

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Avaliação dos marcadores tumorais RAD51 e BRCA2 em
neoplasias mamárias em mulheres e gatas**

LETICIA PENTEADO GASPAR

Botucatu – SP

Abril/2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Avaliação dos marcadores tumorais RAD51 e BRCA2 em
neoplasias mamárias em mulheres e gatas**

LETICIA PENTEADO GASPAR

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Biotecnologia
Animal da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da
Universidade Estadual Paulista como
pré-requisito para obtenção do título de
Mestre

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo
Fonseca Alves

Botucatu – SP

Abril 2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Gaspar, Leticia Penteado.

Avaliação dos marcadores tumorais RAD51 e BRCA2 em neoplasias mamárias em mulheres e gatas / Leticia Penteado Gaspar. - Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu

Orientador: Carlos Eduardo Fonseca Alves

Capes: 50501003

1. Biologia molecular. 2. Câncer. 3. Gradação de tumores.
4. Marcadores biológicos de tumores.

Palavras-chave: Biologia molecular; Carcinomas; Graduação histológica.

Nome do autor (a): Leticia Penteado Gaspar

TÍTULO: AVALIAÇÃO DOS MARCADORES TUMORAIS RAD51 e BRCA2 EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE MULHERES E GATAS.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca

Presidente e Orientador

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal FMVZ - UNESP - Botucatu /SP

Profa. Dra. Geórgia Modé Magalhães

Membro

Departamento de Patologia Clínica e Patologia Veterinária - Instituto Federal do Sul de Minas Gerais *campus* Muzambinho.

Profa. Dra. Flávia Karina Delella

Membro

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional. Setor Morfologia. IBB/UNESP - Botucatu /SP

Data da Defesa: 29 de abril de 2024.

“Há dois meios para nos resguardarmos das misérias da
vida: música e gatos.”

Albert Schweitzer

AGRADECIMENTOS

Achei que essa seria a parte mais fácil pois minha grande paixão é a escrita de crônicas e poemas, mas talvez não seja.

Agradeço a Deus, mas não como clichê, como AQUELE em que sempre depusitei minha confiança, desde a conquista da bolsa de estudos lá em 2001. Não tem como isolar nenhum fato da minha vida em que SUA presença estivesse me guiando.

Agradeço primeiramente a doutora Mayara Lima, que me informou que o professor Carlos Eduardo estava orientando em Botucatu e isso me fez deixar meus traumas da pós *strictu sensu* e tentar o tão planejado (e postergado) mestrado.

Ao professor Carlos Eduardo Fonseca Alves que mesmo depois de sete anos sem me ver, foi tão receptivo, atencioso e aceitou ser meu orientador. Com ele eu me senti à vontade para encarar essa jornada. Desconheço outro orientador que iria à faculdade no final de semana porque a orientada se perdeu no protocolo de imunohistoquímica. Cadu, ganhe o mundo, mas por favor, não se esqueça do seu dom de ensinar.

Às professoras Geórgia, Flávia, Fabiana e ao professor Denner pela gentileza de terem aceitado o convite para participar da banca.

Neste momento tenho a sorte de precisar escolher quais amigos citar pois foram tantos.

Aos meus irmãos (gostaria de citar todos) de Piracicaba, Jaboticabal, São José do Rio Preto e Botucatu que sempre foram apoio na jornada. Em especial agradeço à Mariana (inúmeras vezes), Giovanna e Simão que enfrentaram sem pensar a luta de um tratamento médico comigo. À Ana Maria (que sempre disse que eu era inteligente) e mesmo depois de uma mudança de escola traumática continuamos estudando juntas até o sonhado cursinho (e o MBA). Sem esperar, um novo grupo de apoio se formou, me auxiliando inclusive em dúvidas

acadêmicas: Ana Letícia, Carol Nogueira, Carol Zani, Camila, Andrea, obrigada por me ouvirem e ainda mais, obrigada as duas primeiras por transbordarem empatia de uma forma que me fez chorar.

À Shirley que mesmo não podendo, me ajudou infinitas vezes e de infinitas formas a distância.

Aos meus colegas de pós-graduação: Natália e Alana minhas professoras de imuno-histoquímica, sem palavras para agradecer a paciência.

Às pessoas que encontrei em Botucatu e iluminaram meu caminho: Roberta, Paola e Fernando durante esses 3 anos.

Às minhas tias, tios, primos e Lourdes que nunca deixaram minha mãe sozinha apesar de eu estar longe. Elas me apoiaram direta e indiretamente, principalmente quando a situação financeira começou a ser um problema maior. Obrigada tia Vera e Maria José pela imensa generosidade.

Ao Pintado, à Branca, Nice, Boneca, Pretinha Delilah, Abby, Cookie, Princesa e Neném que são a recarga da minha bateria. Com o coração apertado, Obrigada Lili, Bandit e Pretinha que se foram quando eu já estava em Botucatu.

Frajola, obrigada por ter me esperado. Nenhum gato vai ser tão inteligente e sensível como você. Obrigada por todas as vezes que precisei de apoio e você estava literalmente lá.

Obrigada a cada animal que atendi durante minha permanência nesta cidade. Levo de cada ser, um aprendizado enorme.

À Sueli Gaspar que nunca entendeu direito porque eu sempre viajei tanto para estudar, mas sempre me deu todo apoio e suporte do mundo. Nunca me julgou, mantendo a positividade enquanto eu não enxergava nada em minha frente.

Ao Joaquim Gaspar que tinha o objetivo de se formar em letras, fato que descobri recentemente, não pude escrever meus poemas e minhas crônicas nessa área que escolhi, mas espero que goste do resultado, como quando brincávamos de professora e aluno, pois este trabalho é seu.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de Graduação Histológica Adaptada de Elston & Ellis	13
Tabela 2. Dados comparativos entre histopatologia, imuno-localização, intensidade e porcentagem para RAD51 em carcinomas mamários de mulheres.	22
Tabela 3. Dados comparativos entre histopatologia, imuno-localização, intensidade e porcentagem para BRCA2 em carcinomas mamários de mulheres.	
Tabela 4. Dados clínicos, classificação histopatológica, graduação histológica e imuno-histoquímica das amostras de neoplasias mamárias de gatas.	24
Tabela 5. Representação do marcador RAD51 de acordo com a espécie e escore final.	27
Tabela 6. Representação do marcador BRCA2 de acordo com a espécie e escore final.	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação de glândula mamária representada por ductos galactóforos e tecido conjuntivo	3
Figura 2. Tecido mamário em período de lactação mostrando maior número de alvéolos	3
Figura 3. Disposição das cadeias mamárias na espécie felina	4
Figura 4. (A) Nódulo mamário em gata em mamas torácicas caudais e abdominais craniais. (B) Nódulo mamário ulcerado em gata.	9
Figura 5. Imuno-histoquímica de amostras de carcinoma mamário de mulheres para o marcador BRCA2.	23
Figura 6. Imuno-histoquímica de amostras de carcinoma mamário de mulheres e gatas para o marcador BRCA2 e RAD51.	25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.2 Anatomia, Morfologia e Histologia da Glândula Mamária de gatas.....	2
2.2 Epidemiologia das Neoplasias Mamárias em Mulheres.....	5
2.3 Epidemiologia das Neoplasias Mamárias em Gatas.....	5
2.3.1 Fatores Hormonais	7
2.3.2 Fatores Genéticos.....	7
2.3.3 Fatores Dietéticos	8
2.4 Diagnóstico	9
2.4.1 Apresentação Clínica.....	9
2.4.2 Exame Citológico.....	10
2.4.3 Classificação Histopatológica	10
2.4.4 Graduação Histológica.....	12
2.4.5. Exames Complementares.....	13
2.4.6 Imuno-histoquímica.....	14
3. OBJETIVO GERAL	18
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	18
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 Análise in sílico dos dados de mulheres	18
4.2 Critérios de Inclusão	19
4.3 Avaliação morfológica e graduação histopatológica	19
4.4 Técnica de Imuno-histoquímica	20
4.5 Análise Imuno-histoquímica	20
4.6. Análise estatística	21
5. RESULTADOS	21
5.1 Dados dos carcinomas mamários de mulheres	21
5.2 Dados dos Carcinomas Mamários em gatas	25
6.DISSCUSSÃO	27
7.CONCLUSÕES	30
8. REFERÊNCIAS.....	31

RESUMO

As neoplasias mamárias em gatas representam o terceiro tipo de tumor mais comum na espécie, estando atrás apenas de carcinomas de células escamosas e neoplasias intestinais, apresentando comportamento agressivo e com alta ocorrência de metástases. A classificação histopatológica das lesões, além de obrigatória para o diagnóstico, é essencial para a relação com dados epidemiológicos e evolução no entendimento da neoplasia na espécie. Nesse ponto, informações obtidas a partir do uso da biologia molecular são indispensáveis para ganho de dados com relação ao comportamento de cada tipo neoplásico proporcionando subsídios diagnósticos e prognósticos. Além disso, as neoplasias mamárias em gatas são consideradas modelos de estudo para neoplasia em mulheres. A expressão de RAD51 e BRCA2 são amplamente estudadas em neoplasias de mulheres, e os estudos em gatas são muito limitados. O objetivo desse trabalho foi investigar as marcações imuno- histoquímicas das proteínas RAD51 e BRCA2 em carcinomas mamários em gatas e correlacionar com fatores clínicos, patológicos e comparar com o carcinoma mamário de mulheres. A primeira etapa do estudo constituiu em realizar uma análise in sílico do The Human Protein Atlas e identificando 11 casos de carcinoma de mama de mulheres para análise imuno-histoquímica do BRCA2 e 19 casos para análise do RAD51. Nesses tumores, foi identificada expressão citoplasmática, membranosa e nuclear. Três amostras (3/11) com expressão 3+ e 8 amostras com expressão 4+ (8/11). Na análise das 19 amostras que expressaram RAD51 foi identificada expressão citoplasmática, membranosa e nuclear e em uma delas não houve marcação, quatro apresentaram marcação 1+ (4/19), cinco apresentaram marcação 2+ (5/19), cinco apresentaram marcação 3+ (3/19) e três apresentaram marcação 4+ (3/19). E relação as amostras de gatas, 24 amostras de tumores de gatas foram incluídas. Os subtipos histológicos mais comuns foram o ductal (12/24) e tubular (5/24). Em 62,5% (15/24) dos casos, os tumores eram de grau I e os outros 37,5% (9/24), eram tumores de grau II. Foi possível avaliar a expressão de BRCA2 em 23 casos. Em sete casos, a expressão de BRCA2 foi negativa, em cinco casos, foi identificada expressão 1+, quatro casos com expressão 2+, cinco casos com expressão 3+ e dois casos

com expressão 4+. Em relação ao RAD51, nove amostras foram negativas, seis amostras apresentaram expressão 1+, seis amostras apresentaram expressão 2+ e duas amostras apresentaram expressão 3+. Pode-se concluir que nas amostras de carcinoma de mama de gatas e mulheres a alteração na expressão de BRCA2 é mais frequente que a de RAD51 e a gata pode ser um modelo de estudo para desregulação dessas proteínas na gata.

