comp. Pathol.* 113: 301-312, 1995.

- RAJPUT, A. B., TURBIN, D. A., CHEANG, M. CU, VODUC, D. K., LEUNG, S., GELMON, K. A., GILKS, C. B. & HUNTSMAN, D. G. Stromal mast cells in invasive breast cancer are a marker of favourable prognosis: a study of 4,444 cases. *Breast Cancer Res. Treat*; 2007
- RIBATTI, D.; VACCA, A.; NICO, B.; CRIVELLATO, E.; RONCALI, L.; DAMMACCO, F. The role of mast cells in tumour angiogenesis. *Br Journal Haematol*; 115: 514-21, 2001.
- ROCHE, W. R.; The nature and significance of tumour- associated mast cells. *Journal Pathol.*, 148, pg 175 – 178, 1986.
- RUOSS, S. J., HARTMANN, T., CAUGHEY, G. H. Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts. *Journal Clin Invest* 88:493–499, 1991.
- RÜSCHOFF, J., BITTINGER, A., NEUMANN, K., SCHMITZ-MOORMANN, P., Prognostic significance of nucleolar organizing regions (NORs) in carcinomas of the sigmoid colon and rectum. *Pathol. Res. Pract.* v.186, p. 85-91. 1990a.
- SUZANO, S. M. C. Avaliação da proliferação celular, índice apoptótico e da expressão do p53 nos linfomas caninos. Botucatu, 2007. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista.
- TAKIZAWA, H.; OHTA, K. & HIRAI, K. Mast cells are important in the development of hypersensitivity pneumonitis. *J Immunol.* 143:1982–8, 1989.
- TERZIAN, A. C. B., ZUCCARI, D. A. P. C., PEREIRA, R. S., PAVAM, M. V., RUIZ, C. M., SUEIRO, F. A. e COELHO, J. Avaliação da caspase-3 e Ki-67 como marcadores prognósticos nas neoplasias mamárias em cadelas. *Braz. J. Vet. Anim. Sci.* 44: 2, 96-102, 2007.
- THEOHARIDES, C. T., CONTI, P. Mast cells: the JEKYLL and HYDE of tumor growth. *Trends Immunology*, 25:235–241, 2004.
- TRERÈ, D. AgNOR staining and quantification. *Micron*, v. 31, p. 127 – 131. 2000.

- VERONESE, S. M. & GAMBACORTA, M. Detection of Ki-67 proliferation rate in breast câncer: correlation with clinical and pathologic features. *Am J Clin Pathol.* 95: 30-34, 1992.
- XIANG, M.; GU, Y.; ZHAO, F.; LU, H.; CHEN, S. & YIN, L. Mast cell tryptase promotes breast cancer migration and invasion. *Oncology Reports.* 23: 615-619, 2010.
- ZATLOUKAL, J., LORENZOVA, J., TICHY, F. Breed and age as risk factors for canine mammary tumors. *Acta Vet Brno.* 74: 103-109. 2005
- ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Fisiopatologia da neoplasia mamária em cadelas. *Clinica Veterinária.* 32, p.50-54, 2001.
- ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; CURY, P. M. & CORDEIRO, J. A. Immunocytochemical study of Ki-67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. *Veterinary Clinical Pathology.* v. 33; 1, 2004.
- ZUCCARI, D. A. P. C., PAVAM, M. V., TERZIAN, A. C. B., PEREIRA, R. S., RUIZ, C. M. e ANDRADE, J. C. Immunohistochemical evaluation of e-caderin, Ki-67 and PCNA in canine mammary neoplasias: Correlation of prognostic factors and clinical outcome. *Pesq. Vet. Bras.* 28: 4, 207-215, 2008.

9 . TRABALHO CIENTÍFICO