Palavras-chave: biologia molecular, carcinomas, graduação histológica.

Abstract

Mammary neoplasms in cats represent the third most common type of tumor in the species, behind only squamous cell carcinomas and intestinal neoplasms, presenting aggressive behavior and with a high occurrence of metastases. The histopathological classification of lesions, in addition to being mandatory for diagnosis, is essential for the relationship with epidemiological data and evolution in the understanding of neoplasia in the species. At this point, the information obtained from the use of molecular biology is essential for gaining data regarding the behavior of each neoplastic type, providing diagnostic and prognostic support. Furthermore, mammary neoplasms in cats are considered study models for neoplasms in women. The expression of RAD51 and BRCA2 are widely studied in female neoplasms, and studies in cats are very limited. The objective of this work was to investigate the immunohistochemical markings of RAD51 and BRCA2 proteins in mammary carcinomas in cats and correlate them with clinical and pathological factors and compare them with mammary carcinoma in women. The first stage of the study consisted of carrying out a silica analysis of The Human Protein Atlas and identifying 11 cases of breast carcinoma in women for immunohistochemical analysis of BRCA2 and 19 cases for analysis of RAD51. In these tumors, cytoplasmic, membranous and nuclear expression was identified. Three samples (3/11) with 3+ expression and 8 samples with 4+ expression (8/11). In the analysis of the 19 samples that expressed RAD51, cytoplasmic, membranous and nuclear expression was identified and in one of them there was no staining, four showed 1+ marking (4/19), five showed 2+ marking (5/19), five showed 3 marking+ (3/19) and three were marked 4+ (3/19). Regarding samples from cats, 24 samples of tumors from cats were included. The most common histological subtypes were ductal (12/24) and tubular (5/24). In 62.5% (15/24) of cases, the tumors were grade I and the other 37.5% (9/24) were grade II tumors. It was possible to evaluate BRCA2 expression in 23 cases. In seven cases, BRCA2 expression was negative, in five cases, 1+ expression was identified, four cases with 2+ expression, five cases with 3+ expression and two cases with 4+ expression. Regarding RAD51, nine samples were negative,

six samples showed 1+ expression, six samples showed 2+ expression and two samples showed 3+ expression. It can be concluded that in breast carcinoma samples from cats and women, the change in the expression of BRCA2 is more frequent than that of RAD51 and the cat can be a study model for the deregulation of these proteins in the cat.

Keywords: carcinomas, histological grading, molecular biology.

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias de glândulas mamárias são consideradas muito frequentes em gatas não castradas, e apresentam altas taxas de morbidade, mortalidade e potencial metastático (CASSALI et al., 2018). Os dados epidemiológicos sobre neoplasias em felinos são normalmente originados de países desenvolvidos, como por exemplo Estados Unidos da América, Reino Unido e Holanda, que comumente castram precocemente os animais de estimação (RUTTEMAN; KIRPENSTEIJN, 2003). Nas gatas, as neoplasias mamárias são classificadas como o terceiro tipo mais incidente, depois de tumores cutâneos e intestinais (OLIVEIRA FILHO et al, 2010; CASSALI et al., 2018). Os dados epidemiológicos sobre neoplasias mamárias em gatas são dependentes de vários fatores, incluindo exposição hormonal, idade, raça e uso de progestágenos exógenos (AMORIM et al, 2004; LANA et al, 2007; NUNES et al, 2017).

Cerca de 85% das neoplasias mamárias em gatas são malignas e agressivas, apresentando alto potencial metastático (LANA et al., 2007; SOARES et al., 2015; GOMES et al, 2019), sendo que características como tamanho, metástase para linfonodos regionais e presença de grande quantidade de tecido necrótico configuram fatores de pior prognóstico para as pacientes (ZAPPULLI, 2008; GIMENEZ et al., 2010).

Além das manifestações clínicas, outros importantes fatores diagnósticos e prognósticos são a classificação histopatológica e a avaliação de marcadores tumorais. A classificação histopatológica já é uma ferramenta bem estabelecida e bastante utilizada na prática clínica, no entanto, há poucos estudos avaliando os marcadores tumorais em neoplasias mamárias felinas (HUGHES; DOBSON, 2012).

Em um período de 40 anos, foram propostas apenas duas classificações oficiais para neoplasias mamárias em gatas sendo que a graduação histopatológica, juntamente ao estadiamento clínico, são as bases do diagnóstico, empregados na rotina clínica oncológica (CASTANAGRO et al, 1998; MATOS, et al., 2012). Dentro deste contexto, estudos avaliando marcadores tumorais associados à análise histopatológica das neoplasias

mamárias podem ser importantes aliados como ferramenta diagnóstica, preditiva e prognóstica nesses tumores (BERGMAN, 2007; JORGE, 2016).

Alguns estudos relacionados a imunomarcção de neoplasias mamárias em gatas já foram conduzidos, encontrando marcação celular para citoqueratina, vimentina, COX-2, Ki-67, (BOSS et al, 2011; JORGE, 2016). Assim, a presente pesquisa pretende relacionar de forma inédita, o tipo histológico de neoplasias mamárias em mulheres e gatas com a expressão dos imunomarcadores para as proteínas RAD51 e BRCA2 visando maior conhecimento sobre o comportamento tumoral e a possibilidade de proporcionar um modelo experimental mais semelhante a mulher, e futuros tratamentos com maior precisão para ambas as espécies.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.2 Anatomia, Morfologia e Histologia da Glândula Mamária de gatas

A glândula mamária é constituída por dois componentes teciduais: o estroma e o parênquima (Figuras 1 e 2). O primeiro representa o tecido de sustentação que abriga vasos sanguíneos e fibras nervosas em seus trajetos intramamários, sendo considerado um tecido conjuntivo intersticial. Já o parênquima possui as unidades morfofuncionais (adenômeros ou alvéolos), responsáveis pela secreção do leite. Os lóbulos galactóforos da glândula mamária são compostos pelos alvéolos que aumentam no período de lactação. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Os ductos lactíferos são responsáveis pelo transporte do leite, sendo que cada um destes recebe a secreção de diferentes lobos mamários por pequenos ductos excretorios originados de cada lóbulo da glândula mamária. Este sistema de ductos converge para um conjunto de seios glandulares, os quais se comunicam com o óstio papilar. Na espécie felina, são observadas de cinco a sete aberturas na extremidade de cada mamilo ou papila (KONIG; LIEBICH, 2004; RAHARISON; SAUTET, 2007).

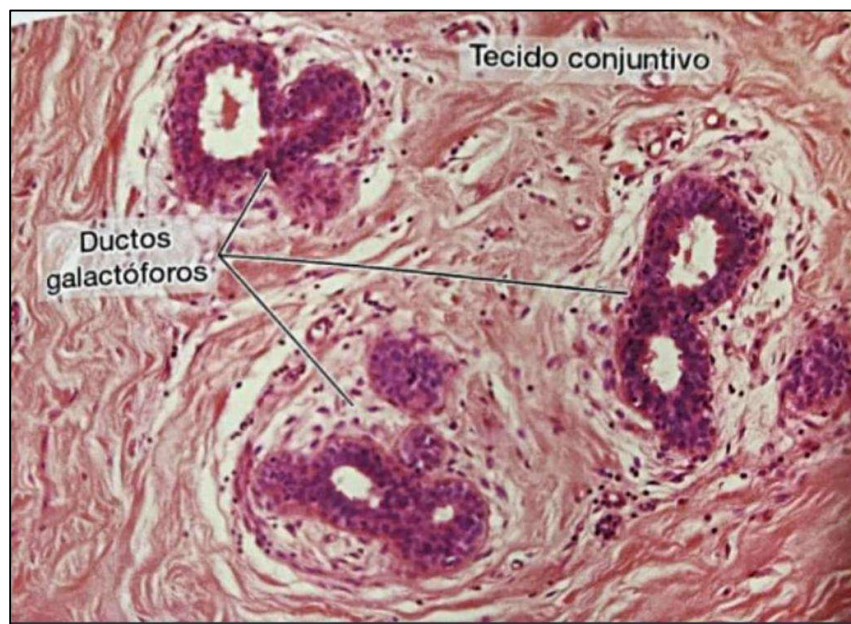


Figura 1: Formação de glândula mamária representada por ductos galactóforos (setas) e tecido conjuntivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO,2013).

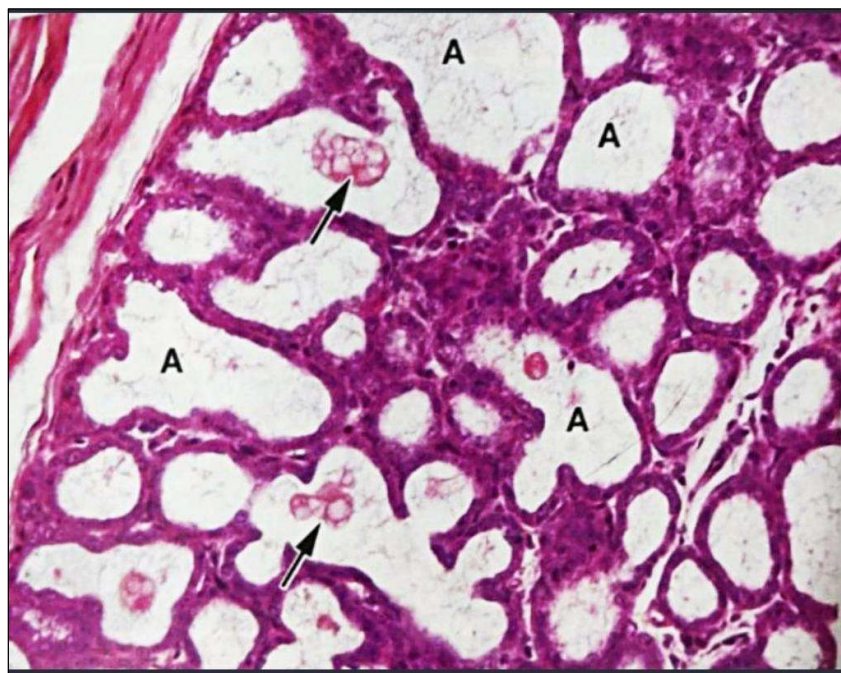


Figura 2: Tecido mamário em período de lactação mostrando maior número de alvéolos. (A): crescimento de alvéolos. Setas indicando secreção no interior dos alvéolos (JUNQUEIRA; CARNEIRO,2013).

A gata tem duas cadeias mamárias (direita e esquerda), sendo compostas por quatro pares de glândulas, sendo dois torácicos e dois abdominais. A

drenagem linfática dos dois pares intermediários pode ser direcionada tanto para os linfonodos axilares quanto para os inguinais superficiais. O primeiro par (torácico cranial) drena para os linfonodos axilares e no caso do par distal (abdominal caudal), para os linfonodos inguinais. Além disto, nos três primeiros pares há possibilidade de direcionamento para os linfonodos esternais craniais. Não há evidências da existência de vasos linfáticos conectando ambas as cadeias (Figura 3) (MAGALHÃES, 2009).

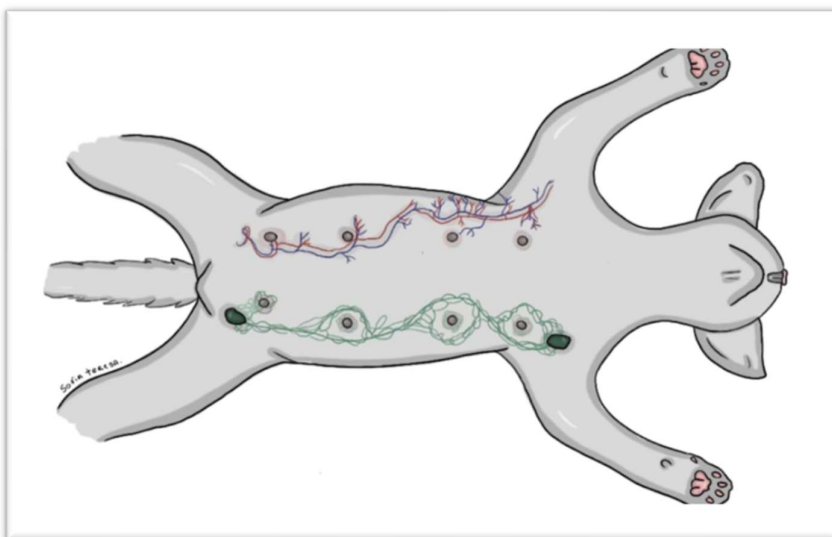


Figura 3: Disposição das Cadeias mamárias na espécie felina (VILARDI et. al., 2023)

Com relação aos vasos, as glândulas torácicas são providas de sangue arterial pelos vasos axilares, intercostais (lateralmente) e torácicos internos (medialmente), enquanto a drenagem venosa destas glândulas ocorre pela parede do tórax através das veias torácicas internas ou intercostais. Infelizmente esse padrão venoso pode transportar células tumorais das mamas para a cavidade torácica. Com relação às glândulas abdominais seu suprimento se dá pelos vasos epigástricos superficiais (cranial e caudal). É importante lembrar que ocorrem anastomoses entre as glândulas homolaterais, mas não entre as duas cadeias esquerda e direita (JOHNSTON et al, 2001; VILARDI et al, 2023).

2.2 Epidemiologia das Neoplasias Mamárias em Mulheres

O câncer de mama é um grupo heterogêneo de doenças, com comportamentos distintos apresentando variadas manifestações clínicas e morfológicas, diferentes formas genéticas e consequentes diferenças nos fatores preditivos e prognósticos. As entidades proliferativas nos lóbulos e ductos da mama inclui hiperplasia, hiperplasia atípica, carcinoma in situ e carcinoma invasivo. Dentre esses últimos, o carcinoma ductal infiltrante é o tipo histológico mais comum e compreende entre 80 e 90% do total de casos (WHO,2020).

As neoplasias mamárias são o tipo tumoral mais incidente em mulheres mundialmente, com aproximadamente 2,3 milhões de casos novos estimados em 2020, o que representa 24,5% dos casos novos por câncer em mulheres. O câncer de mama é também a primeira causa de morte por câncer em mulheres no Brasil, com incidência e mortalidade crescendo progressivamente a partir dos 40 anos (INCA, 2021).

No Brasil, excluídos os tumores de pele não melanoma, a neoplasia mamária é a mais incidente em mulheres de todas as regiões, com taxas mais altas nas regiões Sul e Sudeste. Para cada ano do triênio 2023-2025 são estimados 73.610 casos novos, o que representa uma taxa ajustada de incidência de 41,89 casos por 100.000 mulheres (INCA, 2022).

2.3 Epidemiologia das Neoplasias Mamárias em Gatas

Apesar de menor frequência do que a neoplasia mamária em cadelas, o tumor de mama em gatas é responsável por cerca de 17% das desordens oncológicas na espécie estando atrás apenas de neoplasias hematopoiéticas e cutâneas (RUTTEMAN et al, 2013).

Vale ressaltar que esse dado é oriundo de estudos de países desenvolvidos. Nesses países, a castração precoce é comumente realizada, diminuindo a incidência dessas neoplasias. No entanto, dados de países que culturalmente não castram as gatas precocemente, reportam as neoplasias mamárias como as mais frequentes (LANA et al., 2007; SOARES et al., 2015). Além disso a porcentagem de neoplasias mamárias malignas na espécie felina é muito superior às reportadas em cadelas. É descrito na literatura prévia que as

taxas de malignidade em gatas variam de 85% a 93% dentre todos os tumores mamários. Machos também podem ser afetados, representando entre 1% e 5% dos casos (LANA et al, 2007).

A maior malignidade das neoplasias mamárias em felinos, está relacionada a uma maior ocorrência de metástases por via linfática, tendo-se notado que mais de 80% das gatas com neoplasias mamárias malignas apresentam metástases em um ou mais órgãos, com sobrevida de aproximadamente um ano. Entre os órgãos mais afetados, pode-se destacar os linfonodos regionais e o pulmão, sendo que fígado, diafragma, glândulas adrenais, rins e ossos também podem ser acometidos (RUTTEMAN et al, 2003).

A lesão benigna mais encontrada em gatas jovens é denominada fibroadenomatose mamária felina que se caracteriza por uma proliferação acelerada do estroma e epitélio ductal (SORENMO, 2011).

Sua maior incidência é em gatas jovens, até 2 anos de idade, sendo mais comumente descrita em fêmeas no início da gestação ou naquelas que estão ciclando (SOUSA et al, 2002) Esta apresentação também ocorre com alguma nos felinos tratados com progestágenos (machos são incluídos neste grupo) e em gatas gestantes, estando a mesma associada a níveis elevados de progesterona exógena e/ou endógena. Apesar de apresentar comportamento benigno, o grande volume dos nódulos pode debilitar ou até mesmo incapacitar a vida do animal (SORENMO, 2011)

Em relação a idade, existe uma grande variação, podendo acometer gatas de 9 meses a 23 anos. No entanto, a idade média das gatas comumente acometidas por neoplasias mamárias varia de 10 a 12 anos (AMORIM, 2004).

Estudos epidemiológicos revelaram a existência de predisposição racial para o desenvolvimento de neoplasias mamárias, visto que as raças Americano de pelo curto e Siamês apresentaram maiores taxas de incidência que as demais raças. Em particular, gatos siameses podem ter um risco relativo até duas vezes superior ao de outras raças (AMORIM, 2004; ZAPPULLI 2008; SORENMO, 2011;).

2.3.1 Fatores Hormonais

Já se sabe que o surgimento de neoplasias mamárias em gatas está ligado a exposição hormonal. Em gatas ovariectomizadas até aos 6 meses têm uma redução de até 91% no risco de desenvolverem neoplasias mamárias, já as que passam pelo mesmo procedimento até um ano de idade sofrem uma redução de até 86% nesse risco (NUNES et al, 2017).

A ovariectomia após este momento não tem papel significativo na prevenção de neoplasias mamárias, no entanto atua na prevenção de outras desordens do trato reprodutivo como a piometra e gestação não planejada pelos tutores, problema importante de saúde pública (SCHNEIDER et al, 1969; MORRIS et al, 1998; FONSECA; DALECK, 2000).

Ainda sobre a fisiopatologia, o tecido mamário sem alterações apresenta receptores para estrógeno e progesterona, em concentrações relativamente altas, mostrando claramente sua dependência hormonal. Já a análise de tecidos mamários tumorais verificou que as neoplasias benignas mantêm elevados níveis de receptores para estrógeno, enquanto os tumores malignos demonstram uma diminuição considerável dos receptores para este hormônio apresentando-se cerca de mais de metade dos felídeos sem qualquer tipo de receptor (MORRIS et al, 1998; LANA ET AL., 2007).

Deste modo sugere-se uma perda da dependência de estrógeno e progesterona nas neoplasias malignas, implicando assim no desenvolvimento de neoplasias mais agressivas e menos diferenciadas (RUTTEMAN et al, 2003). Ainda com relação a etiologia ligada a fatores hormonais, o uso de contraceptivos exógenos tem grande relação com o surgimento de alterações no sistema reprodutivo e hormonal. (NUNES et al, 2017; PICKARD et al, 2023).

2.3.2 Fatores Genéticos

Fatores genéticos são importantes no desenvolvimento nas neoplasias mamárias em gatos e estão relacionados a alterações de proto-oncogenes e genes supressores tumorais (CULLEN et al, 2017). Os proto-oncogenes regulam positivamente a proliferação celular em resposta a estímulos fisiológicos do

organismo. Esses genes podem sofrer processos de mutações, resultando em uma forma de proteína permanentemente ativa, não respondendo ao feedback celular negativo, produzindo células e proteínas de forma contínua e independente. Quando há mutação desse gene, ocorre uma mudança na sua denominação, e passam a ser chamados apenas de oncogenes. Essas mutações geralmente são dominantes, sendo necessária mutação de apenas um dos alelos para que o fenótipo neoplásico ocorra (MACLEOD, 2000).

O maior destaque tem os oncogenes que são responsáveis tanto pela codificação de fatores de crescimento como de receptores celulares para tais. O ponto crítico desse processo ocorre quando são super expressos, levando a uma divisão celular descontrolada (MISDORP, 2002).

2.3.3 Fatores Dietéticos

A hipótese da influência da dieta no desenvolvimento de neoplasias mamárias em gatas é bastante estudada e aceita (ZUCCARI et al, 2001). A obesidade, dietas ricas em gordura no início de vida do animal, alimentação caseira (devido à alta ingestão de carnes bovinas e suínas) têm sido associadas com aumento do risco de tumor mamário nas gatas (PEREZ-ALENZA, et al, 1998; MOORE, 2007).

De acordo com NUNES et al. (2011), os alimentos ofertados às gatas que incrementavam a ingestão calórica, além da dieta comercial, eram carne bovina, frango, peixe, fígado, embutidos, leite e arroz, sendo que a maioria se caracterizava por serem restos alimentares e com bastante gordura animal. Além de avaliar a obesidade, constatou-se que dietas mistas e desequilibradas (dietas caseiras) mostraram maior influência na incidência de tumores mamários. Este trabalho analisou as dietas de gatas já diagnosticadas com neoplasias mamárias.

Como resultado observou-se que dezesseis gatas (66,7%) com tumores mamários malignos eram alimentadas com dieta mista (comida caseira e ração industrializada), o que incrementa o consumo calórico, enquanto cinco (20,8%) recebiam apenas ração industrializada e três (12,5%) ingeriam exclusivamente dieta caseira.

2.4 Diagnóstico

2.4.1 Apresentação Clínica

Os primeiros achados relatados pelos responsáveis ou alterações encontradas durante atendimento veterinário são nodulações em cadeia mamária de tamanhos variáveis, podendo já ser encontrados nódulos ulcerados ou até mesmo alterações decorrentes de metástase (CASSALI, 2018)

As massas frequentemente se apresentam firmes, nodulares e invasivas com aderência à pele e à parede abdominal subjacente (figura 3). Mais de 50% dos pacientes acometidos têm mais de uma glândula envolvida, como forma de extensão direta ou tumores múltiplos. O tamanho dos tumores pode variar, desde pequenos nódulos com 0,5cm de diâmetro, até tumores com mais de 15cm no seu maior eixo (DIAS, 2006; ZAPPULLI, 2008).

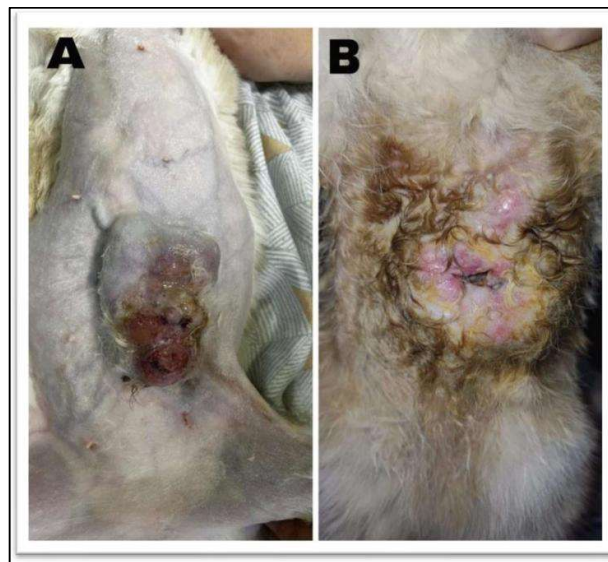


Figura 4: (A) Nódulo mamário em gata em mamas torácicas caudais e abdominais craniais. (B) Nódulo mamário ulcerado em gata sem possibilidade de delimitação (Fonte: Professor Dr. Carlos Eduardo F. Alves).

2.4.2 Exame Citológico

Apesar das lesões macroscópicas sugerirem o diagnóstico de neoplasia mamária, a diferenciação entre possíveis diagnósticos diferenciais, só é possível através da realização de avaliação microscópica. O exame citológico funciona como um exame de triagem, indicada para distinguir processos hiperplásicos, inflamatórios, neoplásicos e displásicos, sendo frequentemente usado na rotina por ser de fácil e rápida execução, pouco oneroso e garantir resultado em um curto período. Uma das citologias utilizadas para patologias mamárias é a PAAF em lesões preferencialmente sólidas e não císticas (PINTO, 2009).

Apesar de pouco agressivo e das características citadas, a citologia é um exame que contém algumas limitações. A perda da arquitetura tecidual impossibilita muitas vezes a visualização da relação intercelular dos tecidos. Deste modo, deve ser tido em conta todo o contexto clínico do animal. Para além disso, é essencial compreender que os resultados são sempre dependentes de vários fatores da lesão e do patologista. Sendo assim, a citologia é considerada, pela comunidade científica, como um complemento à histologia, sendo esta o padrão ouro para o diagnóstico de neoplasias mamárias (CASSALI et al, 2007).

2.4.3 Classificação Histopatológica

As neoplasias mamárias felinas são bem menos heterogêneas se comparadas as da espécie canina devido a proliferação de células mioepiteliais ser raramente encontrada. Elas tipicamente são classificadas de acordo com o Instituto de Patologia das Forças Armadas dos Estados Unidos da América em cooperação com a Organização Mundial de Saúde (ZAPPULLI et al, 2008).

Para fins didáticos e de prognóstico podem ser divididas conforme a seguinte descrição proposta por Zappulli (2008).

2.4.3.1 Hiperplasia e Displasia: consiste no aumento do número de células do tecido mamário, podendo resultar na formação de uma neoplasia benigna ou ainda no aumento do tamanho desse órgão. Já a displasia confere

desenvolvimento celular anormal, que pode gerar a má-formação tecidual. Caracterizam-se nesse grupo a ectasia ductal, hiperplasia lobular, epitelióse, papilomatose e alterações fibroadenomatosas (representada no item 2.2)

2.4.3.2 Neoplasias Epiteliais Benignas: apesar de serem raros na espécie felina, lesões benignas também podem ser encontradas. Adenoma simples, Adenoma ductal, Papiloma ductal são as alterações observadas.

2.4.3.3 Neoplasias Epiteliais Malignas: neste grupo encontram-se cerca de 85 a 95 % das neoplasias mamárias de felinos, inclusive mais de um tipo, pode estar presente no mesmo animal.

a) Carcinoma *in situ*: o termo carcinoma *in situ* foi muito tempo usado para caracterizar carcinomas em estágio inicial nas espécies felinas e caninas, e em muitos casos ocorria uma denominação errada para lesões displásicas e hiperplásicas. Devido a isso e a diferença dessa classificação comparada a medicina humana, os autores decidiram por abolir essa denominação (ZAPPULLI et al, 2008).

b) Carcinomas simples: carcinomas de células epiteliais luminais são o tipo mais comum de neoplasia mamária em felinos.

-Carcinoma Tubular: tipo histológico mais comum em gatos. As células epiteliais se encontram distribuídas em padrão dos túbulos mamários. É mais frequente o grau III em carcinomas tubulares, dessa forma, um comportamento tumoral mais agressivo é esperado.

-Carcinoma Tubulopapilar: neste tipo encontram-se papilas adentrando no lúmen, o que não ocorre no tipo anterior. São frequentemente agressivos, infiltrativo e metastáticos, especialmente o grau III.

-Carcinoma Sólido: as células epiteliais estão agrupadas em ninhos e ilhas sem visualização do lúmen. Pela formação tubular, seu escore será sempre II ou III.

-Carcinoma Micropapilar invasivo: as células neoplásicas formam agregados irregulares e pequenas papilas que não são sustentadas por um

estroma fibrovascular. É um tipo de carcinoma incomum nos felinos, no entanto, apresenta comportamento extremamente agressivo.

-Comedocarcinoma: caracterizado por apresentar um padrão com vários grupos celulares semelhantes a nódulos. Estes são bem definidos, ocupam áreas centrais delimitando áreas de necrose, cercados por células neoplásicas epiteliais. É um tipo comum de neoplasia mamária felina, de comportamento altamente metastático.

-Carcinoma anaplásico: tipo raramente encontrado em felinos. É o tipo histológico de comportamento mais agressivo, no qual células tumorais invadem o tecido normal ou hiperplásico/displásicos e tecido periglandular.

c) Carcinomas não simples: abrangem o carcinoma ductal e o carcinoma papilar intraductal cujo comportamento não foi ainda bem elucidado em felinos.

d) Neoplasias epiteliais malignas – Tipos especiais: os tipos especiais são raramente encontrados em felinos. Neste grupo estão o carcinoma de células escamosas, carcinoma adenoescamoso, carcinoma mucinoso, carcinoma secretório, carcinoma de células espinhosas, carcinoma inflamatório.

e) Neoplasias mesenquimais de glândula mamária: sarcomas de glândulas mamárias podem se desenvolver do estroma do tecido mamário ou da derme e tecido subcutâneo que o envolvem, podendo estar presente osteossarcoma, condrossarcoma, fibrossarcoma, hemangiossarcoma, carcinossarcoma.

2.4.4 Graduação Histológica

A graduação histológica é realizada de acordo com o grau de diferenciação morfológica, podendo atribuir a neoplasia seu grau de malignidade fornecendo informação prognóstica. Deste modo classifica-se em: grau I (bem diferenciado), grau II (moderadamente diferenciado) e grau III (pouco diferenciado) (tabela 1).

Os critérios levados em consideração são: formação tubular, número de mitoses e pleomorfismo nuclear (ELSTON & ELLIS, 1991).

Critério	Escore
A. Formação tubular	
Túbulos representam mais que 75% do tumor	1
Túbulos representam de 10 a 75% do tumor	2
Túbulos representam menos que 75% do tumor	3
B. Pleomorfismo celular	
Uniforme, regular, núcleo pequeno com pequeno nucléolo	1
Moderada variação de tamanho e forma nuclear, núcleo hipercromatoso, presença de nucléolo	2
Acentuada variação do tamanho do núcleo, núcleos hipercromatosos, presença de paracromatina com um ou mais nucléolo proeminente	3
C. Contagem Mitótica (em 10 campos de grande aumento)	
0,59 mm (0,274 mm ²)	
0-9	1
10 a 19	2
>19	3
Graduação Histológica (Escore total A + B +C)	Total
I (baixo grau, bem diferenciado)	3 a 5
II (grau moderado, moderadamente diferenciado)	6 a 7
III (alto grau, pobremente diferenciado)	8 a 9

Tabela 1: Classificação de Graduação Histológica Adaptada de Elston & Ellis (1991)

2.4.5. Exames Complementares

Além dos exames específicos já citados, é essencial para o transcorrer do tratamento, a realização de exames de imagem e laboratoriais, que permitirão determinar o estadiamento clínico do paciente e a presença de síndromes

paraneoplásicas que frequentemente ocorrem na presença de neoplasia (MATOS, 2012).

Sabendo-se da capacidade metastática de neoplasias mamárias em felinos, exames de imagem são fundamentais. A realização de exames radiográficos torácicos é fundamental para pesquisa de metástase pulmonar, acompanhando de ultrassonografia abdominal para estudo desta cavidade. Também é possível e indicado a realização do exame de Tomografia Computadorizada, quando este encontra-se disponível (MORRIS, 2013)

Os exames de sangue tais como hemograma completo, dosagem de proteínas séricas, avaliação hepática e renal além de determinar o estado geral do paciente, pode revelar a ocorrência de doenças concomitantes (MATOS, 2012).

2.4.6 Imuno-histoquímica

A Imuno-histoquímica é um exame que permite a detecção de antígenos específicos e imunofenotipagem de tecidos e sangue ou agentes infecciosos. O objetivo deste reconhecimento em materiais biológicos é identificar e classificar células de interesse dentro de uma população celular morfológicamente heterogênea (ou aparentemente homogênea). Para conseguir tal resultado são utilizados reagentes altamente específicos para a demonstração de vários antígenos tissulares ou celulares (SCHMITZ et al, 2010).

A visualização do complexo antígeno-anticorpo é possível pela adição de um cromógeno conjugado ao anticorpo e enzima que pode então ser observado ao microscópio (SARTURI et al, 2012).

É fundamental na avaliação confirmatória de um determinado diagnóstico, sendo utilizado também na avaliação prognóstica de pacientes, especialmente na rotina oncológica (SCHMITZ et al, 2010).

Alguns marcadores são utilizados para identificar moléculas-alvo para tratamentos oncológicos modernos e individualizados, beneficiando os pacientes, como os receptores de estrogênio e progesterona e oncoproteína c-erbB-2/HER2, BRCA1, BRCA2 em tumores mamários, o CD20 nos linfomas, o EGFR e VEGFR em diversos tipos de tumores, entre outros (FERRO, 2014).

A detecção de antígenos, também podem ser utilizados para identificar o provável comportamento de uma determinada neoplasia, como por exemplo a ausência de marcação para BRAC1 e BRCA2 em neoplasias mamárias (BORGES et al, 2012).

A técnica da imuno-histoquímica tem valor preditivo primordial para determinar a forma molecular de carcinomas mamários em mulheres e dessa forma auxilia a escolha do tratamento mais adequado. Os marcadores já são estabelecidos e através de suas marcações para: receptor de estrogênio, receptor de progesterona, onco-proteína HER2 / c-erbB-2 e antígeno Ki-67 é possível definir um dos 4 perfis moleculares do adenocarcinoma de mama -tipos LUMINAL A, LUMINAL B, HER2 ou BASAL / TRIPLO NEGATIVO (MILLANTA ET AL, 2005; BORGES et al, 2012).

2.4.6.1 RAD51

O gene RAD51 e sua família são reguladores-chave da integridade do DNA através de diversas funções no reparo de quebra de fita dupla, estresse de replicação e meiose. Seu trabalho consiste em encontrar e invadir sequências homólogas de DNA para permitir o reparo preciso e oportuno do mesmo. Tão importante é seu papel que a desregulação do RAD51 e seus parálogos está associada a doenças como câncer e anemia de Fanconi (TOMBLINE; FISHEL, 2002).

A proteína RAD51, produzida pelo gene homônimo, é fundamental no processo de reparo do DNA, principalmente na etapa de recombinação homóloga, onde uma sequência de DNA não danificada é utilizada como molde para o reparo de uma sequência danificada. Neste processo, a proteína RAD51 atua formando filamentos proteicos na região danificada do DNA, contribuindo para o reconhecimento e o reparo através do emparelhamento da sequência homóloga não danificada (BONILLA et al, 2020).

Outra função importante da proteína RAD51 se refere à sua participação na correta separação e rearranjo dos cromossomos durante o processo de meiose da divisão celular dos gametas. A expressão da proteína RAD51 tem sido avaliada através de técnicas como imuno-histoquímica e *western blot*,

sendo utilizada como um importante marcador da capacidade de reparo do DNA nas células (BONILLA et al, 2020).

No contexto da oncogênese, mutações em todos os hRAD51 (denominação para RAD51 de humanos) parálogos que se caracterizam por mediadores conservados de RAD51, apoiando sua função no reparo, meiose e replicação de quebra de fita dupla de DNA, foram identificados em cânceres (GODIN et al, 2016).

2.4.6.2 BRCA 2

Os genes *BRCA1* (*breast cancer 1*) e *BRCA2* (*breast cancer 2*) são classificados como genes supressores de tumor, estando presentes no tecido mamário e em outros sítios como o ovário, sendo ligados aos aspectos centrais do metabolismo celular, tais como reparo de danos ao DNA, regulação da expressão gênica e controle do ciclo celular. O *BRCA1* localiza-se no braço longo do cromossomo 17 na posição 21 (17q21) e codifica uma proteína com 1.863 aminoácidos. Seu principal trabalho consiste na reparação do DNA na recombinação homóloga, reparo por excisão de nucleotídeos (REN) e na regulação do ciclo celular, sendo expresso mediante inconsistência genômica mediada por estrogênio (COELHO et al, 2018).

Já o *BRCA2* situa-se no braço longo no cromossomo 13 na posição 12.3 (13q12.3) e codifica uma proteína com 3.428 aminoácidos, e através da interação com a RAD51 repara as quebras na dupla fita de DNA (COELHO et al, 2018; CASTRALLI, 2019).

No entanto, variações do gene *BRCA2* podem aumentar os riscos de neoplasia mamária em uma síndrome hereditária de câncer de mama e ovário. Mutações *BRCA2* são geralmente inserções ou deleções de um pequeno número de pares de bases de DNA no gene, resultando em proteínas codificadas anormais sendo incapaz de atuar na proteção do genoma. Como resultado, há um aumento nas mutações devido à falta de reparos na síntese do DNA e desta forma, algumas mutações podem fazer com que as células se

dividam descontroladamente iniciando a oncogênese (CASTRALLI et al, 2019; SHIMIZU et al, 2000).

Um estudo brasileiro encontrou variantes genéticas dos genes supressores de tumor *BRCA1* e *BRCA2* em células somáticas e em amostras de sangue de gatas diagnosticadas com carcinoma mamário (GOVONI et al, 2021). Algumas dessas variantes, especialmente as encontradas em linhagem germinativa, podem representar fatores de predisposição para o carcinoma mamário em gatas, devido ao seu relativo impacto funcional no DNA e às características hereditárias, sendo um importante fator de risco para esse tipo de neoplasia (GOVONI et al, 2021). Esse estudo identificou mutações germinativas no gene *BRCA2*, indicando um componente hereditário no desenvolvimento do carcinoma mamário.

No entanto, o mecanismo exato em que essas mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* podem levar a uma maior chance de desenvolvimento de neoplasias em gatos ainda não é totalmente compreendido (WIESE et al, 2013).

2.4.6.3 Interação entre *RAD51* e *BRCA2*

O gene *BRCA2* desempenha um papel duplo na regulação das ações do gene *RAD51*, que codifica uma proteína homônima, essencial para a recombinação homóloga e reparo do DNA. Inicialmente as interações entre o *RAD51* e as regiões *BRC3* ou *BRC4* do *BRCA2* bloqueiam a formação de filamentos de nucleoproteínas. Em segundo lugar, o transporte de *RAD51* para o núcleo é defeituoso nas células que transportam um truncamento de *BRCA2* associado ao câncer, dessa forma a proteína *RAD51* não pode atuar em casos de quebra dupla de DNA no processo de recombinação homóloga (LIM et al, 1996; CHEN et al, 1999).

Assim, o *BRCA2* regula tanto a localização intracelular como a capacidade de ligação ao DNA do *RAD51*. A perda destes controles após a inativação do *BRCA2* pode ser um evento chave que leva à instabilidade genômica e à carcinogênese (DAVIES et al, 2001).

3. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho propôs como objetivo geral analisar a ocorrência da marcação tecidual das proteínas RAD51 e BRCA2 em neoplasias mamárias em mulheres e gatas.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliando os resultados das imuno-histoquímicas, entender mais sobre o processo de carcinogênese na espécie felina;
- Através da comparação da marcação (score, localização, distribuição) imuno-histoquímica das duas espécies, indicar se a gata pode ser usada como modelo de estudo para mulheres.

4.MATERIAL E MÉTODOS

Para realização desta pesquisa, este projeto tem a autorização do Comitê de Ética de Utilização de Animais – UNESP Botucatu (Protocolo CEUA 0365/2023).

4.1 Análise in silico dos dados de mulheres

Como primeira etapa dessa pesquisa, foi realizada uma análise *in silico*, com os dados do *The Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/>), sobre a marcação do BRCA2 e RAD51 em carcinomas mamários de mulheres. Primeiro, foi realizada uma busca sobre os marcadores BRCA1 e RAD51, individualmente, a aba de busca. Posteriormente, no sumário, foi selecionado o item “*pathology*”, e dentre as opções, selecionou-se os casos de “*breast cancer*”. Foram encontrados 11 casos de carcinoma mamários de mulheres com expressão de BRCA2 e 20 casos com expressão de RAD51.

Foi avaliado o perfil de marcação de cada um dos casos, e os dados disponível foram utilizados, como idade, subtipo histológico e padrão de marcação. Os dados foram tabulados e as imagens de hematoxilina e eosina e imuno-histoquímica foram selecionados para representação dos dados.

4.2 Critérios de Inclusão

Foram incluídas nessa pesquisa de caráter retrospectivo, casos de gatas acometidas por neoplasias mamárias, provenientes do setor de patologia da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) / Paraíba. Foram selecionados pacientes que apresentavam diagnóstico prévio de carcinoma mamário e que tivessem material fixado em blocos de parafina, contendo material para análise de imuno-histoquímica. Foi realizada análise histológica e selecionados casos apenas com diagnóstico de carcinomas mamários.

4.3 Avaliação morfológica e graduação histopatológica

Para análise histopatológica, as cadeias mamárias após mastectomia foram coletadas imediatamente após procedimento cirúrgico. Foi realizada análise macroscópica e posteriormente, a realização de secções nos tumores para impregnação da parafina. Para isso o órgão ou um pedaço deste, após a fixação, foi desidratado em uma série alcoólica de concentração crescente e diafanizado em xilol em histotécnico automático (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha). Posteriormente as amostras foram dispensadas em uma central de inclusão semi-automática (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha) e os blocos foram confeccionados. Por fim, os blocos de parafina foram cortados em micrótomo semi-automático (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha), em fatias de 4µm de espessura. Os cortes foram dispostos em lâminas de vidro e corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). O processo descrito foi realizado pelo Setor de Patologia da Universidade Federal de Campina Grande – Paraíba.

Os blocos de parafina foram cedidos à esta pesquisa pela professora da mesma instituição, Dra. Gabriela Noronha de Toledo.

Já no setor de Patologia da Unesp *campus* Botucatu, a classificação histopatológica foi realizada de acordo com Zappulli (2008). As amostras foram avaliadas em microscópio óptico, em aumento de 40x por dois observadores independentes. A graduação histopatológica foi realizada e todos os carcinomas avaliados foram classificados de acordo com Elston e Ellis (1991).

4.4 Técnica de Imuno-histoquímica

Para a realização da técnica de imuno-histoquímica, as amostras selecionados foram cortadas em micrótomo com espessura de 4µm e distendidos em lâminas próprias para imuno-histoquímica (StarFrost, Knittel, Braunschweig, Alemanha) com o objetivo de promover maior aderência dos cortes às lâminas de vidro, evitando assim a perda do material durante o processamento. As lâminas foram estocadas em estufa com temperatura entre 55 e 58°C por 24 horas, e transferidas para cubas de vidro vertical a fim de realizar-se a técnica de imuno-histoquímica. A técnica seguiu o protocolo do Laboratório de Imuno-histoquímica do Serviço de Patologia da FMVZ – UNESP – Botucatu. A recuperação antigênica foi realizada em panela de pressão (Pascal, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA) e o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio 8% diluídos em álcool metílico. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com o reagente comercial Protein block (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA). Os anticorpos monoclonais anti-RAD51 e anti-BRCA2 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) foram utilizados na diluição de 1:500 e 1:500, respectivamente.

O controle positivo foi um testículo normal de cão para os dois anticorpos, baseado na indicação do *The Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/>) e para controle negativo, a imunoglobulina a imunoglobulina de camundongo foi utilizada, em substituição ao anticorpo primário.

4.5 Análise Imuno-histoquímica

A análise imuno-histoquímica foi realizada de acordo com a literatura prévia para o câncer de mama em mulheres (SÖDERLUND et al., 2007), com adaptações. A intensidade da marcação foi classificada como negativa, fraca, moderada ou forte, e a porcentagem de células tumorais foi categorizada da seguinte forma: negativa, 1–25%, 26–50%, 51–75% e > 75%. Após caracterização de acordo com a literatura prévia, as amostras sem marcação

receberam o escore final 0. Amostras com intensidade de marcação fraca à forte com percentagem de expressão até 25% receberam o escore 1+. Amostras com marcação fraca e moderada e expressão entre 26 a 50%, receberam escore 2+. Amostra com marcação forte de 26 a 50% ou marcação fraca, moderada ou forte entre 51 a 75% ou expressão >75% com intensidade fraca, receberam escore 3+. Amostra com expressão maior que >75% e expressão moderada ou forte, receberam escore 4+.

4.6. Análise estatística

Foi realizada estatística descritiva, com dados apresentando por frequência e percentagem. Os dados qualitativos foram analisados pelo teste de Fisher ou Qui-quadrado, utilizando o programa computacional GraphPad Prism 8.0. Os valores de p foram considerados significativos com esse foi menor que 0.05.

5. RESULTADOS

5.1 Dados dos carcinomas mamários de mulheres

Para o BRCA2, 11 casos disponíveis foram selecionados. Nesses tumores, foi identificada expressão citoplasmática, membranosa e nuclear de BRCA2 nas amostras de tumores de mulheres. Dentre elas, uma amostra (3/11) apresentou expressão 3+ e oito amostras com expressão 4+ (8/11) (Figura 5). Os dados remanescentes foram incluídos na tabela 2

Identificação Do paciente	Idade	Diagnóstico Histopatológico	Imuno localização De BRCA2	Intensidade	Porcentagem	Score final
1585	93	Carcinoma ductal	Nuclear	Moderado	>75%	4+
2898	41	Carcinoma Lobular	Nuclear	Moderado	>75%	4+
2252	47	Carcinoma Lobular	Nuclear	Moderado	>75%	4+
1916	62	Carcinoma ductal	Nuclear	Moderado	>75%	4+
2428	75	Carcinoma ductal	Nuclear	Moderado	>75%	4+
2174	37	Carcinoma ductal	Nuclear	Moderado	25% - 75%	3+
1939	87	Carcinoma ductal	Nuclear	Moderado	25% - 75%	3+
1910	61	Carcinoma ductal	Citoplasma/ Membrana Núcleo	Moderado	>75%	4+
1874	80	Carcinoma ductal	Nuclear	Fraco	>75%	3+
2392	27	Carcinoma ductal	Nuclear	Moderado	>75%	4+
3257	39	Carcinoma ductal	Nuclear	Moderado	>75%	4+

Tabela 2: Dados comparativos entre histopatologia, imuno-localização, intensidade e porcentagem para BRCA2 em carcinomas mamários de mulheres.

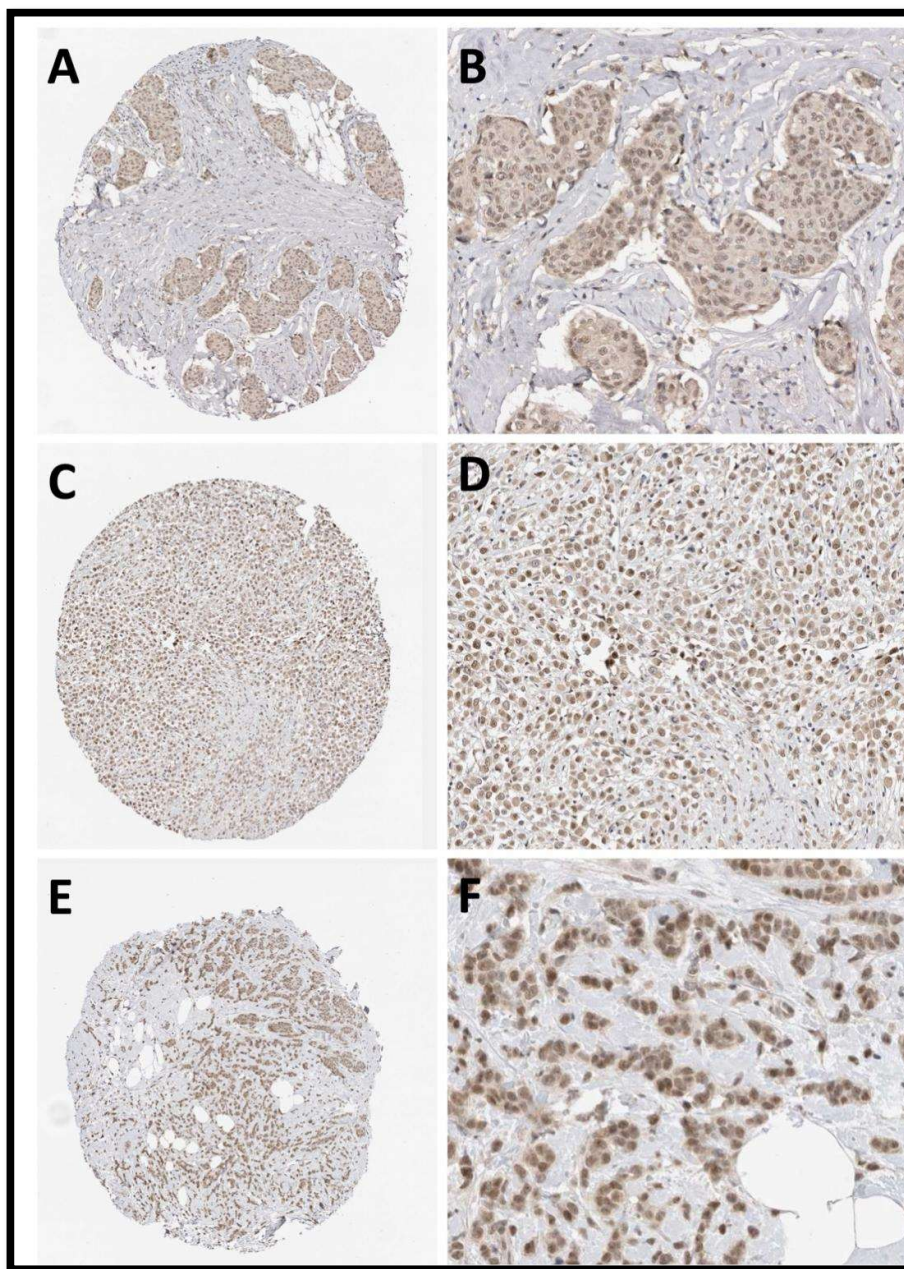


Figura 5. Imuno-histoquímica de amostras de carcinoma mamário de mulheres para o marcador BRCA2. A e B: Amostras de carcinoma ductal de uma paciente com 80 anos, apresentando marcação nuclear 3+. C e D: amostra de carcinoma ductal de uma paciente com 61 anos, com marcação membranosa, citoplasmática e nuclear, com escore 4+. E e F: amostra de um carcinoma lobular em uma paciente com 41 anos, apresentando escore 4+. Crédito da imagem de imuno-histoquímica: The Human Protein Atlas, www.proteinatlas.org. Imagens disponível na seguinte URL: https://www.proteinatlas.org/ENSG00000139618-BRCA2/pathology/breast+cancer#imid_7131996 (acessado em 22 de abril de 2024).

Para o RAD51, 19 casos foram avaliados (tabela 2) Também foi identificada expressão citoplasmática, membranosa e nuclear. Dentre elas, uma não apresentou marcação (1/19), quatro apresentaram marcação 1+ (4/19), cinco apresentaram marcação 2+ (5/19), cinco apresentaram marcação 3+ (3/19) e três apresentaram marcação 4+ (3/19)

Identificação Do paciente	Idade	Diagnóstico Histopatológico	Imuno localização De RAD51	Intensidade	Porcentagem	Score final
1916	62	Carcinoma ductal	Nuclear	Moderado	> 75%	4+
3546	58	Carcinoma Lobular	Nuclear	Moderado	< 25%	2+
3527	39	Carcinoma ductal	Nuclear	Moderado	> 75%	4+
2428	75	Carcinoma ductal	Nuclear	Moderado	< 25%	2+
1775	55	Carcinoma ductal	Nuclear	Moderado	< 25%	2+
1874	80	Carcinoma ductal	Nuclear	Moderado	75% - 25%	3+
2091	40	Carcinoma ductal	Nuclear	Forte	75% - 25%	4+
1939	87	Carcinoma ductal	Nuclear	Fraco	< 25%	1+
1910	61	Carcinoma ductal	Nuclear	Moderado	< 25%	2+
1910	61	Carcinoma ductal	Citoplasma/membrana	Fraco	> 75%	3+
2160	83	Carcinoma ductal	Sem marcação	Negativo	0	0
439	43	Carcinoma Ductal	Citoplasma/Membrana/núcleo	Fraco	< 25%	1+
643	62	Carcinoma Ductal	Citoplasma/membrana	Fraco	> 75%	3+
4193	43	Carcinoma Ductal	Nuclear	Moderado	< 25%	2+
1874	80	Carcinoma Ductal	Citoplasma/membrana	Fraco	< 25%	1+
1268	54	Carcinoma Ductal	Citoplasma/membrana	Fraco	< 25%	1+
4915	40	Carcinoma ductal	Citoplasma/membrana	Fraco	> 75%	3+
4229	66	Carcinoma Lobular	Citoplasma/Membrana	Fraco	> 75%	3+

Tabela 3:Dados comparativos entre histopatologia, imuno-localização, intensidade e porcentagem para RAD51 em carcinomas mamários de mulheres.

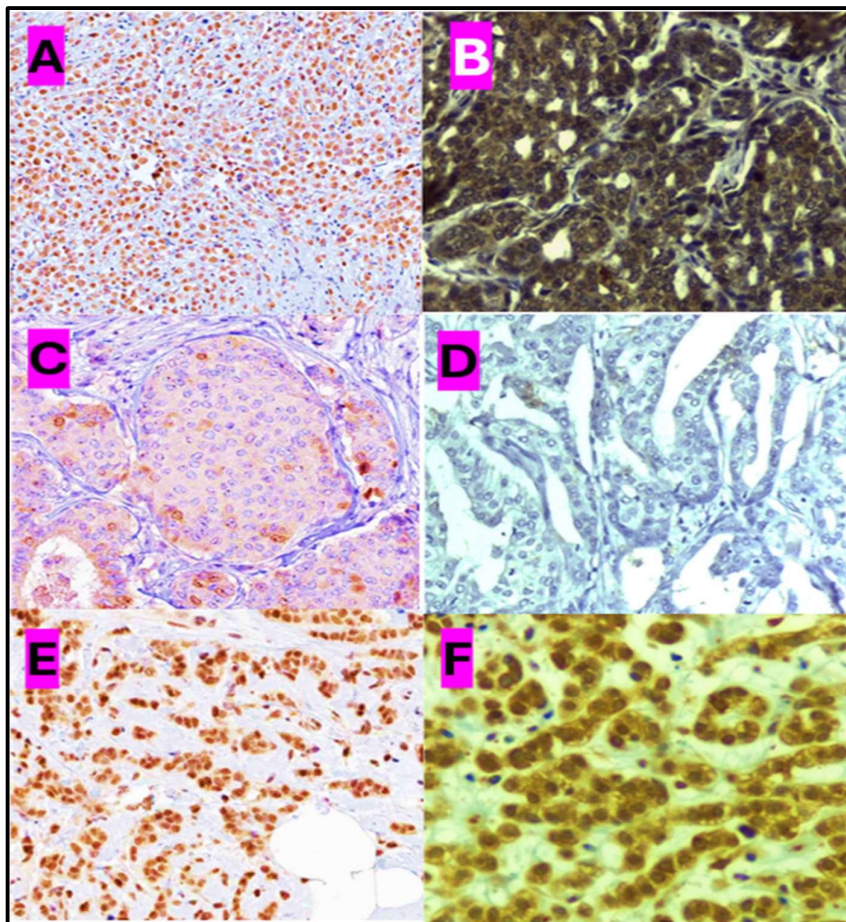


Figura 6. Imuno-histoquímica de amostras de carcinoma mamário de mulheres e gatas para o marcador BRCA2 e RAD51. A e B: marcação positiva de expressão de BRCA (3+) em mulher e gata respectivamente. C e D: marcação positiva para RAD51 (1+) em mulher e gata respectivamente. E e F: marcação positiva de expressão de BRCA (4+) em mulher e gata respectivamente. Crédito da imagem de imuno-histoquímica: The Human Protein Atlas, www.proteinatlas.org.

5.2 Dados dos Carcinomas Mamários em gatas

Das vinte e quatro lâminas de carcinoma mamário de gatas analisadas treze foram classificadas como carcinomas ductais (13/24). Destas, oito apresentaram Grau I, o que caracteriza uma neoplasia de baixo grau e bem diferenciada. As outras cinco apresentaram Grau II, o que já implica em neoplasias moderadamente diferenciadas.

Cinco casos (5/24) exibiram o subtipo tubular, todas de Graduação I. Apenas três amostras (3/24) foram classificadas como tubulopapilar (duas grau I e outra grau II) e uma (1/24) como micropapilar (grau II). Observado em menor quantidade foi o tipo adenoescamoso, presente em duas lâminas (2/24) (tabela 3).

LÂMINA S	RAD51	BRCA2	HISTOPATOLOGIA	GRADUAÇÃO	IDADE	RAÇA
P90/10	0	3	Tubulopapilar	I	2	Siamês
P153/11	2	4	Ductal	I	SI	SRD
P13/11	0	2	Tubulopapilar	I	SI	SRD
P170/13	2	4	Adenoescamoso	II	11	SRD
P222/13	0	3	Tubular	I	1	SRD
P135/14	0	1	Micropapilar	II	13	SRD
P251/17	0	0	Ductal	II	3	SRD
P381/17	0	3	Tubular	I	10	SRD
P33/17	0	2	Adenoescamoso	I	11	SRD
P211/17	1	1	Tubular	I	14	SRD
P372/18	0	3	Ductal	I	10	Persa
P446/18	3	3	Ductal	I	12	SRD
P199/18	2	1	Ductal	II	4	SRD
P828/19	1	2	Ductal	II	SI	SI
P431/19	3	0	Ductal	II	10	SRD
P54/19	2	1	Tubulopapilar	II	8	SRD
P168/19	1	0	Ductal	I	SI	SI
P293/19	1	SI	Ductal	II	SI	SI
P43/19	1	0	Ductal	I	1	SRD
P25/19	0	2	Tubular	I	17	SI
P60/20	SI	1	Tubular	I	11	SRD
P66/21	1	0	Ductal	I	11	SI
P45/21	2	0	Ductal	I	SI	SI
H177/23	2	0	Sólido	II	9	SRD

(SI: sem informação; SRD: Sem raça definida)

Tabela 4: Dados clínicos, classificação histopatológica, graduação histológica e imuno-histoquímica das amostras de neoplasias mamárias de gatas.

Para um melhor efeito comparativo do comportamento dos marcadores entre as espécies, foram separados os marcadores e seus escores, sendo delineados em duas tabelas (tabela 5 e 6)

RAD51	0	1+	2+	3+	4+
Gatas	9	6	6	2	0
Mulheres	1	4	5	5	3

Tabela 5: Representação do marcador RAD51 de acordo com a espécie e escore final.

BRCA2	0	1+	2+	3+	4+
Gatas	7	5	4	5	2
Mulheres	0	0	0	3	8

Tabela 6: Representação do marcador BRCA2 de acordo com a espécie e escore final.

6.DIUSSÃO

Nos últimos anos, a cadela vem deixando de ser o modelo de escolha para estudos de neoplasias mamárias em mulheres, devido à descoberta de maior proximidade entre a histologia, precocidade e alta recorrência de metastazização e rápido crescimento tumoral com as gatas. Somando-se a isso, em ambas as espécies, há pouca participação de tecido mioepitelial, diferentemente da cadela (PEREZ-ALENZA et al, 2004; TRAVASSOS, 2004).

Sabendo da importância da neoplasia mamária na espécie felina e como modelo de estudo para mulheres, propusemos em nosso trabalho um estudo concomitante das espécies, para avaliarmos como a marcação do gene BRCA2, amplamente estudado entre as mulheres, em associação com a marcação do gene RAD51, se apresentaria. Junto com esse foco de estudo, através de informações epidemiológicas adicionais, foi possível a discussão de outros fatores ligados à neoplasia mamária (SÖDERLUND et al, 2007)

Na primeira etapa do projeto que foi a confirmação histopatológica das amostras recebidas em lâminas de parafina, obtivemos informações similares às

de vários autores e os achados em nossa vivência clínica classificando como quase em sua totalidade neoplasias em gatas como malignas.

A idade apresentada pelos animais no momento do diagnóstico exibiu uma grande variação (1 ano a 17anos). As mulheres também apresentaram um importante intervalo etário, de 27 a 93 anos. Esta variação sugere fortemente que a genética é parte fundamental da etiologia de neoplasias mamárias, mas outros fatores estão associados.

Na medicina veterinária é difícil determinar a linhagem familiar de gatas com neoplasias mamárias, pois como mostram nossos dados, 70 % delas (17/24), não possuem raça definida e 25 % (6/24) não se atribuiu informação sobre raça, o que nos leva associar que esses animais foram adquiridos através de adoção, nos impossibilitando o conhecimento sobreparentesco. Estas informações seriam fundamentais para analisarmos se nas gatas o fator genético é tão importante como nas mulheres.

Com relação ao diagnóstico histopatológico o carcinoma ductal representou 54% das amostras que normalmente ocupa o segundo ou terceiro lugar na incidência das neoplasias mamárias, sendo precedidos por carcinomas tubulares e sólidos. O padrão micropapilar, encontrado em uma amostra, não é comum e apresenta comportamento biológico agressivo (BERSELLI et al, 2020; CASSALI et al, 2018; TOGNI, 2013; ZAPPULLI, 2017).

Como na segunda etapa trabalhamos com os dados obtidos da The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>), foi possível analisar dados anatomopatológicos e faixa etária das mulheres envolvidas no estudo. O tipo histopatológico mais observado foi o carcinoma ductal (23/29 casos), o mesmo tipo mais encontrado em nosso estudo, o que corrobora a afirmação de maior semelhança entre as neoplasias mamárias humanas e nas gatas, inclusive em sua parte estrutural, visto que o tipo mais observado em cadelas é o carcinoma em tumor misto (ZAPULLI et al, 2015; CASSALI et al, 2018).

Quanto à análise dos imuno marcadores, obtivemos da plataforma, os dados das mulheres separadamente. Na leitura das lâminas de imuno-histoquímica das gatas observamos a diferença entre as marcações.

Quatorze gatas apresentaram marcação positiva para RAD51 representando 58% dos casos e dezesseis apresentaram marcação para

BRCA2 correspondendo 66% da amostra. Sete gatas (29%) foram positivas para ambos os marcadores.

Analisando numérica e comparativamente os dados foi possível perceber que nas gatas para o marcador RAD51 o maior número de animais está distribuído no grupo sem marcação, seguido de 1+ e 2+. Para o BRCA2, a distribuição entre os scores é mais homogênea, no entanto, o maior número de gatas teve marcação negativa.

Com relação às mulheres temos um quadro totalmente diferente. Para RAD51, a distribuição é homogênea, apresentando maior número de representante nos scores 2 e 3+. Para BRCA2 quase a totalidade dos indivíduos se encontram no grupo 4+ (72%).

Apesar da similaridade comportamental entre as neoplasias entre gatas e mulheres, podemos observar que a marcação de RAD51 e BRCA2 apresentam um padrão diferente.

Como foi citado anteriormente, não temos um volume de dados robusto quando se trata de parentesco em gatas, podendo ser esta uma hipótese da pouca marcação do BRCA2, sendo este ligado a fatores hereditários. Talvez estudos semelhantes realizados em criatórios ou gatis, onde os animais são consanguíneos, o resultado se mostraria diferente. Ainda dentro deste tópico, resultados significativos com relação à marcação de BRCA2 talvez sejam obtidos em famílias de gatos da raça siamesa, cuja predisposição ao desenvolvimento de tumor de mama é maior que as demais raças (AMORIM, 2004).

Devido a estreita correlação entre esses dois genes nos processos de reparos de mutação gênica, outros estudos relacionando sua presença em neoplasias, seria fundamental pensando-se em possíveis terapias gênicas.

A maior expressão, tanto da proteína RAD51 e BRCA2 em gatas nos leva a pensar, em uma maior atividade de reparo de multiplicação celular desordenada nesta espécie, no entanto sem alta taxa de sucesso, devido a alta incidência de carcinomas mamários na espécie.

7.CONCLUSÕES

A similaridade em diversos fatores das neoplasias mamárias de mulheres e gatas, como tipo histopatológico, potencial metastático e rápido crescimento são evidentes. Apesar da marcação positiva do RAD51, BRCA2 ou de ambos em diversas neoplasias de gatas e mulheres, encontrou-se diferença dos números de indivíduos em cada escore. Futuros estudos envolvendo tanto grupos com maior número de gatas e de mulheres e realizados em diferentes tipos tumorais, podem ser mais elucidativos para avaliação de expressão conjunta de RAD51 E BRCA2, contribuindo ainda mais para o conhecimento de novas vias da biologia molecular.

8. REFERÊNCIAS

AMORIM, F. V. et al. Avaliação clínico-cirúrgica de nódulos mamários felinos através da citologia e histopatologia **Braz Journal Vet Res anim Science**. v.41. 2004.

BERGMAN, P. J. Mammary gland tumors. In L. A. V. Conference. **The Latin American Veterinary Conference**, Lima, Perú, 2007.

BERSELLI, M. Caracterização anatomopatológica de tumores mamários de 70 gatas. **Caderno de Pesquisa**. Santa Cruz do Sul. v. 32. n. 2. p. 21-29. 2020.

BONILLA, B. et al. RAD51 Gene Family Structure and Function. **Annual Review of Genetics**. V.54. p. 25-46. 2020.

BOOS, S. et al. Carcinossarcoma mamário em uma gata: caracterização anatomopatológica e imuno-histoquímica. **Acta Scientiae Veterinariae**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Porto Alegre. V. 39. 2011.

BORGES, T.O. et al. Avaliação da taxa de positividade do receptor HER2 e da influência de três tipos de biópsia mamária no resultado imunohistoquímico em mulheres com câncer de mama invasivo no Hospital Universitário de Brasília. **Rev Bras Mastologia**. V.22(3). P. 83-89. 2012.

CASSALI, G. D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of feline mammary tumors – 2018. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.55, n.2, p.1-17, 2018.

CASSALI, G. D. Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative features with human tumours. **Cytopathology [Internet]**. Jun. V.5. p.191–6. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17573766>> 2007.

CASTAGNARO, M. et al. Ki-67 index as indicator of the post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. **Res. Vet. Sci**. v. 63. n. 3. p. 223-226. 1998.

CASTRALLI, H.A. et al. Breast cancer with genetic etiology of mutation in BRCA1 and BRCA2: a synthesis of the literature. **Braz. J.Hea. Rev.** v. 2. n. 3. p. 2215-2224. 2019.

CHEN, C.F. et al. A expressão de repetições de BRC em células de câncer de mama perturba o complexo BRCA2- Rad51 e leva à hipersensibilidade à radiação e à perda do controle do ponto de verificação G(2)/M. **J. Biol. Química.** V.274. p. 32931–32935.1999.

COELHO, A. S. et al. Predisposição hereditária ao câncer de mama e sua relação com os genes BRCA1 e BRCA2: revisão da literatura. **Revista Brasileira de Análises Clínicas.** V.50. p.17-21. 2018.

CULLEN, J. M.; BREEN, M. An overview of molecular cancer pathogenesis, prognosis and diagnosis. In D. J. Meuten (Ed.). **Tumors in domestic animals.** v. 1. P.1- 26. 2017.

DAVIES, A. A. et al. Papel do BRCA2 no controle da proteína de recombinação e reparo de DNA RAD51. **Célula Molecular.** V.7. P.273–282. 2001.

DIAS, C.M.F. Tumores de mama em caninos e felinos: Levantamento de casos e classificação histológica. **Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas,** Pelotas, 2006.

ELSTON, C.W; ELLIS, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology.** V. 19. P. 403-410. 1991.

FERRO, A. B. **Imuno-histoquímica.** Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL). 1. ED. 2014. Disponível em <<https://repositorio.ipl.pt/bitstream/10400.21/4569/1/Imunohistoqu%c3%admica.pdf>> Acesso em 2 de abril de 2024.

FONSECA, C. S; DALECK, C.R. Neoplasias Mamárias em Cadelas: influência hormonal e efeitos ovariectomia como terapia adjuvante. **Ciência Rural.**v.30. p.731-735. 2000.

GODIN, S. K. et al. Novos insights sobre a atividade e regulação do RAD51 durante a recombinação homóloga e replicação do DNA. **Bioquímica. Biol celular**. V. 94. P. 407–18.2016.

GOMES, L.G. et al. "Clinical and histopathological aspects of 19 cases involving mammary tumors in cats/Aspectos clínicos e histopatológicos de 19 casos envolvendo tumores mamários em gatas/Aspectos clínicos y histopatológicos de 19 casos envolvendo tumores mamários en gatas." **Veterinaria e Zootecnia**. V.6 n. 1. 2019.

GOVONI, V.M., SILVA, T.C., GUERRA, J.M., PEREIRA, I.V.A., QUEIROGA, F.L., COGLIATI, B. Genetic variants of BRCA1 and BRCA2 genes in cats with mammary gland carcinoma. **Veterinary and Comparative Oncology**. V.19, p404-408. 2021.

GIMÉNEZ, F., HECHT, S., CRAIG, L. E., & LEGENDRE, A. M. Early Detection, Aggressive Therapy: Optimizing the management of feline mammary masses. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. V.12. p. 214–224. 2010

HUGHES, K., DOBSON, J.M. Prognostic histopathological and molecular markers in feline mammary neoplasia. **The Veterinary Journal**. V. 194, pp 19-26. 2012

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2023: incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa>> Acesso em: 13 jun 2022.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Cancer today**. Lyon: WHO, 2020. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/home>> Acesso em: 13 jun 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Atlas da mortalidade**. Rio de Janeiro: INCA, 2021. base de dados. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/app/mortalidade>> Acesso em: 13 jun 2024.

JORGE, M. F. Caracterização histopatológica e marcadores imuno-histoquímicos no câncer de mama de gatas. **Dissertação (mestrado)**. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Botucatu – SP. 2016.

JOHNSTON S, D; KUSTRITZ, M.V. R; OLSON, P.N.S. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders. 2001.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Sistema Reprodutor Feminino. In: _____ **Histologia Básica**. 12 ed. P.427-443. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KONIG H, E; LIEBICH H, G. **Anatomia dos animais domésticos - texto e altas coloridos (órgãos e sistemas)**. Artmed. 2004.

LANA, S. E., RUTTEMAN, G. R., & WITHROW, S. J. Tumors of the mammary gland. In S. J. WITHROW & D. M. VAIL. **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. Ed.4. pp. 619-636. St. Louis: Saunders Elsevier. 2007.

LIM, D, S. et al. Uma mutação no rato RAD51 resulta em um letal embrionário precoce que é suprimido por uma mutação no p53. **Mol. Célula. Biol.** v. 16. P.7133–7143.1996.

MAGALHÃES, M; OLIVEIRA F, S; HATAKA, A; COSTA, F.V.A. Neoplasmas mamários em gatas – revisão de literatura. **Rev Clin Vet.** v. 14.p. 48-52. 2009

MATOS, A. J. F. et al. Prognostic studies of canine and feline mammary tumors: The need for standardized procedures. **Vet. Journal.** v. 193. p. 24-31. 2012.

MACLEOD, K. Tumor suppressor genes. **Curr Opin Genet Dev.** V.10. p.10-81.2000.

MILLANTA, F. et al. Overexpression of HER-2 in feline invasive mammary carcinomas: an immunohistochemical survey and evaluation of its prognostic potential. **Veterinary Pathology.** v.42. p.30-34. 2005.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In D. J. Meuten. **Tumors in domestic animals** Ed.4. pp. 575-606. Iowa: Blackwell Publishing. 2002.

MOORE, A. Environmental causes of cancer in pets. In J. Maddison & D. Church. **Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association**. Sydney, Australia: World Small Animal Veterinary Association. 2007

MORRIS, J.S; DOBSON, J.M; BOSTOCK, D.E.; et al. Effect of ovariectomy in bitches with mammary neoplasms. **The Veterinary Record**. v. 142. p. 656-658. 1998.

MORRIS, J. Mammary Tumours in the Cat Size matters, so early intervention saves lives. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. v. 15. n. 5. p. 391-400. 2013.

NUNES, F, C.; DE CAMPOS, C.B.; BERTAGNOLLI, A.C. Aspectos epidemiológicos das neoplasias mamárias. In: CASSALI, G.D. **Patologia Mamária Canina**. 1ª ed. São Paulo: Medvet. cap. 3. p. 27-31. 2017

NUNES, G. D. L. et al. Neoplasias mamárias em gatas domésticas: possível influência da dieta na etiologia. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. v.5. p. 11 - 18 . 2011.

OLIVEIRA FILHO, J. C. et al. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 177-185 2010.

PICKARD, P. P.; STELL, A.; O'NEILL, D.; CHURCH, D.; BRODBELT, D. Epidemiology and risk factors for mammary tumours in female cats. **J Small Anim Pract**. V.64(5). P.313-320. 2023.

PEREZ-ALENZA, M.D; RUTTEMAN, G.R; PEÑA, L; et al. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in case-control study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. 2000.

PINTO, R.M.M.O. Neoplasias mamárias em cadelas e gatas. **Dissertação de mestrado integrado em medicina veterinária**. Lisboa, 2009.

RAHARISON F, SAUTET J. The topography of the lymph vessels of mammary glands in female cats. **Anat Histol Embryol**. V. 36. P. 442- 452. 2007.

RUTTEMAN, G. R., & KIRPENSTEIJN, J. Tumours of the mammary glands. In J. M. DOBSON & B. D. X. LASCELLES. **BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology**. Ed.2. pp. 234-242. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association. 2003

RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. Withrow and MacEwen's. **Small Animal Clinical Oncology**. 5th Edition. In: 5 ed. New York: WB Saunders. p. 547– 556. 2013.

SARTURI, P. R. et al. Perfil imunohistoquímico do câncer de mama de pacientes atendidas no Hospital do Câncer de Cascavel – Paraná. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**. V.8. n.2012.

SCHMITZ, A.C. et al. Papel da imuno-histoquímica no diagnóstico histológico do câncer de pulmão. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**. V. 7. N. 22. 2010.

SHIMIZU, C; FUKUTOMI, T; TSUDA, H. C-erbB-2 protein overexpression and p53 immunoreaction in primary and recurrent breast cancer tissues. **Journal Surg Oncol**. V.73, p. 17-20,2000.

SCHNEIDER, R.; DORN, C.R.; TAYLOR, D.O. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *Journal of National Cancer Institute*. v.43. p. 1249-61. 1969.

SOARES, M., CORREIA, J., PELETEIRO M.C., FERREIRA F. St Gallen molecular subtypes in feline mammary carcinoma and paired metastases-disease progression and clinical implications from a 3-year follow-up study. **Tumor Biol**. v. 37, n 3, pp 4053-4064. 2015.

SORENMO, K.U. Mammary gland tumors in cats: risk factors, clinical presentation, treatments and outcome. **In Proceedings of the 36th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA**. Jeju. Coreia. P.764-767. 2011.

SOUSA, M.T. ET AL. Hiperplasia fibroepitelial mamária em felinos: cinco casos. **Ciência Rural**. Santa Maria. v.32. n.5.p.891-894,2002.

SÖDERLUND, K. et al. The BRCA1/BRCA2/Rad51 complex is a prognostic and predictive factor in early breast cancer. **Radiother Oncol.** V. 84(3). P. 242-51. 2007.

TOGNI, M. et al. Estudo retrospectivo de 207 casos de tumores mamários em gatas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33(3), p. 353-358, 2013.

TOMBLINE, G; FISHEL, R. Caracterização bioquímica da proteína RAD51 humana. I. Hidrólise de ATP. **J. Biol. Química.** V.277. p.14417–25.2002.

TRAVASSOS, F.A.G.S. Lesões mamárias felinas: contributo para sua caracterização biopatológica. **Tese de Doutorado. Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.** Vila Real. P.251. 2004.

VILARDI, L. et al. Fatores clínicos e patológicos associados ao prognóstico de gatas acometidas por neoplasias mamárias. **Comparative and Translational Medicine.** V.1. p. 24-39. 2023.

WIESE, D. A.; THAIWONG T.; YUZHANSKYAN-GURKAN V.; KIUPEL, M. Feline mammary basal-like adenocarcinomas: a potential model for human triplenegative breast cancer (TNBC) with basal-like subtype. **BMC Cancer**, v.13 n.403. 2013.

ZUCCARI, D.A.P.C.; SANTANA, A.E.; ROCHA, N.S. Fisiopatologia da neoplasia mamária em cadelas - revisão. **Clínica Veterinária**, v.6 n.32. p.50-54. 2001.

ZAPPULLI, V., RASOTTO, R., CALIARI, D., MAINENTI, M., PEÑA, L., GOLDSCHMIDT, M. H.; KIUPEL, M. Prognostic Evaluation of Feline Mammary Carcinomas. **Veterinary Pathology.** V. 52(1). P. 46–60. 2015.

ZAPPULLI, V. et al. Surgical Pathology of Tumors of Domestic Animals: Mammary Tumors. *Advancement of Veterinary Pathology.* Davis-Thompson D V M Foundation.2018.

WIEGMANS, A.P. Rad51 supports triple negative breast cancer metastasis. **Oncotarget.** V.30. P.3261-72. 2014.

